Determination of *cry2A* genes in *Bacillus thuringiensis* isolated from southern provinces of Vietnam

Hoang P. T. Truong^{1*}, Ha K. Duong², Linh B. Ton¹, Don D. Le¹,
Nhưng T. H. Tran¹, Thuy T. Dang¹, & Linh N. C. Huynh¹

¹Research Institute for Biotechnology and Environment, Nong Lam University, Ho Chi Minh City, Vietnam

²Research Institute for Plant Varieties, Livestock and Aquatic Products, Ho Chi Minh City, Vietnam

ARTICLE INFO

Research Paper

Received: December 18, 2017

Revised: September 20, 2018

Accepted: December 14, 2018

Keywords

Bacillus thuringiensis

cry2A gene

Isolates

PCR

*Corresponding author

Truong Phuoc Thien Hoang

Email: hoangtp@hcmuaf.edu.vn

ABSTRACT

In 27 isolates of *Bacillus thuringiensis* from southern provinces of Vietnam with ability to produce bipyrinidal inclusions, 21 isolates were positive for *cry2A*-type genes via PCR methods. Analysis of DNA sequences revealed the amplified products belonged to *cry2A*-type genes of *B. thuringiensis* with identity above 90% compared with *cry2A* sequences published on GenBank sequence database. The identity values of the amplified products of the isolates BT5 and TN7.1 with *cry2A* group primers were 97% and 99%, respectively, while the identity of 99% were observed in the PCR products of TN7.1 with specific primers for partial sequences of *cry2Aa* and *cry2Ab*. These results may be useful for prediction of insecticidal activity of the *B. thuringiensis* isolates and development of new bioinsecticide products.

Cited as: Truong, H. P. T., Duong, H. K., Ton, L. B., Le, D. D., Tran, N. T. H., Dang, T. T., & Huynh, L. N. C. (2019). Determination of *cry2A* genes in *Bacillus thuringiensis* isolated from southern provinces of Vietnam. *The Journal of Agriculture and Development* 18(1), [109-116](#).

Xác định gen *cry2A* trong mẫu vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* phân lập tại các tỉnh thành khu vực miền Nam Việt Nam

Trương Phước Thiên Hoàng^{1*}, Dương Kim Hà², Tôn Bảo Linh¹, Lê Đình Đôn¹,
Trần Thị Hồng Nhung¹, Đặng Thị Thủy¹ & Huỳnh Nguyễn Chí Linh¹

¹Viện Nghiên Cứu Công Nghệ Sinh Học Và Môi Trường, Trường Đại Học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh, TP. Hồ Chí Minh

²Trung Tâm Giống Cây Trồng, Vật Nuôi và Thủy Sản, TP. Hồ Chí Minh

THÔNG TIN BÀI BÁO

Bài báo khoa học

Ngày nhận: 18/12/2017

Ngày chỉnh sửa: 20/09/2018

Ngày chấp nhận: 14/12/2018

Từ khóa

Bacillus thuringiensis

Dòng phân lập

Gen *cry2A*

PCR

*Tác giả liên hệ

Trương Phước Thiên Hoàng

Email: hoangtp@hcmuaf.edu.vn

TÓM TẮT

Trong 27 mẫu phân lập vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* từ một số tỉnh thành phía nam Việt Nam sinh tinh thể hình thoi có 21 mẫu dương tính với nhóm gen *cry2A* bằng kỹ thuật PCR. Kết quả phân tích trình tự DNA cho thấy các sản phẩm khuếch đại thuộc nhóm gen *cry2A* của vi khuẩn *B. thuringiensis* và có độ tương đồng trên 90% với các trình tự gen *cry2A* được công bố trên cơ sở dữ liệu gen GenBank. Sản phẩm khuếch đại của mẫu BT5 và TN7.1 với cặp primer chung cho nhóm gen *cry2A* có độ tương đồng lần lượt là 97 và 99%. Sản phẩm PCR của mẫu TN7.1 với cặp primer chuyên biệt cho gen *cry2Aa* và *cry2Ab* có giá trị tương đồng đạt 99% với các gen cùng nhóm đã công bố. Kết quả nghiên cứu có thể được sử dụng để dự đoán hoạt tính diệt côn trùng gây hại của các mẫu phân lập *B. thuringiensis* và phát triển các sản phẩm trừ sâu sinh học mới.

