BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM TP. HCM

DƯƠNG KIM HÀ

NGHIÊN CỨU SỰ ĐA DẠNG VÀ ĐỘC TÍNH CỦA VI KHUẨN *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* TRÊN SÂU ĂN LÁ HẠI RAU Ở VIỆT NAM

Chuyên ngành: **Bảo vệ thực vật**
Mã số: **9.62.01.12**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ BẢO VỆ THỰC VẬT

TP. HCM – Năm 2022

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM TP.HCM

NGHIÊN CỨU SỰ ĐA DẠNG VÀ ĐỘC TÍNH CỦA VI KHUẨN *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* TRÊN SÂU ĂN LÁ HẠI RAU Ở VIỆT NAM

Chuyên ngành: **Bảo vệ thực vật**
Mã số: **9.62.01.12**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ BẢO VỆ THỰC VẬT

Người hướng dẫn khoa học: PGS. TS. Lê Đình Đôn

TP. HCM – Năm 2022

LỜI CAM ĐOAN

Tôi cam đoan những công bố trong luận án này là trung thực và là một phần trong đề tài thuộc Chương trình Khoa học và công nghệ cấp thành phố do PGS. TS. Lê Đình Đôn làm chủ nhiệm. Những số liệu trong luận án được phép công bố với sự đồng ý của chủ nhiệm đề tài.

NGHIÊN CỨU SINH

DƯƠNG KIM HÀ

LỜI CẢM ƠN

Tôi trân trọng biết ơn:

PGS.TS. Lê Đình Đôn đã tận tình hướng dẫn tôi trong suốt quá trình thực hiện luận án tốt nghiệp.

TS. Võ Thị Thu Oanh, TS. Lê Thị Diệu Trang, TS. Lê Khắc Hoàng, TS. Đinh Minh Hiệp, TS. Nguyễn Vũ Phong, PGS.TS. Nguyễn Bảo Quốc, TS. Từ Thị Mỹ Thuận đã hướng dẫn thực hiện các chuyên đề trong luận án.

Ngoài ra, tôi xin chân thành cảm ơn Ban Giám Hiệu, Quý Thầy, Cô Phòng Đào tạo Sau Đại học, Ban chủ nhiệm Khoa Nông học, Ban Lãnh đạo Viện Nghiên cứu Công nghệ sinh học và Môi trường, Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh đã tạo điều kiện và giúp đỡ tôi thực hiện các thí nghiệm; Sở Khoa học và Công nghệ Thành phố Hồ Chí Minh đã cung cấp một phần nguồn kinh phí để tôi thực hiện nghiên cứu này; bên cạnh đó, TS. Boonhiang Promdonkoy (BIOTEC Thái Lan) cũng đã cung cấp một số mẫu vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* và primer vip3a cho việc nghiên cứu được hoàn thiện hơn.

Thêm vào đó, tôi xin cám ơn, Ban Lãnh Đạo và các anh, chị đồng nghiệp công tác tại Chi cục Trồng trọt và Bảo vệ thực vật; Trung tâm Giống cây trồng, vật nuôi và thủy sản Thành phố Hồ Chí Minh; Các anh chị Nghiên cứu sinh khóa 2013, khóa 2014 đã hỗ trợ, giúp đỡ trong suốt quá trình học tập và thực hiện luận án. Cảm ơn các em: Trương Phước Thiên Hoàng, Đào Uyên Trân Đa, Nguyễn Khoa Thảo, Trần Thị Kim Oanh, Trần Thị Hồng Nhung, Đỗ Minh Thân, Danh Thiệt Dal, Kiến Minh Mẫn, Lê Hoàng Phúc, Phạm Xuân Hài, Nguyễn Mai Nghiệp, … đã nhiệt tình giúp đỡ và hỗ trợ thực hiện một số nội dung nghiên cứu.

Cuối cùng xin gửi lời biết ơn chân thành đến gia đình đã giúp đỡ và động viên tôi trong suốt quá trình học tập và thực hiện luận án.

