

BÀI TỔNG QUAN

**NGHIÊN CỨU VÀ PHÁT TRIỂN CÁC GIỐNG ĐẬU TƯƠNG BIẾN ĐỔI GEN SỬ DỤNG CÁC GEN KHÁNG SÂU CÓ NGUỒN GỐC TỪ VI KHUẨN *Bacillus thuringiensis***

Lê Thị Thu Hiền<sup>1,2,✉</sup>, Phạm Lê Bích Hằng<sup>1</sup>, Nguyễn Tường Vân<sup>3</sup>, Lê Thị Minh Thành<sup>3</sup>, Đào Thị Hằng<sup>4</sup>, Nguyễn Hải Hà<sup>1,2</sup>, Hà Hồng Hạnh<sup>1</sup>, Huỳnh Thị Thu Huệ<sup>1,2</sup>, Nguyễn Nhật Linh<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Thanh Hoa<sup>1</sup>, Đinh Thúy Hằng<sup>5</sup>, Nguyễn Văn Đồng<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

<sup>2</sup>Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

<sup>3</sup>Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

<sup>4</sup>Viện Bảo vệ thực vật, Viện Khoa học nông nghiệp Việt Nam

<sup>5</sup>Viện Vi sinh vật và công nghệ sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội

<sup>6</sup>Viện Di truyền nông nghiệp, Viện Khoa học nông nghiệp Việt Nam

✉Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: hienlethu@igr.ac.vn

Ngày nhận bài: 06.01.2020

Ngày nhận đăng: 13.3.2020

TÓM TẮT

Đậu tương (*Glycine max*) là một trong những nhóm cây lương thực có giá trị kinh tế cao, cung cấp nguyên liệu cho chế biến thực phẩm và sản xuất thức ăn chăn nuôi của nhiều quốc gia trên thế giới. Tuy nhiên, có nhiều yếu tố ảnh hưởng đến năng suất của đậu tương, trong đó sâu bệnh là tác nhân gây hại cao nhất. Vì vậy, việc áp dụng công nghệ sinh học để chuyển các gen kháng sâu có nguồn gốc từ vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* có thể góp phần tăng năng suất đậu tương và giảm đáng kể việc sử dụng các thuốc trừ sâu hóa học. Hiện nay, có rất nhiều gen mã hóa protein độc tố được phát hiện từ vi khuẩn này như *cry*, *cyt* và *vip* với phổ diệt sâu hại rộng và đặc hiệu các loại côn trùng thuộc bộ Cánh vẩy, Hai cánh, Cánh cứng, Cánh nửa hay tuyến trùng. Trên thế giới, nhiều công trình nghiên cứu đã được thực hiện để chuyển các gen mã hóa protein độc tố ở dạng tổ hợp hoặc biến đổi để tăng hoạt tính gây độc cho sâu. Một số sự kiện đậu tương chuyển gen mang tính trạng kết hợp kháng sâu và kháng thuốc diệt cỏ được thương mại hóa và cho phép trồng trên nhiều quốc gia như MON 87701 × MON 89788 hay DAS-81419-2. Ở nước ta, các nghiên cứu chuyển gen kháng sâu vào đậu tương đã được thực hiện và việc khai thác, sàng lọc, lựa chọn các chủng *B. thuringiensis* bản địa có tính đa dạng sinh học cao mang các gen đích đặc hiệu diệt sâu hại phục vụ chuyển gen rất có ý nghĩa khoa học và triển vọng ứng dụng thực tiễn. Đây sẽ là nguồn vật liệu quan trọng để tạo ra nhiều giống đậu tương có khả năng kháng sâu tốt đáp ứng yêu cầu của con người.

**Từ khóa:** *Bacillus thuringiensis*, cây trồng biến đổi gen, đậu tương, độc tố diệt côn trùng, gen kháng sâu

MỞ ĐẦU

Đậu tương là một trong những nhóm cây trồng quan trọng hàng đầu trên thế giới. Đây

cũng là loại cây trồng có tác dụng trong việc luân xen canh, cải tạo đất rất hiệu quả. Nhu cầu đậu tương phục vụ cho nguyên liệu thực phẩm, sản xuất thức ăn chăn nuôi trên thế giới ngày

càng tăng, do đó việc tăng năng suất cây trồng luôn là vấn đề được quan tâm của nhiều quốc gia. Bằng các phương pháp truyền thống hiện có, nhiều giống đậu tương năng suất cao, chất lượng tốt, thích nghi với nhiều vùng sinh thái đang được trồng phổ biến. Tuy nhiên, một trong những nguyên nhân gây ảnh hưởng lớn đến năng suất đậu tương là sâu bệnh. Hơn nữa, giải pháp dùng thuốc hóa học diệt sâu đục quả là không hiệu quả và có nguy cơ tích tụ hàm lượng thuốc bảo vệ thực vật. Ở Việt Nam, thiệt hại do sâu bệnh và chi phí bảo vệ thực vật đã hạn chế đáng kể năng suất và khả năng cạnh tranh của đậu tương sản xuất trong nước. Vì vậy, việc áp dụng công nghệ sinh học đặc biệt là kỹ thuật di truyền để chuyển các gen kháng sâu bệnh vào các dòng/giống đậu tương chọn lọc có thể góp phần tăng năng suất đậu tương, đồng thời giảm ảnh hưởng của việc sử dụng thuốc trừ sâu hóa học đến môi trường và sức khỏe con người.

Với khả năng sản sinh protein độc tố có khả năng diệt côn trùng, vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) đã và đang được khai thác sử dụng rộng rãi trong nông nghiệp. Đến nay, hàng trăm loại protein độc tố của *Bt* đã được phát hiện với các nồng độ độc tố diệt một số loài côn trùng khác nhau. *Bt* có thể được nuôi cấy dễ dàng nhờ quá trình lên men và được coi là một trong rất ít thuốc trừ sâu đạt tiêu chuẩn hữu cơ nên đã được sử dụng rộng rãi làm thuốc diệt côn trùng, đem lại những lợi ích to lớn cho các nông trại hữu cơ. Tuy nhiên, trong một số trường hợp, thuốc diệt côn trùng có nguồn gốc từ *Bt* rất khó tiếp xúc với côn trùng đích ẩn sâu trong cây. Hạn chế này có thể được khắc phục nhờ chuyển gen *Bt* mã hóa cho protein tinh thể độc tố vào thực vật. Các protein sản sinh trong thực vật không bị rửa trôi hay bị phân hủy dưới ánh nắng mặt trời. Vì vậy, trong mọi điều kiện sinh thái, khí hậu, cây trồng được bảo vệ khỏi sự tấn công của một số sâu hại như sâu đục thân hay đục quả. Bài tổng quan này tập trung tìm hiểu các gen kháng sâu tiềm năng có nguồn gốc từ vi khuẩn *Bt* cũng như tình hình nghiên cứu và sử dụng các gen này để tạo ra các giống đậu tương biến đổi gen có khả năng kháng sâu tốt, đáp ứng yêu cầu thực tế của con người.

## CÂY ĐẬU TƯƠNG VÀ MỘT SỐ SÂU HẠI ĐẬU TƯƠNG

Đậu tương (*Glycine max*) thuộc họ đậu (Fabaceae) là cây lương thực có giá trị kinh tế cao, giàu protein, được trồng làm thức ăn cho người và gia súc. Sản phẩm từ cây đậu tương được sử dụng rất đa dạng như dùng trực tiếp hạt thô hoặc chế biến thành đậu phụ, ép thành dầu đậu nành... đáp ứng một nửa nhu cầu về dầu thực vật và protein toàn cầu. Ngoài ra, trồng cây đậu tương còn có tác dụng cải tạo đất, tăng năng suất các cây trồng khác. Điều này có được là do hoạt động cố định  $N_2$  của loài vi khuẩn *Rhizobium* cộng sinh trên rễ cây họ đậu.

Quốc gia trồng đậu tương lớn nhất thế giới là Hoa Kỳ (chiếm khoảng 33,64% sản lượng toàn cầu), tiếp theo là Brazil, Argentina và Trung Quốc. Năng suất bình quân đạt 2,85 tấn/ha và thay đổi lớn giữa các khu vực (<https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/production.pdf>). Đối với Việt Nam, đậu tương nằm trong số cây lương thực, thực phẩm có nhu cầu cao nhưng năng suất đậu tương trung bình của Việt Nam còn thấp. Điều này là do diện tích gieo trồng và sản lượng đậu tương tại Việt Nam đang giảm khá mạnh. Năm 2018, theo thống kê sơ bộ, diện tích canh tác đậu tương Việt Nam chỉ đạt 105 ngàn ha và năng suất khoảng 1,6 tấn/ha; so với năm 2010 diện tích gieo trồng cả nước bị giảm gần 90 ngàn ha (Tổng cục thống kê, 2018). Với số liệu này thì Việt Nam chỉ đạt 30% so với chỉ tiêu kế hoạch đề ra cho năm 2010 (400 ngàn ha) và khó đạt chỉ tiêu kế hoạch đến 2020 (500 ngàn ha) theo chủ trương phát triển của Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn. Theo Cục Chăn nuôi Việt Nam, hàng năm Việt Nam phải nhập nguồn nguyên liệu để chế biến dầu thực vật và thức ăn gia súc với tổng giá trị lên đến 3,7 tỷ USD, trong đó riêng khô dầu đậu tương đã chiếm 2,7 triệu tấn (tương đương 5,4 triệu tấn hạt, gấp 30 lần so với sản lượng sản xuất được tại Việt Nam), năm 2012, đậu tương hạt nhập khẩu đạt 1,3 triệu tấn, kim ngạch nhập khẩu 780,2 triệu USD (Cục Chăn nuôi, 2013). Đây là nghịch lý của một quốc gia với ngành

nông nghiệp là chính và có truyền thống sản xuất đậu tương.

Có nhiều yếu tố ảnh hưởng đến năng suất của cây trồng, trong đó 37% năng suất bị giảm bởi cỏ dại, 11% do các loại mầm bệnh, 11% do sâu hại có nguồn gốc động vật và 1% do virus. Mức giảm do cỏ dại thay đổi không lớn giữa các khu vực (35-40%), tuy nhiên mức thiệt hại do mầm bệnh và sâu hại khá cao, tương ứng dao động ở 7-16% đối với mầm bệnh và 4-20% đối với sâu hại bởi sự khác biệt về sâu hại chính giữa các vùng, miền (Oerke, 2006). Sâu hại đậu tương là nhóm đối tượng thường xuyên gây ra những thiệt hại đáng kể đối với sản xuất đậu tương. Sâu gây hại ở tất cả các bộ phận của cây. Có tới 360 loài sâu hại đậu tương được phát hiện ở các vùng trồng đậu tương trên thế giới, với sự đa dạng loài và mức độ gây hại biến thiên theo từng vùng. Ở Mỹ, các sâu hại phổ biến trên đậu tương là sâu ăn lá *Hypena scabra*, sâu đo, bọ xít vệt đỏ *Piezodorus guildinii*. Ở Ấn Độ, các loài sâu hại nghiêm trọng gồm có dòi đục lá *Aproaerema modicella* và dòi đục thân *Melanagromyza sojae* làm giảm 20-30% năng suất hàng năm. Ngoài ra, các nhóm sâu ăn lá (sâu xanh, sâu khoang) và bọ trĩ cũng là những đối tượng cần phải chú ý trong quá trình sản xuất đậu tương ở Ấn Độ (Sharma *et al.*, 2010). Ở Thái Lan, sâu hại đậu tương được chia ra 3 nhóm sâu ăn lá, sâu hại quả và sâu hại thân. Các sâu quan trọng và phổ biến ở cả 2 vụ đậu gồm có sâu xanh, sâu khoang, sâu đục thân, sâu đục quả, sâu cuốn lá, bọ trĩ (Abdullab *et al.*, 2001). Ở Indonesia, số liệu điều tra ghi nhận sâu đục quả đậu *Etiella zinckenella* và sâu xanh *Helicoverpa armigera* tấn công 9% và 11% số quả đậu, gây thiệt hại trung bình đến 12% số quả và nguyên nhân chủ yếu là do *E. zinckenella* (Van Den Berg *et al.*, 1998a, b).

### Sâu đục quả đậu

*E. zinckenella* Treitschke [Lepidoptera: Pyralidae] phân bố rộng rãi và gây hại trên nhiều loài ký chủ như các cây họ đậu hay cây linh lăng, trong đó đậu tương là ký chủ ưa thích của chúng (Rahayu *et al.*, 2018). Con trưởng thành có kích thước 10-12 mm, sải cánh 24-28

mm, màu nâu xám, có một dải ngang màu vàng đỏ và đường viền chạy dọc mép trên của cánh. Triệu chứng gây hại của sâu đục quả rất rõ, thậm chí khi không có sự hiện diện của sâu non. Quả đậu xuất hiện đốm nâu, đây là vị trí mà sâu đục vào quả. Trong quá trình gây hại, sâu non thải ra phân làm cho quả đậu trở nên xốp và bị thối từng đám. Hạt bị ăn hết từng phần hoặc cả hạt, chỉ còn lại những màng như sợi tơ ở trong quả. Lỗ thoát ra của sâu non để vào nhộng trong đất cũng dễ dàng nhận thấy ở vỏ quả đậu. Thường mỗi quả bị hại có thể tìm thấy 1-2 sâu non. Sâu đục quả *E. zinckenella* đẻ trứng trong suốt quá trình sinh trưởng sinh thực của cây đậu tương. Tỷ lệ bị hại càng tăng khi quả phát triển, mức độ thiệt hại trên hạt do sâu đục quả đậu tương không bị ảnh hưởng bởi số lần phun thuốc trừ sâu. Cây cho năng suất cao thì tỷ lệ hại thấp hơn cây cho năng suất kém (Van Den Berg *et al.*, 1998b).