1. Đặt Vấn Đề

Bacillus thuringiensis (*Bt*) là vi khuẩn Gram dương, có khả năng tạo bào tử, mang các gen *cry* mã hóa các protein tinh thể độc (protein Cry) có hiệu quả phòng trừ đối với nhiều loại sâu bệnh hại trên cây trồng (Schnepf & ctv., 1998). Trong những năm qua, các nhà khoa học đã có rất nhiều cố gắng để phân lập vi khuẩn này từ nhiều môi trường khác nhau (Baig & Mehnaz, 2010; Silva & ctv., 2012; Dagga & ctv., 2016). Các nhóm nghiên cứu đã tạo được nhiều bộ sưu tập các chủng *Bacillus thuringiensis* có khả năng phòng trừ nhiều loại côn trùng và sâu hại với các hoạt tính khác nhau. Gen *cry* phổ biến nhất ở các dòng *Bt* tự nhiên là các gen thuộc nhóm *cry1*, tiếp theo là nhóm *cry2* (Ben-Dov & ctv., 1997; Bravo & ctv., 1998). Gen *cry2* thường tồn tại ở các mẫu *Bt* phân lập từ môi trường tự nhiên và đặc biệt ở các mẫu mang

gen *cry1* (Lone & ctv., 2017). Các chế phẩm sinh học *Bt* những năm 1990 và cây trồng công nghệ sinh học thường dựa vào các gen phổ biến như *cry1Aa*, *cry1Ab* và *cry1Ac* (Sauka & ctv., 2007; Niu & ctv., 2017). Sự phụ thuộc này đã dẫn đến gia tăng tính kháng độc tố Cry ở các quần thể côn trùng (Bravo & ctv., 2011; Ali & ctv., 2017).

Tuy nhiên, nguồn gen *cry* trong tự nhiên rất đa dạng và phong phú. Có khoảng 74 lớp protein Cry và các protein độc tố mới đã được xác định; trong đó 70 gen mã hóa protein độc tố đã được tách dòng (Crickmore, 2017). Mỗi chủng *Bt* chỉ chứa một số nhóm gen *cry* gây độc với một số loài côn trùng nhất định (Schnepf & ctv., 1998). Với sự phát triển và ứng dụng rộng rãi của công nghệ gen ngày nay, việc xác định nhanh các gen *cry* mong muốn, tạo dòng và xác định trình tự gen độc tố là vấn đề rất cần thiết góp phần cải tiến các thuốc trừ sâu sinh học *Bt* hiện có, đảm bảo

an toàn cho người sử dụng và an toàn trên sản phẩm nông nghiệp. Nghiên cứu thực hiện nhằm xác định sự hiện diện của các gen *cry2* ở các mẫu *Bt* phân lập từ đất ở một số tỉnh thành trong nước. Kết quả nghiên cứu sẽ cung cấp thông tin về gen *cry* ở các mẫu *Bt* và có thể ứng dụng để nghiên cứu và phát triển các chế phẩm *Bt* mới (minh chứng tài liệu tham khảo phân này).

2. Vật Liệu và Phương Pháp Nghiên Cứu

2.1. Chuẩn bị mẫu vi khuẩn

Các mẫu phân lập vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) gồm 27 mẫu từ các tỉnh Bến Tre (4 dòng; BT1, BT2, BT5, BT6), Lâm Đồng (6 dòng; LD6.1, LD9.1, LD10.1, LD10.2, LD12.1, LD21.2), Tây Ninh (5 dòng: TN7.1, TN7.6, TN1.2, TN2.2, TN3.1) và Thành phố Hồ Chí Minh (12 dòng; TP6, TP7, TP21, TP22.2, TP23, TP25.1, TP26.2, TP30.1, TP1.1, TP4.2, TP6.4, TP9.2). Vi khuẩn được duy trì trên môi trường thạch TSA ở 30°C và được dùng để ly trích DNA hay quan sát hình thái tế bào.