NGHIÊN CỨU SINH

TÓM TẮT

Bacillus thuringiensis là vi khuẩn sản sinh độc tố dưới dạng protein chuyên biệt cho các loại côn trùng gây hại, nhưng không ảnh hưởng đến con người, động vật hữu nhũ, và môi trường sống. *Bacillus thuringiensis* có hiệu quả diệt sâu chậm, phổ ký chủ hẹp, thời gian hiệu lực ngắn, chúng lại dễ bị ức chế bởi tia UV nên cần có những yêu cầu cao về công nghệ sản xuất và kỹ thuật sử dụng. Hiện nay, với xu hướng áp dụng tiêu chuẩn sản xuất nông nghiệp tốt (GAP – Good Agriculture Practices), việc phát triển cũng như sử dụng *Bacillus thuringiensis* một cách phổ biến có thể mang lại những ưu điểm vượt trội, đặc biệt không gây hại đến môi trường, đồng thời; quốc tế hóa thị trường nông sản an toàn. Vì vậy, luận án **"Nghiên cứu sự đa dạng và độc tính của vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* trên sâu ăn lá hại rau ở Việt Nam "** được thực hiện từ năm 2015 đến năm 2021.

Mục tiêu nghiên cứu nhằm xác định sự phân bố của vi khuẩn *B. thuringiensis* ở một số tỉnh, thành tại Việt Nam; lập bộ mẫu vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* có độc tính cao làm nguồn vật liệu sản xuất chế phẩm sinh học; xác định điều kiện lên men tự động vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki;* đánh giá hiệu quả gây chết sâu trên thực nghiệm. Nghiên cứu được thực hiện với các phương pháp nghiên cứu vi sinh, hóa sinh, kỹ thuật sinh học phân tử và thực nghiệm trên đồng ruộng.

Nghiên cứu đã tiến hành thu 616 mẫu đất tập trung ở các khu vực đất canh tác, đất không canh tác, rừng bảo tồn, ven đường ở 22 tỉnh, thành. Kết quả đã phân lập được 1.337 khuẩn lạc có hình thái khác nhau, xác định có 261 chủng sinh tinh thể với sự xuất hiện của đoạn gen *cry1, cry2, cry4*, *cry9* có tỉ lệ tương đồng từ 93 - 100% trên GenBank và có 5 chủng xuất hiện gen mã hóa protein *vip3a*. Xác định 3 chủng vi khuẩn VBt21110.1, VBt26310.1 và VBt2751 chịu được tia UV sau 120

phút xử lý, các chủng vi khuẩn này có tiềm năng phát triển thuốc trừ sâu sinh học sử dụng trong nông nghiệp. Kết quả thí nghiệm vớisâu tơ trên cây cải ngoài đồng ruộng tại Thành phố Hồ Chí Minh cho thấy sản phẩm VBt đạt hiệu lực diệt sâu tơ 79,6%.

Với môi trường dịch chiết nấm men, phương pháp đáp ứng bề mặt – cấu trúc tại tâm đã xác định điều kiện tối ưu cho sự lên men của vi khuẩn cao nhất với thời gian là 49,5 giờ, pH 7,5 và nhiệt độ ở 27°C thu được mật độ vi khuẩn *B. thuringiensis* 9,1 x 10^8 CFU/mL (8,961 (log CFU/mL)). Chế phẩm VBt bảo quản ở điều kiện nhiệt độ 4°C, 25°Ctrong thời gian 1 – 6 tháng hay 35°C trong 3 tháng mật độ vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* giảm không đáng kể.

Kết quả nghiên cứu của luận án đã cung cấp những thông tin về sự phân bố và tính đa dạng di truyền của vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* ở các vùng sinh thái của Việt Nam; xác định được gen độc tính *cry*, *vip3a* đối với sâu khoang (*Spodoptera litura),* sâu tơ *(Plutella xyslotella),* sâu xanh da láng (*Spodoptera exigua);* xác định được điều kiện lên men tự động cho việc gia tăng mật số vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki.* Có thể sử dụng các chủng vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* phát hiện để chuyển nạp gen *cry* vào cây ký chủ nhằm nâng cao khả năng phòng trị sâu ăn lá.

Từ khóa: *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki,* chế phẩm VBt, sâu khoang (*Spodoptera litura*), sâu tơ (*Plutella xylostella*), sâu xanh da láng (*Spodoptera exigua*).