Sâu đục quả *E. zinckenella* gây hại nghiêm trọng ở nhiều vùng trồng đậu tương trên thế giới và rất phổ biến ở Đông Nam Á. Oatman (1967) nghiên cứu một số đặc điểm sinh thái của sâu đục quả đã ghi nhận ở miền Nam California, sâu đục quả *E. zinckenella* phát sinh 3-4 lứa/năm, bắt đầu từ tháng 4 và ngừng sinh trưởng vào tháng 1 hàng năm. Mật độ quần thể đạt đỉnh cao vào tháng 9, lứa thứ 2 của sâu trong năm, mật độ lên tới 123 sâu non trong 100 quả đậu năm 1963 và 140 con năm 1964, tỷ lệ quả bị hại tương ứng là 71% và 76%, và hạt bị hại là 47% và 47%. Thiệt hại do chúng gây ra ở Đài Loan là 10-15%, trong khi đó ở Indonesia lên tới 80%, ở Philippines là 57% (Permana *et al.*, 2012; Taghizadeh *et al.*, 2012).

*Maruca vitrata* [Lepidoptera: Crambidae] cũng là sâu đục quả gây hại nghiêm trọng trên nhiều cây trồng họ đậu, phân bố rộng rãi từ vùng nhiệt đới đến á nhiệt đới (Baoua *et al.*, 2011). Sâu tấn công từ khi cây còn nhỏ bằng cách đan kết các lá đậu lại, sau đó đục hoa và quả đậu (Traore *et al.*, 2013). Đặc điểm gây hại này giúp cho sâu non tránh được điều kiện môi trường bất lợi, kẻ thù tự nhiên và thuốc trừ sâu (Sharma, 1998). Con trưởng thành thích đẻ trứng vào mầm hoa. Mỗi cá thể cái đẻ từ 6-189

trứng, thậm chí lên tới 200-300 trứng. Trứng có màu vàng, trong suốt, dễ rải rác hoặc thành cụm 4-16 quả. Sâu đục thường vào giai đoạn ra hoa, phá hại hoa mới hình thành, làm giảm đáng kể năng suất và hiệu quả phòng trừ. Thiệt hại do *M. vitrata* được ước tính từ 10% đến 80% trong các loại cây trồng khác nhau (Sharma, 1998). Tuy nhiên, tổn thất khác nhau tùy theo loài cây họ đậu và vị trí địa lý của chúng (Karel, 1993).

### Sâu xanh

*Heliothis armigera* Hübner [Lepidoptera: Noctuidae] là đối tượng gây hại nghiêm trọng của nhiều cây trồng như thuốc lá, bông, cà chua, đậu tương, ngô, lúa mì, hướng dương, tiêu xanh và các loại cây ăn quả (Fernandes *et al.*, 2015). Thiệt hại trực tiếp của ấu trùng này đối với các cấu trúc ra hoa và hình thành quả cùng với việc phun thuốc trừ sâu trên diện rộng dẫn đến năng suất cây trồng thấp và chi phí sản xuất cao (Fitt, 1989). Nghiên cứu định lượng sự mất năng suất đậu tương do ấu trùng *H. armigera* của Rogers và Brier (2010) cho thấy thiệt hại phụ thuộc vào giai đoạn trưởng thành và năng suất tiềm năng của cây đậu tương, điều kiện khí hậu và đặc biệt là mật độ ấu trùng. Stacke và đồng tác giả (2018) đã đánh giá mức độ thiệt hại do sâu *H. armigera* gây ra tại các giai đoạn sinh trưởng của cây đậu tương ở Brazil. Kết quả nghiên cứu cho thấy giai đoạn ra quả bị thiệt hại nghiêm trọng hơn đáng kể so với các giai đoạn sinh trưởng khác của cây.

### Dòi đục thân đậu tương

*Melanagromyza sojae* [Diptera: Agromyziidae] là loài dòi đục thân gây hại ở các giai đoạn khác nhau của cây nên đường đục và lỗ đục có thể hiện diện ở bất kỳ vị trí nào trên thân cây. Ruồi tấn công cây bằng cách đẻ trứng vào mặt dưới của lá non. Khi ấu trùng, còn gọi là dòi nở ra, chúng ăn gân lá qua cuống rồi đục vào trong khoang thân, tạo ra các đường đục. Trên cây con, ấu trùng thường tấn công phần ngọn, làm cho chồi ngọn bị hư, cây ra nhiều chồi nách. Trên cây trưởng thành, ấu trùng làm chết từng nhánh, làm giảm sức tăng trưởng của cây và làm cho cây chậm ra hoa. Trước khi hóa nhộng, ấu trùng gặm một lỗ

xuyên qua phần vỏ cây để làm lỗ chui ra của con trưởng thành sau khi vũ hóa. Ở Indonesia, dòi đục thân đậu tương đã tấn công 84% tổng số cây trồng khảo nghiệm đồng ruộng vào năm 1998. Chúng gây hại trong suốt vụ đậu, tỷ lệ hại thấp vào đầu vụ, sau đó tăng lên đạt đỉnh cao vào khoảng tuần thứ 5-8 sau trồng, sau đó giảm cho đến cuối vụ (Van Den Berg *et al.*, 1998a).

### Rệp đậu tương

*Aphis glycines* [Hemiptera: Aphididae] là loài rệp có nguồn gốc từ vùng Bắc Á. Chúng có 2 dạng là có cánh và không cánh, đặc điểm cơ thể nhỏ, kích thước khoảng gần 2 mm. Rệp đậu là đối tượng gây hại nghiêm trọng ở Mỹ và Canada, gây thiệt hại tới 2,4 triệu đô la hàng năm nếu không có biện pháp phòng trừ kịp thời (Tilmon *et al.*, 2011). Cũng theo Tilmon và đồng tác giả (2011), rệp đậu tương mới ghi nhận xuất hiện ở Mỹ từ những năm 2000, sau đó chúng nhanh chóng lan rộng ra 22 bang và 3 tỉnh ở Canada trong vòng 4 năm. Ở bang Ontario (Mỹ), vào mùa xuân và mùa hè sẽ chỉ thấy rệp cái, chúng sinh sản cho tới tận khi cây đậu tương trưởng thành. Ban đầu rệp xuất hiện với mật độ thấp, sau đó mật độ quần thể tăng lên. Một năm ở vùng này có tới 12 lứa rệp, phần lớn các lứa là dạng hình rệp không cánh. Khi mật độ quần thể rệp cao, chúng bắt đầu xuất hiện dạng hình có cánh để di chuyển sang những vùng lân cận (Ronald *et al.*, 2009). Rệp tiết ra dịch mật bao phủ các lá đậu tạo điều kiện cho nấm muội đen phát triển làm cho lá xoắn, cây lùn, hạt lép, dẫn đến giảm năng suất tới 40% hoặc hơn. Ngoài tác hại trực tiếp, rệp đậu còn có khả năng truyền bệnh virus gây khảm lá đậu tương.

### CÁC GEN MÃ HÓA PROTEIN ĐỘC TỔ CÓ NGUỒN GỐC TỪ *B. thuringiensis* VÀ ỨNG DỤNG TRONG CÔNG NGHỆ GEN THỰC VẬT

#### Các gen mã hóa protein độc tố có nguồn gốc từ vi khuẩn *B. thuringiensis*

Gần một thế kỷ qua, vi khuẩn *Bt* là đối tượng được nghiên cứu nhiều nhất trong số các

tác nhân vi sinh vật gây bệnh cho côn trùng. Hiện nay, chế phẩm sinh học diệt côn trùng có nguồn gốc từ *Bt* chiếm tới 90% thị trường thuốc trừ sâu sinh học. Trong quá trình sinh trưởng và phát triển, *Bt* có khả năng sinh ra 3 loại protein độc tố diệt côn trùng chính là Cry (crystal  $\delta$ -endotoxin), Cyt (Cytolysin), Vip (Vegetative insecticidal protein) và một số độc tố khác như hemolysin, enterotoxin, chitin... Các protein độc tố này diệt côn trùng bằng cách gây độc hệ tiêu hóa của côn trùng mẫn cảm. Năm 1981, gen mã hoá protein độc tố diệt sâu đầu tiên của *Bt* được tách dòng và đọc trình tự. Đến nay, hàng loạt gen mã hóa protein độc tố (*cry*, *cyt*, *vip*) đã được nghiên cứu đặc tính. Năm 1985, cây trồng đầu tiên trên thế giới được chuyển gen *cry* của *Bt* để diệt sâu là cây thuốc lá, mở ra kỷ nguyên chọn tạo giống cây trồng biến đổi gen mang các tính trạng mong muốn (Barton *et al.*, 1987). Hiện nay, gen mã hóa protein độc tố của *Bt* bao gồm khoảng 1000 gen đã được phân loại thành 80 họ chính (<http://www.btnomenclature.info/>). Các loại độc tố của *Bt* khác nhau về tính đặc hiệu đối với từng loại côn trùng thuộc bộ Cánh vẩy (Lepidoptera), Hai cánh (Diptera), Cánh cứng (Coleoptera), Cánh nửa (Homoptera), tuyến trùng (Nematoda)... (Crickmore *et al.*, 2013).

#### *Gen cry mã hoá protein tinh thể độc tố Cry*

Độc tố Cry là họ độc tố quan trọng và ứng dụng nhiều nhất trong sản xuất thuốc trừ sâu *Bt* và chuyển gen kháng sâu vào cây trồng. Chúng được mã hóa bởi các gen *cry* nằm trên các plasmid. Gen *cry* tự nhiên thường nằm trên plasmid có kích thước lớn, trong đó chỉ có đoạn khoảng 2 kb mã hóa protein tinh thể độc. Các plasmid này có mặt trong hầu hết các chủng *Bt* nghiên cứu với số lượng dao động từ 2 đến 12 plasmid. Ngoài ra, các gen *cry* cũng có thể nằm trên nhiễm sắc thể ở một số chủng *Bt* như chủng *kustaki* HD1, *aizawai* 7.29... Các nghiên cứu cũng cho thấy nhiều gen tổng hợp độc tố có thể tồn tại trong một chủng *Bt* như chủng *Bt israelensis* có 4 gen *cry* và 2 gen *cyt* mã hóa các protein Cry4Aa (125 kDa), Cry4Ab (135 kDa), Cry10Aa (58 kDa), Cry11Aa (68 kDa) và Cyt1Aa, Cyt2Ba (27 kDa). Các gen này nằm

trong cùng một plasmid có khối lượng 72 MDa (Carlson, Kolsto, 1993; Carlson *et al.*, 1994; Shirin *et al.*, 2003).

Các gen *cry* được phân loại dựa trên hoạt tính diệt côn trùng đặc hiệu và sự tương đồng của chuỗi nucleotide. Trên cơ sở này, gen *cry* và protein tinh thể độc tố diệt sâu được chia làm 6 nhóm chính: (1) Gen *cry1* mã hóa protein Cry1 có khối lượng phân tử 130-140 kDa gây độc đối với côn trùng bộ Cánh vẩy (Lepidoptera); (2) Gen *cry2* mã hóa protein độc tố có khối lượng phân tử 69-71 kDa có hoạt lực với ấu trùng của bộ Cánh vẩy (Cry2B) và bộ Hai cánh (Cry2A); (3) Gen *cry3* mã hóa protein 73-74 kDa diệt côn trùng bộ Cánh cứng; (4) Gen *cry4* mã hóa protein có khối lượng phân tử 135, 128, 74 và 72 kDa diệt ấu trùng thuộc bộ Hai cánh; (5) Gen *cry5* mã hóa protein độc tố có khối lượng phân tử 80 kDa diệt côn trùng bộ Cánh vẩy và Cánh cứng; và (6) Gen *cry6* được xếp vào nhóm gen diệt tuyến trùng (Höfte, Whiteley, 1989; Crickmore, 2013). Dựa trên độ tương đồng của các trình tự amino acid, protein tinh thể độc tố được chia tiếp thành các nhóm phụ. Tuy nhiên, việc phân loại này chỉ là tương đối, điển hình như Cry1 là độc tố diệt côn trùng thuộc bộ Cánh vẩy, nhưng Cry1Ab lại được công bố diệt ấu trùng muỗi; Cry2 được dùng để chỉ hoạt tính kép (diệt đồng thời ấu trùng bộ Cánh vẩy và Hai cánh), trong khi đó Cry2B lại chỉ độc đối với ấu trùng bộ Cánh vẩy (Panbangred *et al.*, 2000). Các độc tố cùng trong một lớp cũng khác nhau về hoạt tính diệt sâu. Cry1Aa diệt tằm dâu *Bombyx mori* mạnh hơn Cry1Ac 400 lần, trong khi đó hoạt tính của Cry1Ac đối với sâu *Heliothis virescens* hoặc *Tricoplusiani* mạnh hơn Cry1Aa 10 lần (Ge *et al.*, 1991). Độc tố Cry8Da diệt được loài bọ hung *Anomala cuprea* nhưng không diệt được loài *Popillia japonica*, trong khi đó Cry8Db có tác dụng ngược lại (Asano *et al.*, 2003; Yamaguchi *et al.*, 2008). Hiện nay, có khoảng 800 gen mã hóa cho protein độc tố Cry đã được xác định trình tự và được xếp vào trong 78 họ dựa trên sự tương đồng về trình tự các amino acid. Trong đó, nhóm *cry1* bao gồm 228 gen, *cry2* có 68 gen, *cry3* có 18 gen, *cry7* có 21 gen, *cry8* có 38 gen...

(<http://www.btnomenclature.info/>).