2.2. Quan sát đặc điểm vi thể các mẫu phân lập

Các mẫu phân lập *Bt* sau 48 giờ nuôi được nhuộm Gram, nhuộm bào tử và tinh thể. Tiến hành nhuộm bào tử và tinh thể theo mô tả của Tortora & ctv. (2004). Sử dụng thuốc nhuộm Malachite Green với tiêu bản được làm nóng bằng hơi nước, sau đó nhuộm bổ sung safranin. Nội bào tử nhuộm màu xanh lục và vách tế bào có màu đỏ hồng. Đối với nhuộm tinh thể, vết bôi vi khuẩn được nhuộm với safranin trong 1 phút, sau đó rửa và hơ nhanh trên ngọn lửa đèn cồn. Tinh thể *Bt* bắt màu đỏ, bào tử tách rời có viền xung quanh màu đỏ.

2.3. Tách chiết DNA tổng số và khuếch đại trình tự mục tiêu

DNA tổng số của các mẫu vi khuẩn sau 48 giờ nuôi cấy được thu nhận theo phương pháp của Khojand & ctv. (2013). Lấy một ít khuẩn lạc cho vào ống 1,5 mL có chứa 100 μ L nước khử ion. Tiến hành sốc nhiệt ở 98°C trong vòng 15 phút. Sau đó, ly tâm ở tốc độ 12000 rpm trong 5 phút, thu dịch nổi có chứa DNA sang ống 1,5 mL mới và bảo quản ở -20°C.

Tiến hành khuếch đại các mẫu DNA đã ly trích

với các cặp mồi đặc trưng cho nhóm gen *cry2* (Bảng 1). Thành phần phản ứng PCR thể tích 25 μ L gồm 12,5 μ L hỗn hợp MyTaq Mix (Bio-line), hỗn hợp primer bao gồm F primer và R primer ở nồng độ 0,02 μ M, 5 μ L DNA khuôn sau khi ly trích và 6,5 μ L nước cất khử ion. Mẫu DNA của chủng *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Btk) do TS. Boonhiang Promdonkoy (BIOTEC, Thái Lan) cung cấp được sử dụng làm đối chứng dương.

Phản ứng PCR được thiết lập trên máy Thermal Cycler 2720 (Applied Biosystems). Chu trình nhiệt phản ứng PCR gồm giai đoạn tiền biến tính ở 95°C trong 1 phút; 30 chu kỳ lặp lại, mỗi chu kỳ bao gồm các giai đoạn: biến tính ở 95°C trong 15 giây, bắt cặp ở 57°C trong 45 giây với nhiệt độ thay đổi tùy cặp primer sử dụng và 72°C trong 1 phút cho giai đoạn kéo dài. Sản phẩm PCR được bảo quản ở 4°C cho đến khi phân tích.

Kết quả PCR được kiểm tra bằng cách điện di trên gel agarose (Bioline, Anh) 1% trong dung dịch đệm TBE (Bioline, Anh) 0,5X. Sản phẩm PCR (5 μ L) được trộn đều với 1 μ L chất nhuộm GelRed (TBR, Việt Nam), được bơm vào từng giếng và điện di ở hiệu điện thế 100 Volt trong 35 phút. Sau khi điện di gel agarose sẽ được đọc kết quả dưới tia UV (Multi-Doc It Imaging System UVP).

2.4. Tinh sạch sản phẩm PCR và phân tích trình tự DNA

Dựa vào kết quả phân tích trên gel agarose, chọn đại diện các mẫu cho đúng sản phẩm mục tiêu để tinh sạch bằng Isolate II PCR and Gel Kit (Bioline) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sản phẩm PCR sau khi tinh sạch được giải trình tự bởi Công ty First Base (Malaysia).