SUMMARY

Bacillus thuringiensis is a bacterium that produces a toxin in the form of a protein specific to insect pests, but has little to no effect on humans, mammals, and the environment. *Bacillus thuringiensis* has a slow killing effect, a narrow host spectrum, a short potency, and is easily inhibited by UV rays, so it requires advanced production technology and application technique. Currently, with the trend of Good Agriculture Practices - GAP, the widespread development and application of *Bacillus thuringiensis* products can bring significant advantages in reducing environmental pollution, and internationalizing the safe agricultural product market. Therefore, the thesis "The study on diversity and toxicity of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* on pest larvae of leafy vegetables in Vietnam" was conducted from 2015 to 2021.

The research objective was to determine the distribution of *B. thuringiensis* in some provinces and cities in Vietnam; establish sample collection of *B. thuringiensis* var. *kurstaki* with high toxicity as a source of raw materials for the production of biological products; determination of automatic fermentation conditions of *B. thuringiensis var. kurstaki*; evaluating pesticide efficacy in practice. The study was perform using research methods of microbiology, biochemistry, molecular biology techniques and testing field application.

A total of 616 samples of soil in 22 provinces and cities, specialised on agricultural lands, non-agricultural lands, conservation forests and roadsides, were used for isolation. 1,337 morphologically different colonies of the *Bacillus* genus have been isolated, of which 261 crystalline isolates were identified carrying *cry1, cry2, cry4, cry9* genes with the similarity rate from 93 to 100% according to GenBank and 5 isolates carried gene encoding *vip3a* protein. 3 isolates, designated

VBt21110.1, VBt26310.1, and VBt2751, showed tolerance to UV light at 120 minutes of exposure. These three bacterial isolates are potential candidates to be developed into biopesticide for agricultural use. Results of field experiments on broccoli plants in Ho Chi Minh city showed the pesticide efficacy of inoculant and liquid biopesticide VBt to be 79.6%.

With the use of yeast extract medium, response surface method at the center determined the optimal fermentation conditions for the highest bacterial concentration to be 49,5 hours, at pH 7,5 and temperature 27°C,producing a bacterial concentration 9.1 x 108 CFU/mL (8,961 (log CFU/mL)). The biopesticide VBt showed no significant reduction of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* concentration when stored at temperatures of 4°C, 25°C for 1 - 6 months or 35°C for 3 months.

The research results of the thesis have provided information on the distribution and genetic diversity of *B. thuringiensis* var. *kurstaki* in ecoregions of Vietnam; determined the toxicity genes *cry*, *vip3a* for beet armyworm (*Spodoptera litura*), diamondback moth (*Plutella xyslotella*), armyworm (*Spodoptera exigua*); determined automatic fermentation conditions for the production of *B. thuringiensis* var. *kurstaki*. It is possible to use the discovered strains of *B. thuringiensis* var. *kurstaki* to transfer the *cry* gene into the host plants to improve their resistance to pest larvae.

Keywords: *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*, diamondback moth (*Plutella xyslotella*), beet armyworm (*Spodoptera litura*), armyworm (*Spodoptera exigua*) biopesticide VBt.

MỤC LỤC

Chương **Trang**

Trang phụ bìa

Lời cam đoan i

Lời cảm ơn ii

Tóm tắt iii

Summary v

Mục lục vii

Danh mục các ký hiệu, các chữ viết tắt xiv

Danh mục các bảng xvi

Danh mục các hình và đồ thị xxi

MỞ ĐẦU 1

1. Tính cấp thiết 1

2. Mục tiêu nghiên cứu.....3

3. Đối tượng và phạm vi nghiên cứu 3

3.1 Đối tượng nghiên cứu.....3

3.2 Phạm vi nghiên cứu.....3

4. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài nghiên cứu.....4

4.1 Ý nghĩa khoa học 4

4.2 Ý nghĩa thực tiễn 4

4.3 Những đóng góp mới của nghiên cứu 4

Chương 1 TỔNG QUAN TÀI LIỆU.....5

1.1 Sự phân bố và đa dạng quần thể của vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* 5

1.1.1 Phân loại vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* 6

1.1.2 Đặc điểm hình thái và sinh hóa của vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* 6