Protein tinh thể độc tố thường tồn tại ở dạng tiền độc tố và có cấu trúc đặc thù. Đặc điểm điển hình trong cấu trúc của protein tinh thể độc là có các vùng bảo thủ nằm xen kẽ các vùng biến đổi. Các vùng bảo thủ này đóng vai trò quan trọng về mặt cấu trúc và chức năng. Cấu trúc chung của protein tinh thể độc tố Cry gồm 3 vùng (Domain). Thứ tự các vùng được tính từ đầu N đến đầu C của chuỗi polipeptide. Vùng 1 bao gồm phần đầu N bảo thủ cao, có chứa một bó gồm 7 chuỗi xoắn  $\alpha$  đối song song ( $\alpha$  antiparallel) trong đó chuỗi số 5 được bao bọc bởi các chuỗi còn lại. Vùng 2 là vùng siêu biến có chứa 3 tấm  $\beta$  đối song song tạo thành một dạng hình học topo điển hình gọi là “Greek key”, sắp xếp này cũng được gọi là cuộn lăng kính  $\beta$  ( $\beta$ -prism fold). Vùng 3 là vùng đầu C bảo thủ không hoàn toàn, chứa 2 cuộn xoắn, các tấm  $\beta$  đối song song tạo thành một kẹp  $\beta$  ( $\beta$ -sandwich) hình học topo gọi là “jelly roll”. Về chức năng, vùng 1 liên quan đến hoạt động của kênh ion, bước khởi đầu của quá trình hình thành protein. Vùng 2, 3 liên quan đến việc gắn thụ thể và quyết định tính đặc hiệu với côn trùng. Tuy nhiên ở một số độc tố, vùng 3 cũng tham gia vào hoạt động của kênh ion. Protein tinh thể độc nhóm Cry1A và Cry3A bao gồm: vùng 1 chứa 28-282 aa, vùng 2 vùng siêu biến có 283-461 aa và vùng 3 vùng đầu C bao gồm 462-610 aa (Grochulski *et al.*, 1995; Rajamohan *et al.*, 1996; Wolfersberger, 1996).

Cơ chế hoạt động của protein tinh thể Cry liên quan tới sự hòa tan của tinh thể trong ruột giữa của côn trùng. Khi sâu ăn phải protein độc tố tinh thể *Bt*, dưới tác động của enzyme protease có tính kiềm (pH>10) trong ruột sâu, tinh thể độc bị hòa tan và một nhân độc tố có khối lượng phân tử 60-65 kDa được hình thành và hoạt hóa. Độc tố đã hoạt hóa bám vào các phân tử cảm thụ đặc biệt nằm trên màng vi thể của tế bào thành ruột sâu. Sự gắn kết này ở ruột sâu làm thay đổi gradien điện hóa tạo thành các lỗ rò (kênh ion) và do đó phá hủy cân bằng áp suất thẩm thấu của màng tế bào, làm cho tế bào phồng lên, bị phân hủy, dẫn đến sâu chết. Tính

đặc hiệu của độc tố phụ thuộc khả năng gắn với thụ thể đặc hiệu trên màng của lông nhung ruột giữa côn trùng mẫn cảm; một số vị trí có thể liên kết với một loại độc tố, một số vị trí khác có thể liên kết với hai hay nhiều loại độc tố (Bravo *et al.*, 2007). Trong khi đó dạ dày của người và động vật máu nóng có độ pH  $\leq 2$ , protein tinh thể không bị hòa tan nên được thải ra ngoài. Vì vậy, protein tinh thể *Bt* được xem là một tác nhân diệt côn trùng có tính đặc hiệu cao và rất an toàn với người và động vật bậc cao (Li *et al.*, 1991; Knowles, Dow, 1993).

#### *Gen cyt mã hóa protein độc tố Cyt*

Cũng có bản chất là protein và hình thành thể vùi như độc tố Cry, nhưng tính tương đồng của trình tự amino acid giữa độc tố Cyt và độc tố Cry hầu như không đáng kể. Hiện nay, 37 độc tố Cyt thuộc 3 nhóm (cyt1, cyt2, cyt3) đã được công bố. Các độc tố này có khối lượng phân tử 2530 kDa và chủ yếu thuộc các dưới loài *B. thuringiensis israelensis*, *morrisoni*, *medellin*, *neolonensis*, *kyushuensis*, *damstradiensis*, *fuokukaensis*, *tenebrionis* (Crickmore, 2013).

#### *Gen vip mã hóa protein độc tố Vip*

Có một số protein diệt sâu không liên quan đến protein Cry được tạo ra ở một số chủng *B. thuringiensis* trong pha sinh trưởng sinh dưỡng của tế bào, các protein này gọi chung là Vip (Vegetative Insecticidal Protein). Các Vip này không phải là protein tinh thể mà là protein tiết từ tế bào. Độc tố Vip được phát hiện đầu tiên là Vip3A1 và Vip3A2 vào năm 1996 nhờ Estruch và cộng sự. Đến nay, các nhà khoa học đã phát hiện được 129 gen *vip* mã hóa 4 nhóm độc tố Vip từ Vip1 – Vip4 (Estruch *et al.*, 1996; Crickmore, 2013).

Gen *vip3A* xuất hiện trong cả các chủng *Bt* và *Bacillus cereus*. Gen này mã hóa protein 88 kDa được tổng hợp trong suốt pha sinh dưỡng nhưng không được tiết ra ngoài. Protein này có hoạt tính đối với rất nhiều côn trùng gây hại thuộc bộ Cánh vẩy như: *Agrotis ipsilon*, *Spodoptera frugiperda*, *Spodoptera exigua*, *Helicoverpa zea*. Khi côn trùng mẫn cảm ăn

phải độc tố, Vip3A là nguyên nhân gây phân giải các tế bào biểu mô ruột giữa; các đặc tính vật lý của Vip3A biểu lộ tính độc như protein Cry (Estruch *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 2003).

### Ứng dụng nguồn gen kháng sâu trong công nghệ gen thực vật

Với sự gia tăng dân số toàn cầu nhanh như hiện nay, làm sao để tăng sản lượng nông nghiệp, cung cấp lương thực ổn định cho con người luôn là mối quan tâm lớn của nhiều quốc gia. Tình hình lương thực bấp bênh còn khá phổ biến. Bên cạnh những nguyên nhân lớn còn tồn tại (nông nghiệp chưa được coi trọng đúng mức, đất đai chưa được sử dụng hợp lý...), rõ ràng sâu và bệnh hại là một trong những yếu tố gây thiệt hại chủ yếu cho mùa màng. Mặc dù nhiều biện pháp bảo vệ thực vật đã được áp dụng nhưng những tổn thất nghiêm trọng do sâu bệnh gây ra trên phạm vi toàn cầu ước tính vẫn chiếm tới 50% tổng sản lượng lúa mì hàng năm và tới 80% trên cây bông. Các con số tương ứng ở đậu tương là 26%, ngô 31%, lúa 37% và khoai tây 40%. Mức độ thiệt hại tăng nghiêm trọng khi cây trồng không được áp dụng các biện pháp bảo vệ (Oerke *et al.*, 2006).

Hiện nay, để phòng trừ sâu bệnh hại, rất nhiều loại thuốc trừ sâu hóa học đã được sử dụng với chi phí tốn kém, cũng như gây ô nhiễm môi trường và gây hại tới sức khỏe con người. Do đó, những kỹ thuật tiên tiến trong bảo vệ cây trồng được ứng dụng nhằm xây dựng một nền nông nghiệp sạch, bền vững. Việc tạo ra các giống cây trồng mới có khả năng kháng sâu được đặc biệt quan tâm, góp phần nâng cao năng suất và khắc phục những hạn chế khi sử dụng các biện pháp trừ sâu hóa học cũng như các biện pháp sinh học truyền thống.

Các loại cây trồng biến đổi gen tạo ra nhờ sử dụng công nghệ sinh học được trồng nhiều nhất hiện nay là đậu tương, bông, ngô và cải dầu với hai tính trạng được sử dụng phổ biến là tính trạng kháng thuốc diệt cỏ và kháng côn trùng. Diện tích canh tác cây trồng biến đổi gen tiếp tục tăng từ 189,8 triệu ha năm 2017 lên 191,7 triệu ha trong năm 2018. Số lượng cây

trồng biến đổi gen đã tăng gần 113 lần trong suốt 23 năm qua (từ 1996 đến 2018) (ISAAA, 2018). Nhìn chung, diện tích canh tác cây trồng biến đổi gen, đặc biệt là cây kháng côn trùng, tiếp tục tăng do các nước canh tác cây trồng biến đổi gen lớn trên thế giới tiếp tục tăng tỷ lệ gieo trồng những giống cây trồng chính. Ví dụ, tỉ lệ canh tác bông *Bt* ở Ấn Độ tăng từ 11 triệu ha năm 2013 lên 11,6 triệu ha năm 2014. Bông *Bt* đã tạo ra cuộc cách mạng trong sản xuất bông ở nước này. Tổng lợi nhuận kinh tế mà bông *Bt* mang lại cho Ấn Độ trong khoảng thời gian từ 2002 đến 2013 là 16,7 tỷ USD, riêng năm 2013 đạt 2,1 tỷ USD. Các giống bông *Bt* cũng làm giảm một nửa lượng thuốc trừ sâu cần sử dụng; làm tăng gấp đôi năng suất thu hoạch, chuyển Ấn Độ từ nước nhập khẩu bông thành nước xuất khẩu bông lớn nhất trên thế giới. Năm nước thuộc khối EU (Tây Ban Nha, Bồ Đào Nha, Cộng hòa Séc, Slovakia và Rumani) đã canh tác 131.535 ha ngô *Bt* biến đổi gen trong năm 2017. Trong đó, Tây Ban Nha canh tác 91% tổng diện tích ngô *Bt* sự kiện MON810 của EU tương đương 124.227 ha và tỉ lệ ứng dụng công nghệ sinh học ở mức 31,6% (ISAAA, 2017). Trong khi đó ở châu Á, Trung Quốc đã phát triển hàng chục dòng lúa và ngô biến đổi gen biểu hiện các protein *Bt* diệt côn trùng như lúa *Bt* Kemingdao (KMD), mfb-MH86, TT51-1 (Huahui 1), TT9-3 và *Bt* Shanyou 63; hay ngô *Bt* Zhengdan958K và Shuangkang 12-5.

Việc biểu hiện gen *cryIA* dạng đại trong cây thuốc lá và cà chua là những trường hợp đầu tiên về cây chuyển gen chống chịu sâu hại thuộc bộ Cánh vẩy (Barton *et al.*, 1987; Vaeck *et al.*, 1987). Tiếp theo, nhiều loại gen *Bt* khác nhau đã được biểu hiện ở cây trồng như thuốc lá, khoai tây, cà chua, bông, lúa, ngô (Kumar *et al.*, 2008). Vào tháng 5 năm 1995, những cây khoai tây chuyển gen mang gen *cry3A* lần đầu tiên được phép trồng ở Mỹ. Một năm sau, bông và ngô lai chuyển gen mang gen *cryIAb1* cũng được phép phát triển. Những cây chuyển gen này đều có khả năng kháng với những sâu bệnh quan trọng như sâu đục thân ngô, sâu ăn chồi thuốc lá, sâu đục quả bông, sâu hồng đục quả bông, rệp khoai tây và đã giảm việc phụ thuộc

vào thuốc diệt sâu hóa học. Khả năng chống bệnh của cây chuyển gen góp phần nâng cao năng suất của bông và ngô (Betz *et al.*, 2000). Theo Kumar và đồng tác giả (2008), hơn 50 loài cây trồng khác nhau đã được chuyển các gen mã hóa cho độc tố Cry1Aa1, Cry1Ab1, Cry1Ac1, Cry1Ca1 và Cry3Aa1 đã được tổ hợp hoặc biến đổi để tăng hoạt tính gây độc cho sâu. Bông *Bt* Bollgard II biểu hiện đồng thời hai độc tố *Bt* Cry1AC và Cry2Ab đã kháng lại hàng loạt côn trùng gây hại cho cây bông thuộc bộ Cánh vẩy. Cây ngô chuyển gen biểu hiện độc tố kép Cry34Ab1/ Cry35Ab1 cũng có khả năng kháng nhiều sâu hại thuộc họ Chrysomelidae. Ngô chuyển gen kháng sâu (MON89034) YieldGard VT Pro™ mang hai gen có nguồn gốc *Bt*: gen tái tổ hợp *cry1A.105* (bao gồm các gen *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1F*) và *cry2Ab2* đã được dùng để kiểm soát 3 loại sâu chính trên cây ngô là sâu đục thân (*Ostrinia furnacalis*), sâu đục bắp (*Helicoverpa armigera*) và sâu khoang (*Spodoptera litura*). Đây là đối tượng cây trồng chuyển gen được cấp phép sản xuất thương mại ở Việt Nam từ năm 2014.