Kết quả giải trình tự DNA sẽ được phân tích dựa trên cơ sở dữ liệu GenBank và công cụ BLASTn (Basic local alignment search tool for nucleotide,.ncbi.nlm.nih.gov). Dựa trên thông tin trình tự DNA nhận được cùng với các trình tự gen *cry* được công bố trên GenBank tiến hành xây dựng cây phát sinh loài bằng phần mềm MEGA-X (Kuma & ctv., 2018).

3. Kết Quả và Thảo Luận

3.1. Đặc điểm vi thể của các mẫu phân lập *Bt*

Các mẫu phân lập *Bt* đã được khẳng định dựa vào một số đặc tính sinh hóa và vi thể thông

qua nhuộm Gram, hình hình thái tế bào, khả năng sinh tinh thể và bào tử, sử dụng kính hiển vi quang học ở độ phóng đại 100X (vật kính dầu). Dựa vào hình thái tế bào, bào tử và các đặc điểm sinh hóa khó có thể phân biệt được *B. thuringiensis* và các chủng vi khuẩn còn lại trong chi Bacillus. Tuy nhiên, *B. thuringiensis* có khả năng sinh tinh thể độc trong khi các chủng *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. polymyxa*, *B. mycoides*, *B. licheniformis*, *B. alvei*, *B. anthracis*, *B. coagulans* không có khả năng này (Hansen & Hendriksen, 2001). Tất cả các mẫu phân lập *Bt* đều có tế bào hình que, Gram dương (Hình 1A), có khả năng tạo bào tử và sinh tinh thể (Hình 1B).

Hình 1. Hình thái tế bào và tinh thể mẫu *Bt* LD12.1 dưới kính hiển vi quang học (vật kính 100X). A: vi khuẩn Gram (+), hình que; B:tinh thể hình thoi (mũi tên).

3.2. Chất lượng dịch chiết DNA

Kết quả phân tích trên gel điện di ở Hình 2 cho thấy việc sử dụng phương pháp sốc nhiệt để tách chiết DNA và vi khuẩn *Bt* cho kết quả khuếch đại tốt ở mẫu phân lập và đối chứng dương. Phương pháp trích ly DNA này có một số ưu điểm như quy trình ly trích đơn giản, tiết kiệm hóa chất, thời gian ly trích ngắn và sản phẩm DNA không bị tạp hóa chất ức chế enzyme Taq polymerase như các phương pháp sử dụng phenol. Phương pháp này đặc biệt có lợi cho việc sàng lọc số lượng mẫu *Bt* phân lập từ tự nhiên. Tuy nhiên, mẫu DNA sau khi ly trích theo phương pháp sốc nhiệt bị lẫn tạp protein và RNA.

3.3. Sự hiện diện của các gen *cry2A* ở các mẫu *Bt*

Kết quả điện di trên gel agarose (Hình 2 và Hình 3) cho thấy 21/27 mẫu phân lập và chủng *Bt* var *kurstaki* đều tạo ra sản phẩm PCR duy nhất với kích thước khoảng 701 bp. Jayakumar & Kaur (2013) cũng có kết quả tương tự khi sử dụng primer Un2 để phát hiện nhóm gen *cry2A* ở các

Bảng 1. Trình tự nucleotide của các cặp mồi khuếch đại nhóm gen *cry2*

Tên primer	Trình tự nucleotide (chiều 5' – 3')	Gen mục tiêu	Kích thước sản phẩm khuếch đại (bp)	Tài liệu tham khảo
Un2F(*)	GTATATCTTAATGCAGATGAATGGG	<i>cry2</i>	701	
Un2R	CGGATAAATAATCTGGGAATAGT			
EE-2aR	GAGATTAGTCGCCCTATGAG	<i>cry2Aa</i>	498	Ben - Dov và ctv., 1997
EE-2aBr	TGGCGTTAACAATGGGGGAGAAAT	<i>cry2Ab</i>	546	
EE-2aCr	GCGTTGCTAATAGTCCCAACAACA	<i>cry2Ac</i>	725	

(*) primer xuôi Un2F được sử dụng phối hợp với các primer ngược còn lại.