1.1.3 Các nghiên cứu trong và ngoài nước về sự phân bố, đa dạng di truyền

của vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* 8
1.2 Độc tố gây hại côn trùng của vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* 12
1.2.1 Phân loại độc tố của vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* 12
1.2.2 Gen *cry* của vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* 13
1.2.3 Gen *cyt* của vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* 17
1.2.4 Protein vip của vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* 17
1.2.5 Cơ chế tác động của *Bacillus thuringiensis* đối với côn trùng 19
1.2.6 Các nghiên cứu về *Bacillus thuringiensis* trong và ngoài nước 20
1.2.6.1 Nghiên cứu về gen *cry* 20
1.2.6.2 Nghiên cứu về khả năng chống chịu tia UV 21
1.2.7 Các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình nhân sinh khối vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* 22
1.3 Ứng dụng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* trong sản xuất nông nghiệp .24
1.3.1 Thuốc bảo vệ thực vật nguồn gốc *Bacillus thuringiensis* 25
1.3.2 Cây trồng chuyển gen vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* 28
Chương 2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU 30
2.1 Nội dung nghiên cứu …….. ….....30
2.1.1 Sự phân bố của vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* và đa dạng quần thể *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* từ các tỉnh, thành ở Việt Nam.....30
2.1.2 Đánh giá độc tính của các chủng *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* trên sâu ăn lá 30
2.1.2.1 Đánh giá khả năng gây chết của các chủng *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* trên sâu ăn lá bộ cánh vảy 30
2.1.2.2 Chọn lọc chủng *B. thuringiensis* var. *kurstaki* kháng tia UV và tối ưu điều kiện sản xuất chế phẩm VBt 30
2.1.2.3 Đánh giá hiệu quả trừ sâu ăn lá của chế phẩm VBt điều kiện nhà lưới và ngoài đồng ruộng.....30

2.2 Thời gian và địa điểm 31
2.2.1 Thời gian 31
2.2.2 Địa điểm 31
2.3 Vật liệu nghiên cứu 31
2.3.1 Hóa chất thí nghiệm 31
2.3.2 Nguồn sâu 32
2.4 Phương pháp nghiên cứu 32
2.4.1 Sự phân bố của của vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* và chọn lọc vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* trong đất từ các tỉnh, thành 32
2.4.1.1 Phương pháp thu thập mẫu đất 32
2.4.1.2 Phương pháp đặt tên mẫu đất và chủng vi khuẩn (mã mẫu) 33
2.4.1.3 Phương pháp chuẩn bị môi trường phân lập mẫu đất 33
2.4.1.4 Phân lập mẫu vi khuẩn 33
2.4.1.5 Định danh vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* bằng thử nghiệm hóa sinh ... 34
2.4.1.6 Phương pháp tăng sinh khối vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* 35
2.4.1.7 Phương pháp bảo quản giống vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* 35
2.4.2 Khuếch đại trình tự 16S-rDNA và gen *cry* của các chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* 36
2.4.2.1 Ly trích DNA 36
2.4.2.2 PCR 36
2.4.2.3 Điện di trên gel agarose và đọc kết quả sản phẩm PCR 37
2.4.3 Xác định sự hiện diện protein vip3a của vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* 37
2.4.3.1 PCR phát hiện gen *vip3a* 37
2.4.3.2 Phương pháp phân lập protein Vip3a 38
2.4.4 Đánh giá độc tính của các mẫu phân lập *Bacillus thuringiensis* var. *kurstak*i sâu tơ (*Plutella xylostella*), sâu khoang (*Spodoptera litura*), sâu