Ở Việt Nam, thuốc trừ sâu sinh học *Bt* thương mại được ứng dụng đầu tiên trong phòng trừ sâu hại cây trồng nông nghiệp tại Viện Bảo vệ thực vật vào năm 1971. Tuy nhiên, những nghiên cứu, sản xuất và ứng dụng *Bt* mới bắt đầu được thực hiện từ năm 1973 tại Viện Sinh vật - Viện Khoa học Việt Nam (nay là Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam). Thời kỳ từ năm 1971-1993, các nghiên cứu về vi khuẩn *Bt* đều hướng sự quan tâm đến mục tiêu sản xuất và ứng dụng chế phẩm *Bt* phục vụ sản xuất nông nghiệp, chưa có các nghiên cứu cơ bản như phân bố của vi khuẩn *Bt* ở Việt Nam. Thời kỳ này đã bước đầu sản xuất và áp dụng thành công chế phẩm *Bt* (Ngô Đình Bính *et al.*, 2010). Từ năm 1995 nay, việc nghiên cứu *Bt* được chuyển sang hướng nghiên cứu cơ bản phục vụ xây dựng công nghệ sản xuất và ứng dụng trong nông nghiệp (sản xuất thuốc trừ sâu *Bt* và ứng dụng trong công nghệ chuyển gen thực vật). Hiện nay, Bộ sưu tập *Bt* của Việt Nam tại Viện Công nghệ sinh học có hơn 2.000 chủng phân lập tại Việt Nam, trong đó có 114 chủng kháng nguyên

chuẩn quốc tế dùng cho sản xuất 78 kit huyết thanh cho phân loại. Qua so sánh với các chủng *Bt* trên thế giới, các chủng *Bt* của Việt Nam rất đa dạng về cấu trúc tinh thể độc tố (hình tháp chiếm 63,1%, hình cầu 11,2%, hình khối lập phương 4,8%), đa dạng về typ huyết thanh và đặc biệt đa dạng về gen mã hóa protein diệt côn trùng thuộc bộ Cánh vẩy, Cánh cứng, Hai cánh, diệt tuyến trùng hại cây nông lâm công nghiệp, diệt tế bào ung thư người... Trong đó, gen *cry1* (*cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1B*, *cry1C*, *cry1D*, *cry1E*, *cry1F*) chiếm 57%; *cry2* - 5%, *cry4* (*cry4A*, *cry4B*) - 43%; *cry3*, *cry8* - 8%; và các gen *cyt*, *vip*, *parasporin* chiếm khoảng 1-5%. Đặc biệt, có chủng chứa đến 5 gen, bao gồm: *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1C*, *cry1D*. Một số gen đã được tách dòng và xác định trình tự (*cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry2Ab*, *cry4A*, *cry4B*, *cry3A*, *cry8D*, *vip3A*). Các gen này đều có hoạt tính diệt côn trùng bộ Cánh vẩy (sâu tơ, sâu xanh, sâu xanh da láng, sâu khoang), Hai cánh (dòi nhà, bọ gây) và Cánh cứng (mọt thóc, bọ hung) cao. Từ nguồn gen này, các chế phẩm *Bt* diệt sâu bộ Cánh vẩy, Hai cánh, Cánh cứng đã và đang được thực hiện, trong đó một số chế phẩm đã được sử dụng trong thực tế: BioBact®WP diệt sâu bộ Cánh vẩy và BioMos®WP diệt bọ gây. Kết quả cho thấy hiệu quả diệt sâu đạt từ 79-87,6% so với thuốc hóa học 77-83%; hiệu quả diệt ấu trùng muỗi gây bệnh sốt rét (*Anopheles minimus*), sốt xuất huyết (*Aedes aegypti*), muỗi gây bệnh viêm não Nhật Bản (*Culex tritaeniorhynchus*) đạt 95,8-100%. Tuy nhiên, thuốc trừ sâu *Bt* sinh học có nhược điểm là hoạt tính diệt sâu không ổn định, khó bảo quản và giá thành cao. Để khắc phục, một số gen từ các chủng *Bt* phân lập tại Việt Nam đã được biểu hiện trong *Escherichia coli* (*cry8Da*, *cry2Ab*, *cry4A*, *cry1C*) và bước đầu đã được nghiên cứu chuyển gen vào cây trồng như gen *cry8Da* mã hóa protein tinh thể diệt bọ hung thuộc bộ Cánh cứng (Võ Thị Thứ *et al.*, 2000; Ngô Đình Bính *et al.*, 2008, 2010; Lê Thị Minh Thanh *et al.*, 2005, 2008, 2009, 2011, 2012a, b; Nguyễn Thị Hoa *et al.*, 2014). Gen *cryIA(c)* tổng hợp nhân tạo đã được nghiên cứu biểu hiện trong vi khuẩn *E. coli* (Lê Thị Thu



Hiền *et al.*, 2002a), sử dụng để thiết kế các vector biểu hiện thực vật và tạo chủng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* phục vụ công tác chuyển gen vào cây trồng (Lê Thị Thu Hiền *et al.*, 2002b, c). Gen *vip3A* đã được cải biến mã di truyền để tăng cường biểu hiện trong thực vật (Trần Thị Ngọc Diệp *et al.*, 2010). Các cấu trúc gen *cryIA(c)* đã được sử dụng để chuyển vào cây thuốc lá, ngô (Huỳnh Thị Thu Huệ *et al.*, 2008; Nguyễn Văn Đồng *et al.*, 2010a, b).

Tính đến tháng 11 năm 2014, có tổng cộng 191 giống cây trồng chuyển gen kháng sâu thương mại được ghi nhận bởi tổ chức ISAAA (Bảng 1). Hầu hết các sự kiện chuyển gen đều mang các gen có nguồn gốc *Bt*. Các gen được chuyển tập trung chủ yếu vào nhóm *cry1A*, *cry2A* và *cry1F*. Ngoài ra, một số nhóm gen có nguồn gốc *Bt* khác được sử dụng bao gồm: *cry3A*, *cry3B*, *cry9C*, *cry34Ab1*, *cry35Ab1* và *vip3a*. Có thể thấy các gen này có tính ưu việt qua tần số sử dụng rất cao.

**Bảng 1.** Danh sách cây trồng chuyển gen kháng sâu đã thương mại hóa.

Cây trồng	Số sự kiện chuyển gen	Gen sử dụng
Ngô ( <i>Zea mays</i> )	110	<i>cry1A</i> , <i>cry1Ab</i> , <i>cry2Ae</i> , <i>cry2Ab2</i> , <i>cry3Bb1</i> , <i>cry1F</i> , <i>cry9C</i> , <i>cry34Ab1</i> , <i>cry35Ab1</i> , <i>vip3Aa</i> , <i>DvSnf7</i>
Bông ( <i>Gossypium hirsutum</i> )	40	<i>cry1Ac</i> , <i>cry1Ab</i> , <i>cry2Ab2</i> , <i>cry2Ae</i> , <i>cry1C</i> , <i>cry1F</i> , <i>vip3Aa</i> , <i>cry1A</i> , <i>CpTI</i> (cowpea trypsin inhibitor)
Khoai tây ( <i>Solanum tuberosum</i> )	30	<i>cry3a</i>
Đậu tương ( <i>Glycine max</i> )	4	<i>cry1Ac</i> , <i>cry1Ab2</i> , <i>cry1F</i>
Lúa ( <i>Oryza sativa</i> )	3	<i>cry1Ac</i> , <i>cry1Ab</i>
Bạch dương ( <i>Populus sp.</i> )	2	<i>cry1Ac</i> , <i>API</i> (arrowhead protease inhibitor)
Cà tím ( <i>Solanum melongena</i> )	1	<i>cry1Ac</i>
Cà chua ( <i>Lycopersicon esculentum</i> )	1	<i>cry1Ac</i>
<b>Tổng cộng</b>	<b>191</b>	

## TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU VÀ ỨNG DỤNG GEN MÃ HÓA PROTEIN ĐỘC TỔ ĐỂ TẠO CÁC GIỐNG ĐẬU TƯƠNG KHÁNG SÂU

### Phương pháp phát hiện và phân lập gen mã hóa các protein độc tố từ vi khuẩn *B. thuringiensis*

Có nhiều phương pháp khác nhau đã được sử dụng để phân lập các gen mã hóa cho độc tố mới từ *Bt*. Phương pháp PCR được Carozzi và đồng tác giả (1991) sử dụng đầu tiên để dự đoán hoạt tính diệt côn trùng của các chủng *Bt* chưa được nghiên cứu trước đây. Tiếp theo sau là các phương pháp cải biến dựa trên PCR như lai PCR (Kalman *et al.*, 1993), PCR-RFLP (Kuo, Chak, 1996), E-PCR (Juarez-Perez *et al.*, 1997) và PCR-SSCP (Lin *et al.*, 2007). Việc xây dựng các thư viện DNA của *Bt* trong *E. coli* và sàng

lọc bằng phương pháp lai Western (Schnepf, Whiteley, 1981; McLinden *et al.*, 1985), phương pháp dựa vào lai khác (Masson *et al.*, 1992; Lee, Gill, 1997; Balasubramanian *et al.*, 2002; Kongsuwan *et al.*, 2005), hoặc phát triển thư viện DNA trong chủng *Bt* đột biến không hình thành tinh thể Cry và quan sát dưới kính hiển vi cũng đã được sử dụng để phát hiện các gen *cry* mới.

Tuy nhiên, các phương pháp dựa trên PCR được sử dụng phổ biến để phân lập các gen *cry* mới. Các môi nhân gen được thiết kế chủ yếu dựa vào các trình tự bảo thủ được công bố bởi Höfte và Whiteley (1989). Mặc dù vậy, phương pháp này tồn tại nhiều hạn chế như khó tìm được gen *cry* mới (gen có ít hơn 45% trình tự amino acid tương đồng với gen *cry* đã biết) và khó thu nhận được trình tự hoàn chỉnh của gen

*cry*. Thành công trong việc giải trình tự hệ gen người năm 2003 đã mở ra một giai đoạn phát triển mới trong nghiên cứu về khoa học sự sống, kỹ nguyên hậu genome hay kỹ nguyên omics với nhiều kỹ thuật mới được phát triển và ứng dụng. Một trong những kỹ thuật được phát triển rất mạnh là kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới (NGS) cho phép giải trình tự hệ gen hiệu quả và nhanh hơn rất nhiều so với kỹ thuật trước đây. Với các tiến bộ về thiết bị và hóa chất, hiện nay giải trình tự hệ gen của một cơ thể sống có thể được thực hiện tại các phòng thí nghiệm được cấp kinh phí vừa phải với thiết bị đọc trình tự thế hệ mới như solid, solexa, ion-proton, 454, trong thời gian ngắn (có thể chỉ trong 24h) và giá thành rẻ. Trình tự hệ gen vi khuẩn hay virus có thể được xác định dễ dàng với các thiết bị có công suất nhỏ khoảng 6-10 Gb. NGS là một công cụ mạnh nhất để phát hiện được các tác nhân gây bệnh, các đột biến với tỷ lệ thấp. Chính vì vậy, giải trình tự gen thế hệ mới là công cụ không thể thiếu trong phát hiện và định lượng các đột biến trong ung thư, bệnh di truyền...

Do có tác động rất lớn đến sản xuất nông nghiệp cũng như tính đa dạng cao về gen của từng chủng *Bt* nên các nghiên cứu về hệ gen của chúng trên thế giới rất được quan tâm. Các gen mới có hoạt tính kháng sâu mạnh hơn và phổ diệt sâu rộng hơn được phát hiện và tính đa dạng gen của các chủng được xác định. Việc sử dụng kỹ thuật PCR đã cho phép phân lập số lượng lớn các gen *Bt* diệt côn trùng đặc hiệu. Đến nay, công nghệ NGS mới cho phép sàng lọc nhanh, nhiều, hiệu quả, với chi phí thấp các protein diệt sâu *Bt*.

Trong các năm qua, nhiều trình tự hệ gen của các chủng *Bt* đã được công bố trên Ngân hàng Gen Quốc tế GenBank. Năm 2015, Li và đồng tác giả đã công bố trình tự hệ gen của chủng *B. thuringiensis* HD521. Chủng này vừa có khả năng ức chế vi khuẩn gây bệnh bạc lá (*Rhizoctonia solani* AG1 IB) và vừa có thể hình thành các tinh thể độc tố *Bt* hình lưỡng tháp gồm ba gen *cry7* diệt sâu trùng sâu *Henosepilachna vigintioctomaculata* (Bộ cánh cứng). Hệ gen của HD521 có 1 nhiễm sắc thể

5.429.688 bp (tỷ lệ G + C của các nhiễm sắc thể là 35,28%) và 6 plasmid: pBTHD521-1, pBTHD521-2, pBTHD521-3, pBTHD521-4, pBTHD521-5 và pBTHD521-6 (GenBank: CP010106, CP010107, CP010108, CP010109, CP010110, CP010111, CP010112), trong đó với chiều dài gen mã hóa protein độc tố là 4.544.493 bp. Plasmid pBTHD521-5 chứa 3 gen *cry7*, có thể hình thành các tinh thể độc tố hình lưỡng tháp. Trong số 3323 các gen dự đoán, 25 là gen chức năng COG chung.

Palma và đồng tác giả (2014) đã giải trình tự hệ gen của 2 chủng *Bt* sử dụng hệ thống Illumina thế hệ mới. Chủng Hu4-2, diệt nhiều loài côn trùng cánh phần và một số loài muỗi, mang gen *cry11a* và *cry9Ea* mã hóa 2 tinh thể độc tố diệt côn trùng và một gen mã hóa protein diệt côn trùng Vip (*vip3Ca2*). Chủng Leapi01 chứa các gen mã hóa cho 7 protein Cry (*cry1Aa*, *cry1Ca*, *cry1Da*, *cry2Ab*, *cry9Ea* và hai biến thể gen *cry11a*) và một gen *vip3* (*vip3Aa10*). Một gen dài 1.143 bp dự đoán là gen độc tố mới đã được tìm thấy trong cả hai chủng. Protein dự đoán có 57% tương đồng với protein 72 của chủng *Bt* đã cấp bằng sáng chế (US8318900) và 100% tương ứng với 41,9 kDa độc tố diệt côn trùng từ vi khuẩn *B. cereus*. Độc tố 41,9 kDa được biểu hiện trong *E. coli* và được biết chống lại bốn loài bướm (*Mamestra brassicae*, *Ostrinia nubilalis*, *Spodoptera frugiperda* và *S. littoralis*) và rệp hại đào *Myzus persicae* ở liều khoảng 4,8 mg/mL và 1,5 mg/mL và không gây tử vong hoặc triệu chứng ảnh hưởng đến các côn trùng thử nghiệm (Porcar, Caballero, 2000). Điều này cho thấy những protein gây độc đặc hiệu chỉ với côn trùng đích.