Hình 2. Điện di sản phẩm PCR với cặp mồi Un2 trên gel agarose 1%, hiệu điện thế 100 Volt. M: thang chuẩn DNA Bioline 100 bp, các mẫu phân lập *B. thuringiensis* (1) LD6.1, (2) LD9.1, (3) LD10.1, (4) LD10.2, (5) LD12.1, (6) LD21.2, (7) TP6, (8) TP7, (9) TP21, (10) TP22.2, (11) TP23, (12) TP25.1, (13) TP26.2, (14) TP30.1, (15) đối chứng âm sử dụng nước cất, (16) đối chứng dương, *Bt var. kurstaki*.

Hình 3. Kết quả điện di sản phẩm PCR với cặp mồi Un2 trên gel agarose 1%, hiệu điện thế 80V. (-): nước cất, (+): đối chứng dương *B. thuringiensis var. kurstaki*; các mẫu phân lập *Bt*, (A) 1: TP1.1; 2: TP4.2; 3: TP6.4; 4: TP9.2; 5: TN7.1; 6: TN7.6; 7: TN1.2; 8: TN2.2; 9: TN3.1; (B) 1: BT1; 2: BT2; 3: BT5; 4: BT6; M: thang chuẩn DNA 100 bp Promega (A) và Bioline (B).

chủng *Bt* phân lập từ tự nhiên. Như vậy 21 mẫu phân lập *Bt* đều có thể mang gen thuộc nhóm *cry2A*. Bên cạnh đó, kích thước các băng sản phẩm khuếch đại của mẫu *Bt* phân lập hoàn toàn trùng khớp với kích thước sản phẩm khuếch đại của đối chứng dương *B. thuringiensis var. kurstaki* và phản ứng đối chứng âm không cho sản phẩm chứng tỏ phản ứng không bị tạp nhiễm. Qua đó có thể kết luận rằng các cặp mồi sử dụng để phát hiện nhóm gen *cry2A* hoàn toàn đặc hiệu và hoạt động tốt.

Nhiều primer chuyên biệt để phát hiện các phân nhóm *cry2A* bằng phương pháp PCR đã được phát triển và sử dụng (Ben-Dov & ctv., 1997). Kết quả xác định các phân nhóm gen *cry2A* trên 9 mẫu *Bt* phân lập ở Thành phố Hồ Chí Minh và Tây Ninh cho thấy sự xuất hiện sản phẩm khuếch đại đặc trưng cho gen *cry2Aa* và *cry2Ab* ở 3/9 mẫu *Bt* gồm TN7.1, TN 7.6 và

TN1.2 (Hình 4). Kích thước mong muốn đối với sản phẩm PCR với cặp mồi đặc hiệu cho phân nhóm gen *cry2Aa*, *cry2Ab* và *cry2Ac* lần lượt là 498 bp, 546 bp và 725 bp (Bảng 1). Sản phẩm khuếch đại vùng gen *cry2Ac* với primer Un2F và EE-2AcR của các mẫu phân lập và đối chứng dương (Hình 4) có kích thước khoảng 300 bp - 350 bp không đúng với kích thước đã được công bố (725 bp). Theo các tài liệu đã công bố, *Bt var. kurstaki* thường mang gen *cry2Aa* và *cry2Ab* của phân nhóm *cry2A* (Ben-Dov & ctv., 1997; Katara & ctv., 2016). Gen *cry2Ac* thường hiện diện ở các mẫu phân lập tự nhiên với tần suất thấp và thường đồng xuất hiện với *cry2Ab* (Ben-Dov & ctv., 1997; Mendoza & ctv., 2012) hoặc *cry2Aa* (Katara & ctv., 2016). Vì thế sự khác biệt về kích thước ở sản phẩm khuếch đại gen *cry2Ac* trong nghiên cứu này có thể là sản phẩm không đặc hiệu.

Hình 4. Kết quả điện di trên gel agarose 1% sản phẩm khuếch đại của các mẫu phân lập *Bt* với cặp mồi đặc hiệu cho gen *cry2Aa* (A), *cry2Ab* (B) và *cry2Ac* (C). (+) : đối chứng dương *B. thuringiensis var. kurstaki*; (-): đối chứng âm, nước cất; các mẫu phân lập *Bt*, (1) TP1.1; (2) TP4.2; (3) TP6.4; (4) TP9.2; (5) TN7.1; (6) TN7.6; (7) TN1.2; (8) TN2.2; (9) TN3.1; L: thang chuẩn DNA 100 bp (Promega). Mũi tên = 500 bp. Kích thước sản phẩm PCR mục tiêu như Bảng 1.

3.4. Phân tích trình tự sản phẩm PCR

Để khẳng định kết quả PCR, tiến hành giải trình tự 6 sản phẩm PCR, trong đó gồm 3 sản phẩm khuếch đại với primer Un2 (Bt5-Un2, TN7.1-Un2 và Btk-Un2) và 3 sản phẩm khuếch đại của mẫu TN7.1 với primer chuyên biệt cho gen *cry2Aa*, *cry2Ab* và *cry2Ac* (TN7.1- *cry2Aa*, TN7.1- *cry2Ab*, TN7.1- *cry2Ac*). Mẫu BT5-Un2 được giải trình tự với cả primer Un2F và Un2R. Primer Un2F được sử dụng để giải trình tự DNA đối với tất cả các mẫu còn lại. Kết quả giải trình tự được đối chiếu với cơ sở dữ liệu gen của GenBank bằng công cụ BLASTn.

Tất cả các trình tự phân tích đều có độ tương đồng cao (93 - 99%) với các trình tự gen thuộc nhóm *cry2A* của *Bacillus thuringiensis* đã được công bố trên GenBank (Bảng 2). Giá trị tương đồng cao của mẫu đối chứng dương *Bt var kurstaki* (96%) cho thấy kết quả giải trình tự đạt chất lượng tốt. Do một số yếu tố ảnh hưởng trong quá trình vận chuyển mẫu và hàm lượng DNA thấp của sản phẩm khuếch đại với primer đặc hiệu gen *cry2Ac* nên trình tự DNA của sản phẩm chưa được xác định.

Kết quả xây dựng cây phát sinh loài dựa trên trình tự khuếch đại các gen thuộc nhóm *cry2A* của các mẫu phân lập BT5 và TN7.1 cũng cho thấy sự tương đồng cao giữa các trình tự này với trình tự DNA mục tiêu (Hình 5). Trình tự khuếch đại từ mẫu TN7.1 với primer Un2 (TN7.1-*cry2A*/Un2F) hay Un2/EE-2Aa (TN7.1-*cry2A*/Un2F) được xếp vào cùng nhóm với trình tự gen *cry2A* (số hiệu GenBank MH475907.1) và *cry2Aa* (KX24304.1); Trình tự TN7.1-*cry2Ab*/Un2F được xếp cùng nhóm với gen *cry2Ab* (KF860847.1). Gen *cry2Ac* thuộc các nhóm độc lập so với gen *cry2Aa* và *cry2Ab*, trong khi *cry1A* và *cry3A* là 2 nhóm tách biệt so với các gen thuộc nhóm *cry2A*. Kết quả nghiên cứu của Liang & ctv. (2011) cũng cho thấy sự xuất hiện đồng thời ở tần suất cao của gen *cry2Aa* và *cry2Ab* ở các mẫu phân lập *Bt* từ đất có kết quả PCR dương tính với cặp primer chung cho nhóm *cry2A*.