Sheppard và đồng tác giả (2013) đã công bố trình tự hệ gen của chủng *Bt* subsp. 407 Cry diệt côn trùng bộ Cánh vảy. Hệ gen của chủng này bao gồm 1 nhiễm sắc thể 5,5 Mb (GenBank: CP003889) và 9 plasmid: BTB\_2p, BTB\_5p, BTB\_6p, BTB\_7p, BTB\_8p, BTB\_9p, BTB\_15p, BTB\_78p, và BTB\_502p (GenBank: từ CP003890 - CP003898); kích thước plasmid từ 2.062 bp đến 501.911 bp. BTB\_502p là plasmid lớn nhất của *B. thuringiensis* 407 Cry theo các công bố cho đến nay và là hoàn toàn

mới, với các tìm kiếm trên ngân hàng gen cho thấy 95% khác biệt với trình tự các plasmid đã được công bố. Tỷ lệ G + C của nhiễm sắc thể là 35,4% và của plasmid từ 29,7% đến 35,7%. Tổng số gen dự đoán là 6.635 trong đó 5.714 gen nằm trên nhiễm sắc thể và 921 gen trên plasmid.

Năm 2013, Liu và đồng tác giả đã xác định trình tự hệ gen của chủng *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD73 diệt côn trùng cánh vẩy. Hệ gen của chủng *Bt* HD-73 chứa 8 replicons, trong đó có một nhiễm sắc thể và 7 plasmid (GenBank: CP004069 (nhiễm sắc thể), CP004070 (pHT73), CP004071 (pHT77), CP004073 (pHT11), CP004074 (pHT8\_1), CP004075 (pHT8\_2) và CP004076 (pHT7)). Nhiễm sắc thể dài 5,6 Mb với tỉ lệ GC 31,4%, chứa 5.892 gen, 104 tRNA và 36 operon rRNA. Chiều dài 7 plasmid là từ 8 - 77 kb, với tỉ lệ GC từ 29,73% - 34,66%, mang 235 ORFs.

Năm 2011, He và đồng tác giả đã công bố trình tự hệ gen của chủng thuộc dưới loài *B. thuringiensis* subsp. *chinensis* CT-43 (GenBank: CP001907.1 - CP001917.1) có độc tính cao đối với côn trùng bộ cánh vẩy và Hai cánh (*Helicoverpa armigera*, *Plutella xylostella*, *Musca domestica*, *Meloidogyne incognita*). Chủng này có thể tạo thành các protein tinh thể độc tố khác nhau bao gồm Cry1Aa3, Cry1Ba1, Cry1Ia14, Cry2Aa9, và Cry2Ab1 và tạo ra protein độc tố Vip3Aa10 trong quá trình lên men. Phân tích trình tự trên máy Genome Sequencer FLX (454) đã xác định được bộ gen của chủng *B. thuringiensis* CT-43 dài 6,15 Mb, chứa 11 replicons, một nhiễm sắc thể (5.486.830 bp) mã hóa 5.596 dự đoán khung đọc mở (ORFs), trong đó có 5.489 chuỗi mã hóa (CDS), 10 plasmid (có kích thước từ 6.880 đến 281.231 bp và được đặt tên là pCT6880, pCT8252, pCT8513, pCT9547, pCT14, pCT51, pCT72, pCT83, pCT127 và pCT281 theo kích thước) và mang tổng cộng 737 ORFs. Tỷ lệ G + C của nhiễm sắc thể là 35,38%, plasmid là từ 30,79% đến 34,97%. Plasmid pCT281 chứa bốn gen gây độc là *cry1Aa3* (CT43\_P281270), *cry1Ia14* (CT43\_P281271), *cry2Aa9* (CT43\_P281278), *cry2Ab1* (CT43\_P281265) và

một gen *vip3Aa10* (CT43\_P281262). Những gen độc tố này nằm gần nhau và tạo thành một vùng tác nhân gây độc tố lớn. Plasmid pCT127 chứa gen *cry1Ba1* (CT43\_P127021) và một cụm gen cho quá trình sinh tổng hợp từ CT43\_P127037 đến CT43\_P127041. Số liệu đến năm 2019 cho thấy đã có 52 hệ gen của *B. thuringiensis* được giải trình tự toàn bộ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/genomes/486?>).

### Phổ diệt sâu hại đậu tương của các gen *Bt* mã hóa protein độc tố kháng sâu

Tùy điều kiện địa lý, khí hậu mà sâu hại đậu tương ở mỗi một nước có đặc trưng về loài và mức độ phá hoại riêng. Vùng Đông Nam nước Mỹ, đậu tương bị phá hại bởi 4 loài sâu chính: sâu đo *Pseudoplusia includens*, sâu xanh *Helicoverpa zea*, sâu đục thân *Elasmopalpus lignosellus*, sâu ăn lá *Anticarsia gemmatalis* (Walker *et al.*, 2000). Vùng Đông và Đông Nam châu Á, đậu tương bị tấn công bởi nhiều loài sâu chính: *H. armigera*, *Spodoptera litura*, *S. exigua* phá hại lá giai đoạn đầu vụ; rệp *Bemisia tabaci*, *Megalurothrips usitatus* và *Edwardsiana avescens* chích hút lá; sâu cuốn lá *Omiodes indicata* gây hỏng lá nghiêm trọng; và sâu đục quả *E. zinckenella*, *Maruca vitrata* phá hại nghiêm trọng năng suất đậu vào cuối vụ (Srinivasan *et al.*, 2009). Ở Việt Nam, theo thống kê thì có 3 nhóm sâu chính: sâu Bộ Cánh vẩy (Sâu đục quả *E. zinckenella*, *M. vitrata*; sâu ăn lá hoa: sâu xanh *H. armigera*, sâu xanh da láng *S. exigua*, sâu khoang *S. litura*, sâu cuốn lá *Omiodes indicata*), sâu bộ Hai cánh (dòi đục gốc *Ophiomyia phaseoli*, dòi đục thân *Melanagromyza sojae*) và bộ Cánh nửa (rệp *Aphis craccivora* Koch, *Aphis glycines* Matsumura).

Theo thống kê kết quả công bố trên thế giới, các gen độc tố từ vi khuẩn *Bt* diệt các loại sâu hại đậu tương tập trung chủ yếu ở các nhóm gen *cry1*, *cry2* và *vip*. Các gen có phổ diệt sâu khá rộng (Bảng 2): gen *cry1Ab* có thể diệt được các loài sâu Cánh vẩy *M. vitrata*, *S. exigua*; gen *cry1Ac* có thể diệt các loài *E. zinckenella*, *S. exigua*, *S. litura*, *Omiodes indicata*, *H. armigera*,

*H. zea*, *Pseudoplusia includens*; gen *vip3C* có thể diệt *S. litura*, *H. armigera* ... (Estruch *et al.*, 1996; Strizhov *et al.*, 1997; Walker *et al.*, 2000; Ibagutxi *et al.*, 2008; Hernández *et al.*, 2008; Onstad *et al.*, 2012; Palma *et al.*, 2012; Rodrigues-Silva *et al.*, 2019).

**Bảng 2.** Phổ diệt sâu hại đậu tương của một số gen kháng sâu *Bt*.

Côn trùng	Tên khoa học	Bộ	Gen <i>Bt</i>
Sâu đục quả	<i>Etiella zinckenella</i>	Cánh vẩy	<i>cry1Ac</i>
	<i>Maruca vitrata</i>	Cánh vẩy	<i>cry1Ab</i>
Sâu xanh da láng	<i>Spodoptera exigua</i>	Cánh vẩy	<i>cry1Ab, cry1Ac, cry1Ca, cry1Da, cry1Fa, cry1C, vip3A</i>
Sâu khoang	<i>Spodoptera litura</i>	Cánh vẩy	<i>cry1Ac, cry1C, vip3C</i>
Sâu cuốn lá đậu	<i>Omiodes indicata</i>	Cánh vẩy	<i>cry1Ac, cry1Fa</i>
Sâu xanh	<i>Helicoverpa armigera</i>	Cánh vẩy	<i>cry1Ac, cry1Fa, cry2Ab, vip3A, vip3C</i>
	<i>Helicoverpa zea</i>	Cánh vẩy	<i>cry1Ac</i>
Sâu đo	<i>Pseudoplusia includens</i>	Cánh vẩy	<i>cry1Ac</i>
Sâu đục thân	<i>Epinotia aporema</i>	Cánh vẩy	<i>cry1Ac</i>
	<i>Elasmopalpus lignosellus</i>	Cánh vẩy	<i>cry1Ab, cry1Ac, cry1F, cry9C</i>
Rệp đậu	<i>Aphis craccivora</i>	Cánh nửa	<i>cry4Aa, cry11Aa, B. thuringiensis subsp. kurstaki</i>
	<i>Aphis glycines</i>	Cánh nửa	<i>cyt2Aa</i>
Ruồi (dòi) đục thân	<i>Melanagromyza sojae</i>	Hai cánh	<i>B. thuringiensis subsp. kurstaki</i>
Ruồi (dòi) đục gốc	<i>Ophiomyia phaseoli</i>	Hai cánh	<i>cry2Ab</i>

### Protein *Bt* có hoạt tính mới thông qua biến đổi di truyền

Ngoài những protein gốc phân lập trực tiếp từ *Bt*, những protein Cry mới có thể được tạo ra thông qua kỹ thuật di truyền dựa trên những protein dạng dại. Những protein mới dạng này được biết sẽ tăng cường khả năng kháng của cây và ngăn ngừa tính kháng với các protein Cry của côn trùng, vì chúng có thể mang nhiều vị trí gắn với các thụ thể khác nhau trong ruột của côn trùng. Tuy nhiên, việc thiết kế hợp lý các protein Cry mới đòi hỏi kiến thức đầy đủ về trình tự gen, cấu trúc và cơ chế hoạt động của các protein Cry.

Protein Cry hoạt động trong ruột côn trùng đích theo hai bước: trước hết gắn với các thụ thể, tiếp theo là gắn và tích hợp với màng tế bào ruột

và hình thành lỗ rò. Điểm mấu chốt của độc tính không chỉ nằm ở vị trí gắn, mà còn bao gồm khả năng gắn kết chặt vào màng, hình thành lỗ gắn liền với độc tính. Domain I liên quan đến sự hình thành của các kênh ion trong màng ruột của côn trùng đích, trong đó domain II tham gia liên kết đặc hiệu với các thụ thể và domain III chịu trách nhiệm điều chỉnh hoạt động của kênh ion (Schnepf *et al.*, 1998). Một vài gốc amino acid có tính quyết định đến việc hình thành tinh thể của protein Cry. Điển hình như Tyrosine 268 chuỗi xoắn  $\alpha 7$  của Cry3A được biết có vai trò quan trọng trong giữ cấu trúc đặc thù của chuỗi xoắn  $\alpha 7$ , cần thiết cho việc ổn định và tinh thể hóa (Park, Federici, 2004). Vì Cry có trình tự domain III và I tương đối giống nhau giữa các protein, nên các protein Cry khác nhau có thể có cấu trúc xoắn gấp tương tự. Những khác

biệt đáng kể trong trình tự các protein là ở domain II, domain gắn thụ thể, chịu trách nhiệm cho hoạt động đặc hiệu của protein Cry. Việc hoán đổi giữa các domain và đột biến trong vùng này có thể tạo ra protein có độc tính mới với phổ diệt côn trùng rộng hơn hoặc độc tính cao hơn; hay có thể thiết kế một loại độc tố mang domain đặc hiệu cho côn trùng đích và domain hình thành lỗ rò hiệu quả hơn. Việc khác nhau về trình tự giữa các độc tố vi khuẩn có cùng kiểu hoạt động là kết quả của sự tái tổ hợp giữa các gen này trong tự nhiên (deMaagd *et al.*, 2003).

Thêm vào đó, việc xác định các epitope liên quan đến tương tác protein Cry và thụ thể sẽ cung cấp cơ sở phân tử của tính đặc hiệu côn trùng, đồng thời cho phép thiết kế các độc tố mới có khả năng diệt côn trùng kháng với độc tố dạng đại. Ngoài ra, protein Cry có độc tính thay đổi có thể được tạo ra bằng cách trao đổi trình tự các gen *cry* khác nhau. Phần lớn sự đa dạng của gen *cry* tự nhiên có thể là kết quả đa dạng trình tự do việc trao đổi các domain thông qua tái tổ hợp giữa các trình tự tương đồng (deMaagd *et al.*, 2003). Dựa vào điều này, các gen *cry* đa domain đã được thiết kế bằng cách trao đổi giữa các domain đặc trưng loài, tạo ra các domain có tính đặc hiệu từ các gen *cry* khác nhau để mở rộng hoạt tính kháng sâu của các chủng *Bt*. Việc phân tích chức năng của các protein lai sẽ cung cấp thông tin hữu ích về tương tác giữa các domain chức năng của các độc tố này. Kết hợp các domain độc tính của *cry1Ab* từ subsp. *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* và *cry1Ac* từ *B. thuringiensis* subsp. *entomocidus*, đã tạo ra một gen lai có độc tính của cả hai gen. Hoạt tính của protein Cry trong *Pseudomonas fluorescens* đã được cải thiện bằng cách sử dụng các gen tái tổ hợp có chứa một phần đáng kể của vùng C của *cry1Ab* (Thompson *et al.*, 1995). Gen *cry* tái tổ hợp mới bao gồm miền độc tính của gen *cry3Aa* đôi với sâu bộ Cánh cứng *Leptinotarsa texana* và vùng C của *cry1Ac* tạo ra protein Cry tái tổ hợp có kích thước 140 kDa trong *E. coli* (Carmona, Ibarra, 1999). Phiên bản tổng hợp của Cry tái tổ hợp mới có hiệu quả cao chống lại *S. litura* và

*H. armigera* trong thuốc lá chuyển gen và diệt 100% *S. litura*. Nghiên cứu thay thế vùng xoắn a7 của protein Cry1Ac với đoạn độc tố bạch hầu B sử dụng đột biến hướng đích đã tạo ra các độc tố đột biến có khả năng diệt *H. armigera* cao hơn so với Cry1Ac (Chandra *et al.*, 1999).