4. Kết Luận

Trong 27 mẫu phân lập vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* từ một số tỉnh thành phía nam Việt Nam có 21 mẫu được xác định dương tính với nhóm gen *cry2A* bằng kỹ thuật PCR. Kết quả

Bảng 2. So sánh kết quả giải trình tự với dữ liệu gen của GenBank bằng công cụ BLASTn

Trình tự DNA (sản phẩm PCR/primer giải trình tự)	Kích thước (bp)	Mức độ tương đồng (%)	Trình tự tham chiếu(số hiệu GenBank)
<i>Bt var kurstaki</i> (<i>cry2A</i> /Un2F)	677	96	MH475907.1, CP009999.1
BT5 (<i>cry2A</i> /Un2F)	674	93	MH475907.1
BT5 (<i>cry2A</i> /Un2R)	675	97	KP053646.1, KY212748.1
TN7.1 (<i>cry2A</i> /Un2F)	644	98- 99	MH475907.1, KX24304.1, Cp007615.1
TN7.1 (<i>cry2Aa</i> /Un2F)	469	99	KX24304.1, CP011350.1
TN7.1 (<i>cry2Ab</i> /Un2F)	522	99	KY212748.1, CP010091.1

Hình 5. Mối liên hệ giữa các trình tự sản phẩm khuếch đại thuộc nhóm gen *cry2A* của các mẫu phân lập *B. thuringiensis* và các trình tự gen *cry* từ cơ sở dữ liệu GenBank. Sơ đồ được xây dựng dựa trên phương pháp Maximum Likelihood và mô hình thông số Kimura 2 với 1000 lần lặp lại (bootstrap $n = 1000$). Tỷ lệ lặp lại của các nhóm phân loại được thể hiện ở các nhánh.

phân tích trình tự DNA cho thấy các sản phẩm khuếch đại của các mẫu vi khuẩn *B. thuringiensis* BT5 và TN7.1 thuộc nhóm gen *cry2A* và có độ tương đồng cao (97% và 99%) với các trình tự gen *cry2A* được công bố trên cơ sở dữ liệu gen GenBank. Sản phẩm PCR của mẫu TN7.1 với cặp primer chuyên biệt cho gen *cry2Aa* và *cry2Ab* có giá trị tương đồng đạt 99% với các gen cùng nhóm đã công bố. Sự hiện diện của gen *cry2Ac* trên Btk và các mẫu phân lập cần được khảo sát thêm. Kết quả nghiên cứu đã cung cấp thông tin về nhóm gen *cry2A* ở các mẫu *Bt* phân lập từ đất ở các tỉnh thành khu vực miền Nam Việt Nam, có thể sử dụng để dự đoán phạm vi diệt côn trùng gây hại của các mẫu phân lập *Bt* và phát triển các chế phẩm *Bt* mới.

Lời Cảm Ơn

Cảm ơn Sở Khoa học Công nghệ Thành phố Hồ Chí Minh và Bộ Giáo dục và Đào tạo đã hỗ trợ kinh phí thực hiện nghiên cứu.

Tài Liệu Tham Khảo (References)

- Ali, G., van der Werf, W., & Vlask, J. M. (2017). Biological and genetic characterization of a Pakistani isolate of *Spodoptera litura* nucleopolyhedrovirus. *Biocontrol Science and Technology* 28(1), 20-33.
- Baig, D. N., & Mehnaz, S. (2010). Determination and distribution of cry-type genes in halophilic *Bacillus thuringiensis* isolates of Arabian Sea sedimentary rocks. *Microbiological Research* 165(5), 376-383.
- Ben-Dov, E., Zaritsky, A., Dahan, E., Barak, Z., Sinai,

R., Manasherob, R., Khamraev, A., Troitskaya, E., Dubitsky, A., Berezina, N., & Margalith, Y. (1997). Extended screening by PCR for seven cry group genes from field-collected strains of *Bacillus thuringiensis*. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 4883-4890.