Một hướng tiếp cận khác trong việc tạo ra protein *Bt* có hoạt tính mới là phân tích chức năng của các protein. Thật vậy, bằng cách trao đổi các vùng mã hóa cho domain I hoặc domain III của các protein Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1C và Cry1E cho thấy tầm quan trọng của domain III của độc tố Cry1Ab trong việc tạo ra độc tính mạnh hơn của độc tố Cry1C (Rang *et al.*, 1999). Protein Cry mang domain I và II của một vài độc tố Cry1 kết hợp với domain III của Cry1Ca cho thấy hoạt tính tăng cường diệt *S. exigua* (deMaagd *et al.*, 2000). Tuy nhiên, có những trao đổi như giữa các vùng của domain I của gen *cry1* có thể gây mất độc tính (Rang *et al.*, 1999). Thay đổi trình tự amino acid tại những vị trí chủ chốt có chức năng gắn với các epitope của thụ thể có thể thu được các protein độc tố mới. Đồng thời, bằng cách loại bỏ các vị trí cắt không có hoạt lực trong khi vẫn giữ các vị trí cần thiết để tạo ra quá trình xuyên sâu vào màng cũng có khả năng tăng cường độc tính của protein Cry.

#### Nghiên cứu tạo giống đậu tương kháng sâu

Việc ứng dụng công nghệ sinh học để tạo ra cây đậu tương biến đổi gen, mang gen kháng côn trùng có nguồn gốc từ *Bt* góp phần tăng năng suất, hạn chế việc sử dụng thuốc trừ sâu hóa học, tạo điều kiện canh tác an toàn bền vững. Những thập kỷ đầu tiên của công nghệ tạo cây trồng biến đổi gen đã khẳng định hiệu quả và sự cần thiết của công nghệ đối với an ninh lương thực và bảo vệ môi trường. Trong số các cây trồng biến đổi gen, đậu tương luôn chiếm vị trí cao nhất về diện tích, với 50% tổng diện tích cây trồng biến đổi gen toàn cầu vào năm 2017 (ISAAA, 2017). Mặc dù vậy, các giống đậu tương biến đổi gen có khả năng kháng sâu chưa nhiều mà tập trung chủ yếu vào tính trạng kháng thuốc diệt cỏ. Thực tế cho thấy trong 94,1 triệu ha trồng đậu tương biến đổi

gen, có 69,7 triệu ha trồng đậu tương có khả năng kháng thuốc diệt cỏ và chỉ có 24,4 triệu ha dành cho đậu tương có tính trạng kết hợp kháng sâu và kháng thuốc diệt cỏ. Đậu tương có tính trạng kết hợp này đã được triển khai thành công ở Argentina, Paraguay và Uruguay. Ở Brazil, từ năm 2013 đến 2017, chính phủ đã phê duyệt 11 sự kiện đậu tương công nghệ sinh học được phép sử dụng cho thực phẩm, thức ăn chăn nuôi và canh tác, trong đó có 2 sự kiện đậu tương có tính trạng kết hợp kháng sâu (bộ Cánh vẩy) và kháng thuốc diệt cỏ (glyphosate) (ISAAA, 2017). Về đặc điểm kháng sâu của đậu tương, hiện nay chỉ có hai công ty sản xuất giống cây trồng biến đổi gen là Monsanto và Dow AgroSciences tạo ra giống đậu tương có tính kháng sâu đặc hiệu được phép canh tác trên thế giới. Cụ thể là sự kiện chuyển gen đậu tương *Bt* MON 87701 × MON 89788 (Monsanto) có tên thương mại Intacta™ Roundup Ready™ 2 Pro nhằm mục tiêu hiệu quả vào một số các loài sâu bướm như *Anticarsia gemmatalis* Hübner [Lepidoptera: Erebidae] và *Chrysodeixis includens* Walker [Lepidoptera: Noctuidae] (Bernardi *et al.*, 2012) nhờ có chứa gen mã hóa protein tổng hợp TIC 107, gần giống với protein Cry1Ac tự nhiên (Macrae *et al.*, 2005). Sự kiện MON 87751 ở đậu tương mang hai gen *Bt* giống như ngô chuyển gen kháng sâu MON89034 là gen tái tổ hợp *cry1A.105* và gen *cry2Ab2*, được cấp phép canh tác vào năm 2016. Tiếp nối sự phát triển của hai giống đậu tương trên, Công ty Monsanto đã chọn lọc sự kiện MON 87751 × MON 87701 × MON 87708 × MON 89788 mang tất cả các gen *Bt* của các giống đậu tương thành phần, và được 2 quốc gia là Đài Loan và Hàn Quốc cho phép canh tác (Bengyella *et al.*, 2018). Tương tự, sự kiện đậu tương biến đổi gen DAS-81419-2 (Dow AgroSciences) đã được phát triển thông qua phương pháp sử dụng *Agrobacterium* để biểu hiện các protein Cry1Ac, Cry1F và phosphinothricin acetyltransferase (PAT) có nguồn gốc tương ứng từ *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* và *Streptomyces viridochromogenes*. Sự kiện DAS-81419-2 kết hợp hai protein *Bt* trong đậu tương giúp cho các nhà sản xuất nông nghiệp

Nam Mỹ được bảo vệ khỏi thiệt hại do một số loài sâu hại bộ Cánh vẩy chính (Marques *et al.*, 2017). Bên cạnh đó, một số quốc gia phát triển cũng đẩy mạnh các nghiên cứu sử dụng độc tố *Bt* mới để chọn tạo giống đậu tương có khả năng kháng nhiều loài sâu khác nhau. Qin và đồng tác giả (2019) tiến hành chuyển gen *cry8* có nguồn gốc từ chủng *Bt* HBF-18 vào giống đậu tương Jinong 28 giúp cây kháng được sâu *Holotrichia parallela* [Coleoptera: Scarabaeoidea].

Nghiên cứu tạo giống cây trồng biến đổi gen là lĩnh vực được quan tâm nghiên cứu ở Việt Nam. Tạo giống cây trồng biến đổi gen đòi hỏi có sự đầu tư cao, sự gắn kết chặt chẽ của nhiều lĩnh vực công nghệ cao như: công nghệ tế bào, sinh học phân tử... Trước năm 2000, lực lượng nghiên cứu chủ yếu là một số cán bộ khoa học ở các viện nghiên cứu, trường đại học có tham gia vào các dự án hợp tác quốc tế tạo cây trồng biến đổi gen và hầu như chưa có các nghiên cứu cũng như chưa chuẩn bị một cách có hệ thống cho việc tạo giống cây trồng biến đổi gen như: nguồn gen để tạo giống cây trồng, nhân lực khoa học công nghệ, trang thiết bị, kỹ thuật. Chỉ đến sau năm 2000, một vài đề tài nghiên cứu đầu tiên về tạo giống cây trồng biến đổi gen đã được triển khai thực hiện trong Chương trình Công nghệ sinh học quốc gia KC04, Chương trình Giống cây trồng, vật nuôi do Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn quản lý.

Mặc dù nghiên cứu tuyển chọn, sàng lọc và chọn giống truyền thống trên thế giới cho thấy đã thành công trong việc tạo ra các dòng đậu tương kháng sâu nhưng ở Việt Nam chưa có nghiên cứu nào đi theo hướng này. Cho đến nay, hầu hết các giống đậu tương kháng sâu trên thế giới được tạo ra thông qua con đường chuyển gen. Ở Việt Nam, nghiên cứu chuyển gen vào đậu tương đã được thực hiện thành công ở nhiều trung tâm, viện nghiên cứu như Viện Di truyền nông nghiệp (Nguyễn Văn Đồng *et al.*, 2013a, b), Viện Lúa đồng bằng sông Cửu Long, Viện Công nghệ sinh học. Tuy nhiên, nghiên cứu chuyển gen kháng sâu mới chỉ được triển khai tại Viện Di truyền nông nghiệp (Nguyễn Văn Đồng *et al.*, 2010a, b) và Viện Lúa đồng bằng

sông Cửu Long (Trần Thị Cúc Hoà *et al.*, 2013). Các đề tài nghiên cứu liên quan đến phân lập và cải biến gen có nguồn gốc từ *Bt*, thiết kế vector biểu hiện trong vi khuẩn và trong thực vật (Lê Thị Thu Hiền *et al.*, 2002a, b; Lê Thị Minh Thành *et al.*, 2005, 2008, 2009, 2011, 2012a, b; Ngô Đình Bình *et al.*, 2008, 2010; Trần Thị Ngọc Diệp *et al.*, 2010). Bên cạnh đó, các đề tài cũng tập trung vào việc chuyển các gen *cry1Ac*, *cry2Aa*, *cry4A* và *vip3A* vào giống đậu tương nhập nội Williams 82, Maverick và giống đậu tương Việt Nam MTĐ176 (Nguyễn Văn Đồng *et al.*, 2010a, b; Trần Thị Cúc Hoà *et al.*, 2013). Việc phân lập các gen từ vi sinh vật bản địa (*Bt*) và thiết kế vector biểu hiện được các gen kháng hiệu quả một số loài sâu đục quả gây hại chính góp phần tạo giống đậu tương biến đổi gen có năng suất cao, chất lượng tốt, kháng sâu có thể áp dụng được cho sản xuất, góp phần đáp ứng nhu cầu thực tiễn, đồng thời giảm ảnh hưởng của việc sử dụng thuốc trừ sâu đến môi trường và sức khỏe con người.

## KẾT LUẬN

Việt Nam được công nhận là một trong những quốc gia có tính đa dạng sinh học cao nhất thế giới, vì thế việc khai thác nghiên cứu sàng lọc và lựa chọn các chủng *Bt* bản địa mang các gen đặc hiệu diệt côn trùng đích có ý nghĩa khoa học và triển vọng ứng dụng thực tiễn. Việc phân lập, tách chiết các gen kháng sâu từ các vi sinh vật bản địa và thiết kế tổng hợp các gen kháng sâu mới trên cơ sở các kết quả nghiên cứu ở trong nước và quốc tế là khởi đầu quan trọng, cho phép Việt Nam chủ động tạo được các giống đậu tương biến đổi gen kháng sâu đặc hiệu có tiềm năng thương mại, đóng góp cho sự phát triển nông thôn dựa trên nền tảng các công nghệ hiện đại.

**Lời cảm ơn:** Công trình được hoàn thành với sự hỗ trợ kinh phí của Đề tài "Nghiên cứu chọn tạo giống đậu tương kháng sâu" (2017-2020) thuộc chương trình Công nghệ sinh học nông nghiệp, Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Abdullah M, Sarnthoy O, Isichaiku S, Tantakom S (2001) Efficacy of cypermethrin, neem extract and *Bacillus thuringiensis* for controlling insect pests of vegetables soybean. <http://agris.fao.org/agrissearch/search.do?recordID=TH2005000374>.
- Asano S, Yamashita C, Iizuka T, Takeuchi K, Yamanaka S, Cerf D, Yamamoto T (2003) A strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *galleriae* containing a novel *cry8* gene highly toxic to *Anomala cuprea* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Biol Control* 28: 191-196.
- Balasubramanian P, Jayakumar R, Shambharkar P, Unnamalai N, Pandian SK, Kumaraswami NS, Ilangovan R, Sekar V (2002) Cloning and characterization of the crystal protein-encoding gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. *yunnanensis*. *Appl Environ Microbiol* 68: 408-411.
- Baoua I, Ba NM, Agunbiade TA, Margam V, Binsodabiré CL, Antoine S, Pittendrigh BR (2011) Potential use of *Sesbania pachycarpa* (Fabaceae: Papilionoideae) as a refugia for the legume pod borer *Maruca vitrata* (Lepidoptera: Crambidae). *Int J Trop Insect Sci* 31: 212-218.
- Barton K, Whitely H, Yang NS (1987) *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin expressed in transgenic *Nicotiana tabacum* provides resistance to Lepidopteran insects. *Plant Physiol* 85: 1103-1109.
- Bengyella L, Yekwa EL, Iftikhar S, Nawaz K, Jose RC, Fonmboh DJ, Tambo E, Roy P (2018). Global challenges faced by engineered *Bacillus thuringiensis* Cry genes in soybean (*Glycine max* L.) in the twenty-first century. *3 Biotech* 8(11): 464.
- Bernardi O, Malvestiti GS, Dourado PM, Oliveira WS, Martinelli S, Berger GU (2012) Assessment of the high-dose concept and level of control provided by MON 87701  $\times$  MON 89788 soybean against *Anticarsia gemmatalis* and *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. *Pest Manag Sci* 68: 1083-1091.
- Betz F, Hammond B, Fuchs R (2000) Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis* protected plants to control insect pests. *Regul Toxicol Pharmacol* 32: 156-173.
- Bravo A, Gill SS, Soberón M (2007) Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and