- Bravo, A., Likitvivatanavong, S., Gill, S. S., & Soberón, M. (2011). *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 41(7), 423-431.
- Bravo, A., Sarabia, S., Lopez, L., Ontiveros, H., Abarca, C., Ortiz, A., & Quintero, R. (1998). Characterization of cry genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Applied and Environmental Microbiology* 64(12), 4965-4972.
- Crickmore, N. (2017). *Bacillus thuringiensis* toxin classification. In Fiuza, L. M., Polanczyk, R. A., & Crickmore, N. (Eds.). *Bacillus thuringiensis and Lysinibacillus Lysinibacillus sphaericus: Characterization and use in the field of biocontrol* (41-52). Cham, Switzerland: Springer International Publishing.
- Dagga, A. A. M., Amnama, A. A. A., Al-Sharif, M., & Hindi, M. E. (2016). Isolation and molecular characterization of cry gene for *Bacillus thuringiensis* isolated from soil of Gaza strip. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 5(4), 659-666.
- Hansen, B. M., & Hendriksen, N. B. (2001) Detection of enterotoxigenic *Bacillus Cereus* and *Bacillus Thuringiensis* strains by PCR analysis. *Applied and environmental Microbiology* 67(1), 185-189.
- Jayakumar, S., & Kaur, S. (2013). Occurrence of cry genes in *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) isolates recovered from phylloplanes of crops growing in the New Delhi region of India and toxicity towards Diamondback moth (*Plutella xylostella*). *Journal of Biological Sciences* 13, 463-473.
- Katara, J. L., Kaur, S., Kumari, G. K., & Singh, N. K. (2016). Prevalence of cry2-type genes in *Bacillus thuringiensis* isolates recovered from diverse habitats in India and isolation of a novel cry2Af2 gene toxic to *Helicoverpa armigera* (cotton boll worm). *Canadian Journal of Microbiology* 62(12), 1003-1012.
- Khojand, S., Keshavarzi, M., Zagargi, K., Abdolahi, H., & Rouzbeh, F. (2013). Presence of multiple cry genes in *Bacillus thuringiensis* isolated from dead cotton boll-worm *Heliothis armigera*. *Journal of Agricultural Science and Technology* 15, 1285-1292.

- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35, 1547-1549.
- Liang, H., Liu, Y., Zhu, J., Peng, G., Li, S., Wang, S., & Li, P. (2011). Characterization of cry2-type genes of *Bacillus thuringiensis* strains from soil isolated of Sichuan basin, China. *Brazilian Journal of Microbiology* 42(1), 140-146.

- Lone, S. A., Malik, A., & Padaria, J. C. (2017) Characterization of lepidopteran-specific *cry1* and *cry2* gene harbouring native *Bacillus thuringiensis* isolates toxic against *Helicoverpa armigera*. *Biotechnology Reports* 15, 27-32.
- Mendoza, G., Portillo, A., Arias, E., Ribas, R. M., & Olmos, J. (2012). New combinations of *cry* genes from *Bacillus thuringiensis* strains isolated from northwestern Mexico. *International Microbiology* 15, 209-216.
- Niu, L., Mannakkara, A., Qiu, L., Wang, X., Hua, H., Lei, C., & Ma, W. (2017). Transgenic *Bt* rice lines producing *Cry1Ac*, *Cry2Aa* or *Cry1Ca* have no detrimental effects on brown planthopper and pond wolf spider. *Scientific Reports*, 7(1), 1940-1940.
- Sauka, D. H., Amadio, A. F., Zandomeni, R. O., & Benintende, G. B. (2007). Strategy for amplification and sequencing of insecticidal *cry1A* genes from *Bacillus thuringiensis*. *Antonie van Leeuwenhoek* 91(4), 423-430.
- Silva, M. C., Siqueira, H. A. A., Marques, E. J., Silva, L. M., Barros, R., Lima Filho, J. V. M., & Silva, S. M. F. A. (2012). *Bacillus thuringiensis* isolates from northeastern Brazil and their activities against *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) and *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Biocontrol Science and Technology* 22(5), 583-599.
- Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D. R., & Dean, D. H. (1998). *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62(3), 775-806.
- Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L. (Eds.) (2004). *Microbiology – An introduction* (8th ed.). San Francisco, CA, USA: Pearson Benjamin Cummings.