- their potential for insect control. *Toxicon* 49: 423-435.
- Carlson CR, Caugant DA and Kolsto AB (1994) Genotypic diversity among *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains. *Appl Environ Microbiol* 60: 1719-1725.
- Carlson CR, Kolsto AB (1993) A complete physical map of a *Bacillus thuringiensis* chromosome. *J Bacteriol* 175: 1053-1060.
- Carmona AA, Ibarra JE (1999) Expression and crystallization of a Cry3Aa–Cry1Ac chimerical protein of *Bacillus thuringiensis*. *World J Microbiol Biotechnol* 15: 455-463.
- Carozzi NB, Kramer VC, Warren GW, Evola S and Koziel M (1991) Prediction of insecticidal activity *Bacillus thuringiensis* strain by polymerase chain reaction product profiles. *Appl Environ Microbiol* 57: 353-356.
- Crickmore N, Zeigler DR, Schnepf E, van Rie J, Lereclus D, Baum J, Bravo A, Dean DH (2013) *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. [Http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil\\_Crickmore/Bt/](http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/).
- Chandra A, Ghosh P, Mandaokar AD, Bera AK, Sharma RP, Das S, Kumar PA (1999) Amino acid substitution in alphahelix 7 of Cry1Ac delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* leads to enhanced toxicity to *Helicoverpa armigera* Hubner. *FEBS Lett.* 458(2): 1759.
- Cục Chăn nuôi (2013) <http://cucchannuoi.gov.vn/>
- de Maagd RA, WeemenHendriks M, Stiekema W, Bosch D (2000) Domain III substitution in *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Cry1C domain III can function as a specific determinant for *Spodoptera exigua* in different, but not all, Cry1-Cry1C hybrids. *Appl Environ Microbiol* 66: 1559-1563.
- de Maagd RA, WeemenHendriks M, Molthoff JW, Naimov S (2003) Activity of wildtype and hybrid *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins against *Agrotis ipsilon*. *Arch Microbiol* 179(5): 363-367.
- Estruch JJ, Warren GW, Mullins MA, Nye GJ, Craig JA, Koziel MG (1996) Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 5389-5394.
- Fernandes AP, Bueno AF, Sosa-gómez DR (2015) *Helicoverpa armigera*: current status and future perspectives in Brazil. *Curr Agric Sci Technol* 21(1): 1-7.
- Fitt GP (1989) The ecology of *Heliothis* in relation to agroecosystems. *Annu Rev Entomol* 34: 17-52.
- Ge AZ, Rivers D, Milne R, Dean DH (1991) Functional domains of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: refinement of *Heliothis virescens* and *Trichoplusiani* specificity domains on Cry1A(c). *J Biol Chem* 266: 17954-17958.
- Grochulski P, Masson L, Borisova S, PusztaiCarey M, Schwartz JL, Brousseau R, and Cygler M (1995) *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation. *J Mol Biol* 254: 447-464.
- He J, Wang J, Yin W, Shao X, Zheng H, Li B, Zhao Y, Sun M, Wang S, Yu Z (2011) Complete genome sequence of *Bacillus thuringiensis* subsp. *chinensis* strain CT-43. *J Bacteriol* 193(13): 3407-3408.
- Hernández M P, Ferré J, Escriche B (2008) Susceptibility of *Spodoptera exigua* to 9 toxins from *Bacillus thuringiensis*. *J Invertebr Pathol* 97(3): 245-250.
- Höfte H, Whiteley HR (1989) Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol Rev* 53: 242-255.
- Huỳnh Thị Thu Huệ, Trần Thị Ngọc Diệp, Lê Thị Thu Hiền, Nông Văn Hải (2008) Thiết kế vector và kiểm tra biểu hiện của gen *cryIA(c)* trên lá cây thuốc lá *Nicotiana benthamiana*. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 6(4): 453-458.
- <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/productio n.pdf>
- <http://www.btnomenclature.info/>
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/genomes/486?>
- Ibargutxi MA, Muñoz D, Ruiz de Escudero I, Caballero P (2008) Interactions between Cry1Ac, Cry2Ab, and Cry1Fa *Bacillus thuringiensis* toxins in the cotton pests *Helicoverpa armigera* (Hübner) and *Earias insulana* (Boisduval). *Biol Control* 47: 89-96.
- ISAAA (2014) Global status of commercialized biotech/GM crops in 2014. ISAAA Brief No. 49. ISAAA: Ithaca, NY
- ISAAA (2017) Global status of commercialized biotech/GM crops in 2017: Biotech crop adoption



surges as economic benefits accumulate in 22 years. ISAAA Brief No. 53. ISAAA: Ithaca, NY.

ISAAA (2018) Global status of commercialized biotech/GM crops in 2018. ISAAA Brief No. 54. ISAAA: Ithaca, NY

Juarez-Perez VM, Ferrandis MD, Frutos R (1997) PCR-based approach for detection of novel *Bacillus thuringiensis* cry genes. *Appl Environ Microbiol* 63: 2997-3002.

Kalman S, Kiehne KL, Libs JL, Yamamoto T (1993) Cloning of a novel cryIC-type gene from a strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *galleriae*. *Appl Environ Microbiol* 59: 1131-1137.

Karel AK (1993) Effects of intercropping with maize on the incidence and damage caused by pod borers of common beans. *Environ Entomol* 22: 1076-1083.

Knowles BH, Dow JAT (1993) The crystal  $\delta$ -endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis*: modes of action on the insect gut. *BioEssays* 15: 469-476.

Kongsuwan K, Gough J, Kemp D, McDevitt A, Akhurst R (2005) Characterization of a new *Bacillus thuringiensis* endotoxin, Cry47Aa, from strains that are toxic to the Australian sheep blowfly, *Lucilia cuprina*. *FEMS Microbiol Lett* 252: 127-136.

Kumar S, Chandra A, Pandey KC (2008) *Bacillus thuringiensis* (Bt) transgenic crop: an environment friendly insectpest management strategy. *J Environ Biol* 29(5): 64-153.

Kuo WS, Chak KF (1996) Identification of novel cry-type genes from *Bacillus thuringiensis* strains on the basis of restriction fragment length polymorphism of the PCR-amplified DNA. *Appl Environ Microbiol* 62: 1369-1377.

Le Thi Minh Thanh, Nguyen Thi Hue, Ngo Dinh Binh, Tran Duy Quy (2012a) Expression and purification of Cry8Da recombinant protein against Coleopteran insects of *Bacillus thuringiensis* in *E. coli*. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ* 50 (3): 309-318.

Le Thi Minh Thanh, Pham Kieu Thuy, Asano Shinichiro, Hori Hidetaka, Donald Dean and Ngo Dinh Binh (2009) Characterization of *cry8Da* genes isolated from *Bacillus thuringiensis* strains in Viet Nam. Proceedings of the 3<sup>rd</sup> International Meeting for Development of IPM in Asia and Africa, Published by the University of Lampung Press, Indonesia 3: 186-192.

Le Thi Minh Thanh, Pham Kieu Thuy, Nguyen Anh Nguyet, Ngo Thi Tuyet Nhung, Nguyen Dinh Tuan, Ngo Dinh Binh (2008) Cloning and sequencing of gene encoding Cry8Da protein of *Bacillus thuringiensis* subsp. *galleriae* strains isolated from sugar cane farming soil in Vietnam. Proceedings of the 3<sup>rd</sup> International Meeting for Development of IPM in Asia and Africa, Science and Technics Publishing House, Vietnam, 2: 165-174.

Le Thi Minh Thanh, Tran Quoc Trong, Tran Duy Quy, Ngo Dinh Binh (2011) Construction of Tiplasmid vector containing *cry8Da* gene against Coleopteran insects from *Bacillus thuringiensis* strains isolated in Vietnam to transfer into plant. Proceedings of the 4<sup>th</sup> International Meeting for Development of IPM in Asia and Africa. Published by IPM Lab of Bangladesh Agricultural University, Mymensingh, Bangladesh 4: 87-91.

Le Thi Thu Hien, Lam Dai Nhan, Kieu Huu Anh, Nong Van Hai, Le Tran Binh (2002c) Construction of *Agrobacterium tumefaciens* strains carrying Bt pesticidal genes. *Advances in Natural Sciences* 3(2): 175-180.

Lee HK, Gill SS (1997) Molecular cloning and characterization of a novel mosquitocidal protein gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *fukuokaensis*. *Appl Environ Microbiol* 63: 4664-4670.

Lee MK, Walters FS, Hart H, Palekar N, Chen JS (2003) The mode of action of the *Bacillus thuringiensis* Vegetative Insecticidal Protein Vip3A differs from that of Cry1Ab  $\delta$  Endotoxin. *Appl Environ Microbiol* 69: 4648-4657.

Lê Thị Minh Thành, Nguyễn Thị Thanh Hạnh, Nguyễn Thị Ánh Nguyệt, Nguyễn Đình Tuấn, Phạm Kiều Thúy, Ngô Đình Bình (2005) Nghiên cứu sự phân bố và đa dạng gen của vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* phân lập ở một số tỉnh thuộc vùng Đông Bắc Bộ. *Tạp chí Di truyền học và Ứng dụng*, 4: 29-34.

Lê Thị Minh Thành, Phạm Thị Vân, Chu Hoàng Hà, Trần Duy Quý, Ngô Đình Bình (2012b) Tạo cây thuốc lá chuyển gen mang gen kháng côn trùng bộ Cánh cứng *cry8Da* bằng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn* 188(5): 15-19.

Lê Thị Thu Hiền, Đinh Duy Kháng, Lê Trần Bình, Nông Văn Hải (2002a) Thiết kế vector mang gen độc tố *cryIA(c)* dưới sự điều khiển của đoạn khởi động

- của gen tổng hợp đường phân lập từ giống lúa C71. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ* 40: 135-141.
- Lê Thị Thu Hiền, Trịnh Công Sự, Trần Thị Phương Liên, Phạm Bích Ngọc, Đinh Duy Kháng, Nông Văn Hải, Lê Trần Bình (2002b) Thiết kế vector và biểu hiện gen mã hóa protein độc tố *cryIA(c)* có nguồn gốc từ vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* bằng vi khuẩn *Escherichia coli*. *Tạp chí Sinh học* 24(3): 39-46.
- Li J, Carroll J, Ellar DJ (1991) Crystal structure of insectidal  $\delta$ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis*. *Nature* 25: 353-815.
- Li Q, Xu LZ, Zou T, Ai P, Huang GH, Li P, Zheng AP (2015) Complete genome sequence of *Bacillus thuringiensis* strain HD521. *Stand Genomic Sci* 10: 62.
- Lin Y, Fang G, Peng K (2007) Characterization of the highly variable cry gene regions of *Bacillus thuringiensis* strain ly4a3 by PCR-SSCP profiling and sequencing. *Biotechnol Lett* 29: 247-251.
- Liu G, Song L, Shu C, Wang P, Deng C, Peng Q, Lereclus D, Wang X, Huang D, Zhang J, Song F (2013) Complete genome sequence of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* strain HD73. *Genome Announc* 1(2): e0008013.
- Macrae TC, Baur ME, Boethel DJ, Fitzpatrick BJ, Gao AG, Gamundi JC (2005) Laboratory and field evaluations of transgenic soybean exhibiting high-dose expression of a synthetic *Bacillus thuringiensis* cry1A gene for control of Lepidoptera. *J Econ Entomol* 98: 577-587.
- Marques LH, Santos AC, Castro BA, Moscardini VF, Rossetto J, Silva OAN (2017) Field evaluation of soybean transgenic event DAS-81419-2 expressing Cry1F and Cry1Ac proteins for the control of secondary lepidopteran pests in Brazil. *Crop Prot* 96: 109-115.
- Masson L, Moar WJ, van Frankenhuyzen K, Bosse M, Brousseau R (1992) Insecticidal properties of a crystal protein gene product isolated from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kenyae*. *Appl Environ Microbiol* 58: 642-646.
- McLinden JH, Sabourin JR, Clark BD, Gensler DR, Workman WE, Dean DH (1985) Cloning and expression of an insecticidal k-73 type crystal protein gene from *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* into *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 50: 623-628.
- Ngo Dinh Binh, Nguyen Dinh Tuan, Trinh Thi Thu Ha, Le Thi Minh Thanh, Vu Thi Nhung, Nguyen Thi Anh Nguyet, Pham Kieu Thuy, Ohba Michio, Bando Hisanori, Hori Hidetaka (2008) Screening, evaluation and exploiting of insecticidal genes of *Bacillus thuringiensis* of Vietnam. Proceedings of the 3<sup>rd</sup> International Meeting for Development of IPM in Asia and Africa, Science and Technics Publishing House, Vietnam, 2: 347-353.
- Ngô Đình Bình, Lê Thị Minh Thành, Trịnh Thị Thu Hà, Phạm Kiều Thúy, Phạm Minh Hương, Nguyễn Thị Luy, Lê Thị Hồng Nhung, Đặng Văn Tiến (2010) 35 năm nghiên cứu và phát triển thuốc trừ sâu sinh học *Bacillus thuringiensis* tại Việt Nam. Hội nghị Khoa Học kỷ niệm 35 năm thành lập Việt Khoa Học và Công nghệ Việt Nam 1975 – 2010, Nhà xuất bản Khoa Học tự nhiên và Công nghệ: 288-300.
- Nguyen Thi Hoa, Tang Thi Chinh, Dang Thi Mai Anh, Ngo Dinh Binh, Le Thi Minh Thanh (2014) Optimization of fermentation medium compositions from dewatered wastewater sludge of beer manufactory for *Bacillus thuringiensis* delta endotoxin production. *AJAF* 2(5): 219-225.
- Nguyễn Văn Đồng, Nguyễn Anh Vũ (2013a) Phân lập và thiết kế vector biểu hiện gen liên quan đến khả năng chịu hạn *GmMyb* ở đậu tương. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ nông nghiệp Việt Nam* 2(41): 49-54.
- Nguyễn Văn Đồng, Nguyễn Anh Vũ, Nguyễn Hữu Kiên, Dương Tuấn Bảo (2013b) Nghiên cứu biến nạp gen liên quan đến khả năng kháng hạn và thuốc trừ cỏ vào giống đậu tương ĐT22. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn* (11): 03-09.
- Nguyễn Văn Đồng, Phạm Thị Lý Thu, Tam Kim Nhung, Trịnh Thị Minh Thủy, Hà Văn Chiến, Lê Thanh Nga, Lê Thị Thu Vê, Lê Thị Thu Hiền, Nông Văn Hải, Lê Huy Hàm (2010a) Kết quả bước đầu trong nghiên cứu chuyển gen kháng sâu *cryIA(c)* vào phiôi non các dòng ngô mô hình. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 8(2): 173-180.
- Nguyễn Văn Đồng, Phạm Thị Lý Thu, Trần Minh Thu, Lê Thanh Nga, Lê Thị Thu Vê, Lê Huy Hàm, Lê Thị Thu Hiền (2010b) Nghiên cứu khả năng tiếp nhận gen kháng sâu *cryIA(c)* thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* của một số dòng ngô Việt Nam. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam* 6(19): 36-41.
- Oatman ER (1967) An ecological study of the lima-bean pod borer, *Etiella zinckenella* (Lepidoptera:

- Phycitidae), in Southern California. *Ann Entomol Soc Am* 60(3): 552-555.
- Oerke EC (2006) Crop losses to pests. *J Agric Sci* 144(1): 31-43.
- Onstad DW, Kang J, Ba NM, Dabire C, Pittendrigh BR (2012) Modeling evolution of resistance by *Maruca vitrata* (Lepidoptera: Crambidae) to transgenic insecticidal cowpea in Africa. *Environ Entomol* 41(5): 1255-1267.
- Palma L, Hernández-Rodríguez CS, Maeztu M, Hernández-Martínez P, Ruiz de Escudero I, Escriche B, Muñoz D, Van Rie J, Ferré J, Caballero P (2012) Vip3C, a novel class of Vegetative Insecticidal Proteins from *Bacillus thuringiensis*. *Appl Environ Microbiol* 78(19): 716-735.
- Palma L, Muñoz D, Berry C, Murillo J, Caballero P (2014) Draft genome sequences of two *Bacillus thuringiensis* strains and characterization of a putative 41.9-kDa insecticidal toxin. *Toxins* 6: 1490-1504.
- Panbangred W, Panjaisee S, Tantimavanich S (2000) Expression of the mosquitocidal *cryIVB* gene under the control of different promoters in *Bacillus sphaericus* 2362 and acrySTALLIFEROUS *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* c4Q272. *World J Microbiol Biotechnol* 16: 163-169.
- Park HW, Federici BA (2004) Effect of specific mutations in helix  $\alpha 7$  of domain I on the stability and crystallization of Cry3A in *Bacillus thuringiensis*. *Mol Biotechnol* 27(2): 89-100.
- Permana AD, Johari A, Putra RE, Sastrodihardjo S, Ahmad I (2012) The influence of trichome characters of soybean (*Glycine max* Merrill) on oviposition preference of soybean pod borer *Etiella zinckenella* Treitschke (Lepidoptera: Pyralidae) in Indonesia. *J Entomol Nematol* 4(3): 15-21.
- Porcar M, Caballero P (2000) Molecular and insecticidal characterization of a *Bacillus thuringiensis* strain isolated during a natural epizootic. *J Appl Microbiol* 89(2): 309-316.
- Qin D, Liu X, Miceli C, Zang Q, Wang P (2019) Soybean plants expressing the *Bacillus thuringiensis* cry8-like gene show resistance to *Holotrichia parallela*. *BMC Biotechnol* 19(1): 66.
- Rahayu M, Bande LOS, Hasan A, Yuswana A, Rinambo F (2018) Contribution of pod borer pests to soybean crop production (case in Pondidaha, Konawe District, Southeast Sulawesi). *IOP Conf Ser.: Earth Environ Sci* 122: 012-039.
- Rajamohan F, Cotrill JA, Gould F, Dean DH (1996) Role of domain II, loop 2 residues of *Bt* CryIAb  $\delta$ -endotoxin in reversible and irreversible binding to *Manduca sexta* and *Heliothis virescens*. *J Biol Chem* 271: 2390-2397.
- Rang C, Vachon V, de Maagd RA, Villalon M, Schwartz JL, Bosch D, Frutos R, Laprade R (1999) Interaction between functional domains of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins. *Appl Environ Microbiol* 65(7): 2918-2925.
- Rodrigues-Silva N, Canuto AF, Oliveira DF, Teixeira AF, Santos-Amaya OF, Picanco MC, Pereira EJG (2019) Negative cross-resistance between structurally different *Bacillus thuringiensis* toxins may favor resistance management of soybean looper in transgenic *Bt* cultivars. *Sci Rep* 9: 199. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35965-5>.
- Rogers DJ, Brier HB (2010) Pest-damage relationships for *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) on vegetative soybean. *Crop Prot* 29: 39-46.
- Ronald BH, Michel A, Easley JB (2009) Soybean aphid. Agriculture and natural resources factsheet. [https://aginsects.osu.edu/sites/aginsects/files/imce/EN\\_T\\_37\\_14%20soybean%20aphid.pdf](https://aginsects.osu.edu/sites/aginsects/files/imce/EN_T_37_14%20soybean%20aphid.pdf)
- Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, Lereclus D, Baum JR, Feitelson J (1998) *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev* 62: 705-806.
- Schnepf HE, Whiteley HR (1981) Cloning and expression of the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 2893-2897.
- Sharma HC (1998) Bionomics, host plant resistance, and management of the legume pod borer, *Maruca vitrata* - a review. *Crop Prot* 17: 373-386.
- Sharma P, Nain V, Lakhanpal S, Kumar PA (2010) Synergistic activity between *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab and Cry1Ac toxins against maize stem borer (*Chilo partellus* Swinhoe). *Lett Appl Microbiol* 51: 42-47.
- Sheppard AE, Poehlein A, Rosenstiel P, Liesegang H, Schulenburg H (2013) Complete genome

- sequence of *Bacillus thuringiensis* strain 407 Cry-. *Genome Announc* 1(1): e00158-12.
- Shirin B, Katharina EL, Jakob L (2003) Genetically modified (GM) crops: molecular and regulatory details. *The BATSreport 2003 on genetically modified crops*, version 2: 1192.
- Srinivasan R, Su FC, Huang CC, Lin M, Hsu Y (2009) Integrated pest management in organic vegetable soybean production. *Conference on International Research on Food Security, Natural Resource Management and Rural Development. University of Hamburg*.
- Stacke RF, Arnemann JA, Rogers J, Stacke RS, Strahl TT, Perini CR, Dossin MF, Pozebon H, Cavallin LA, Guedes JVC (2018) Damage assessment of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in soybean reproductive stages. *Crop Prot* 112: 10-17.
- Strizhov N, Keller M, KonczKálmán Z, Regev A, Sneh B, Schell J, Koncz C, Zilberstein A (1997) Mapping of the entomocidal fragment of Spodopteraspecific *Bacillus thuringiensis* toxin CryIC. *Mol Gen Genet* 53(6): 777.
- Taghizadeh R, Talebi A, Fathipour Y, Khalghani J (2012) Effect of ten soybean cultivars on development and reproduction of lima bean pod borer, *Etiella zinckenella* (Lepidoptera: Pyralidae) under laboratory conditions. *Appl Ent Phytopath* 79: 15-28.
- Tilmon KJ, Hodgson EW, O'Neal ME, Ragsdale (2011) Biology of the Soybean Aphid, *Aphis glycines* (Hemiptera: Aphididae) in the United States. *J Integr Pest Manag* 2(2): A1-A7.
- Thompson IP, Lilley AK, Ellis RJ, Bramwell PA, Bailey MJ (1995) Survival, colonization and dispersal of a genetically modified *Pseudomonas fluorescens* (SBW25) in the phytosphere of field grown sugar beet. *Biotechnology* 13: 1493-1497.
- Traore F, Dabire-Binso CL, Ba NM, Antoine S, Pittendrigh BR (2013) Feeding preferences of the legume pod borer *Maruca vitrata* (Lepidoptera: Crambidae) larvae and suitability of different flower parts for larval development. *Int J Trop Insect Sci* 33: 107-113.
- Trần Thị Cúc Hòa, Nguyễn Trần Hải Bằng, Trần Thanh Hải, Hồ Thị Huỳnh Như, Hà Minh Luân, Nguyễn Quang Vinh, Trần Như Ngọc, Võ Thị Kiều Trang, Đoàn Thị Mến, Phạm Thị Hương, Nguyễn Đức Cường (2013) Nghiên cứu chọn tạo các giống đậu tương chuyên gen kháng ruồi đục thân và sâu đục quả. *Hội thảo Quốc gia về Khoa học cây trồng lần thứ nhất*, 441-449.
- Trần Thị Ngọc Diệp, Huỳnh Thị Thu Huệ, Kim Thị Phương Oanh, Lê Thị Thu Hiền, Nông Văn Hải (2010) Modification of vip3A gene to improve its expression in plants. *Tạp chí Công nghệ sinh học* 8(3): 309-316.
- Tổng cục thống kê (2018) <https://www.gso.gov.vn/>
- Van Den Berg H, Shepard BM, Nasikin (1998b) Damage incidence by *Etiella zinckenella* in soybean in East Java, Indonesia. *J Integr Pest Manag* 44(3): 153-159.
- Van Den Berg, Shepard BM, Nasikin (1998a) Response of soybean to attack by stemfly *Melagagromyza soifae* in farmers' fields in Indonesia. *J Appl Ecol* 35: 514-522.
- Võ Thị Thù, Nguyễn Thị Hoa, Raj Bhatnagar (2000) Tách dòng và biểu hiện gen mã hoá protein diệt ấu trùng muỗi từ chủng *Bacillus thuringiensis israelensis* phân lập ở Việt Nam. Hội nghị sinh học quốc gia: Những vấn đề nghiên cứu cơ bản trong sinh học: Báo cáo khoa học, 167-171.
- Walker DR, John NA, McPherson RM, Parrott WP, Boerma HR (2000) Field evaluation of soybean engineered with a synthetic cry1Ac transgene for resistance to corn earworm, soybean looper, velvetbean caterpillar (Lepidoptera: Noctuidae), and lesser cornstalk borer (Lepidoptera: Pyralidae). *J Econ Entomol* 93(3): 613-622.
- Wolfersberger (1996) Sitedirected mutations in the third domain of *Bacillus thuringiensis* deltaendotoxin CryIAa affect its ability to increase the permeability of *Bombyx mori* midgut brush border membrane vesicles. *Appl Environ Microbiol* 62(1): 279-282.
- Yamaguchi T, Sahara K, Bando H, Asano (2008) Discovery of a novel *Bacillus thuringiensis* Cry8D protein and the unique toxicity of the Cry8D class proteins against scarab beetles. *J Invertebr Pathol* 99(3): 257-262.

## RESEARCH AND DEVELOPMENT OF GENETICALLY ENGINEERED SOYBEAN USING INSECT-RESISTANCE GENES DERIVED FROM *Bacillus thuringiensis*

Le Thi Thu Hien<sup>1,2</sup>, Pham Le Bich Hang<sup>1</sup>, Nguyen Tuong Van<sup>3</sup>, Le Thi Minh Thanh<sup>3</sup>, Dao Thi Hang<sup>4</sup>, Nguyen Hai Ha<sup>1,2</sup>, Ha Hong Hanh<sup>1</sup>, Huynh Thi Thu Hue<sup>1,2</sup>, Nguyen Nhat Linh<sup>1</sup>, Nguyen Thi Thanh Hoa<sup>1</sup>, Dinh Thuy Hang<sup>5</sup>, Nguyen Van Dong<sup>6</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Genome Research, Vietnam Academy of Science and Technology*

<sup>2</sup>*Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology*

<sup>3</sup>*Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology*

<sup>4</sup>*Plant Protection Research Institute, Vietnam Academy of Agricultural Sciences*

<sup>5</sup>*Institute of Microbiology and Biotechnology, Vietnam National University, Hanoi*

<sup>6</sup>*Agricultural Genetics Institute, Vietnam Academy of Agricultural Sciences*

### SUMMARY

Soybean (*Glycine max*) is one of the crops which have high economic value and serve for food, feed and process of many countries around the world. However, there are many factors affecting the productivity of soybean, of which insect pests and diseases are the most harmful agents. Therefore, an application of biotechnology to transfer insect resistance genes derived from a species of bacteria *Bacillus thuringiensis* can contribute to increase soybean yield and significantly reducing pesticide use. Currently, there are many insecticidal proteins detected from *B. thuringiensis* such as Cry, Cyt and Vip with a broad and specific spectrum belonged to several orders Lepidoptera, Diptera, Coleoptera, Homoptera, and Nematoda. Numerous studies have been implemented over the world to transfer genes encoding these proteins in combination or modified forms to increase their toxicity. Several events of genetically engineered soybean with stacked traits of insect resistance and herbicide tolerance are commercialized and approved to be cultured in many countries such as MON 87701 × MON 89788 or DAS-81419-2. In Vietnam, studies on genetically engineered soybean with insect resistance trait has been carried out. Moreover, the exploitation, screening and selection of high biodiversity and indigenous *B. thuringiensis* strains which harbors specific genes capable of killing targeted insects and serve as materials for plant transformation are great scientific meaning and potential practical application. This will be an important source of materials to create many soybean cultivars with good ability of insect resistance in order to meet specific needs.

**Keywords:** *Bacillus thuringiensis*, genetically engineered crop, soybean, insecticidal protein, insect-resistance gene