xanh da láng (*Spodoptera exigua*) trong điều kiện phòng thí nghiệm 39
2.4.5 Xác định giá trị LC_{50}, LT_{50} của các chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* var. *kurstak*i 40
2.4.5.1 Xác định giá trị LC_{50} 40
2.4.5.2 Xác định giá trị LT_{50} 40
2.4.6 Chọn lọc chủng *Bacillus thuringiensis* var. *kusrtaki* chống chịu tia UV (Ultraviolet) 41
2.4.6.1 Khảo sát khả năng chống chịu tia UV của các chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* var. *kusrtaki* ở hai bước sóng 254 nm và 365 nm 41
2.4.6.2 Đánh giá hiệu quả gây chết sâu của các chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* var. *kurstak*i có khả năng chống chịu tia UV trong điều kiện phòng thí nghiệm 41
2.4.7 Tối ưu điều kiện lên men của vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* var. *kusrtaki* 42
2.4.7.1 Xác định môi trường dinh dưỡng phù hợp nhân sinh khối vi khuẩn 42
2.4.7.2 Khảo sát các điều kiện nhân sinh khối vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* var. *kurstak*i 43
2.4.7.3 Tối ưu hóa các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng tăng sinh khối của vi khuẩn bằng phương pháp quy hoạch thực nghiệm 43
2.4.7.4 Đánh giá hiệu quả gây chết sâu khi kết hợp của các chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* 44
2.4.7.5 Khảo sát mức nhiệt độ bảo quản chế phẩm VBt 45
2.4.8 Khảo sát khả năng tăng sinh vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* bằng hệ thống lên men tự động 2 lít BioFlo 120 45
2.4.9 Đánh giá độc tính của chế phẩm VBt trên trên sâu tơ (*Plutella xylostella)*, sâu khoang (*Spodoptera litura)*, sâu xanh da láng (*Spodoptera exigua)* trong điều kiện nhà lưới 46

2.4.10 Đánh giá độc tính của chế phẩm VBt trên sâu tơ ngoài đồng ruộng 47
2.5 Xử lý và phân tích số liệu 47
Chương 3 KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU 49
3.1 Phân bố vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* và chọn lọc vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* trong đất ở các tỉnh, thành Việt Nam 49
3.1.1 Phân bố vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* 49
3.1.2 Xác định chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* bằng thử nghiệm sinh hóa.....51
3.2 Xác định sự hiện diện gen *cry* của vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* 56
3.3 Xác định sự hiện diện gen *vip3a* của vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* 65
3.4 Khả năng gây chết sâu tơ (*Plutella xylostella*), sâu khoang (*Spodoptera litura*), sâu xanh da láng (*Spodoptera exigua*) của các chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* phân lập 66
3.5 Giá trị LC_{50}, LT_{50} của các chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* đối với sâu tơ, sâu khoang, sâu xanh da láng trong điều kiện phòng thí nghiệm 72
3.5.1 Giá trị LC_{50}, LT_{50} của các chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* đối với sâu tơ 72
3.5.2 Giá trị LC_{50}, LT_{50} của các chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* đối với sâu khoang 74
3.5.3 Giá trị LC_{50}, LT_{50} của các chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* đối với sâu xanh da láng 76
3.6 Chọn chủng *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* chống chịu tia UV .. 78
3.6.1 Khả năng chống chịu tia UV của các chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* ở bước sóng 254 nm và 365 nm 78

3.6.2 Hiệu quả gây chết sâu của các chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* có khả năng chống chịu tia UV trong điều kiện phòng thí nghiệm 82
3.7 Tối ưu điều kiện lên men của vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* 85
3.7.1 Ảnh hưởng của môi trường dinh dưỡng đến sinh khối vi khuẩn 85
3.7.1.1 Ảnh hưởng của thời gian lên men đến sinh khối vi khuẩn 86
3.7.1.2 Ảnh hưởng của pH đến sinh khối vi khuẩn 86
3.7.1.3 Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sinh khối vi khuẩn 87
3.7.2 Tối ưu hóa các yếu tố ảmh hưởng đến sinh khối của vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* bằng phương pháp quy hoạch thực nghiệm .88
3.7.3 Hiệu quả gây chết sâu khi kết hợp hai chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* 92
3.7.4 Ảnh hưởng của điều kiện nhiệt độ bảo quản đến chế phẩm VBt..... 94
3.8 Tăng sinh vi khuẩn bằng hệ thống lên men tự động 2 lít BioFlo 120.. 95
3.9 Hiệu quả của chế phẩm VBt trên trên sâu tơ, sâu khoang và sâu xanh da láng trong điều kiện nhà lưới..... 97
3.10 Hiệu quả của chế phẩm VBt đối với sâu tơ ngoài đồng ruộng 100
Thảo luận chung 103
KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ 107
1. Kết luận 107
2. Đề nghị 108
DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO 109
DANH MỤC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ 131
PHỤ LỤC 1. 1
Sơ đồ định danh vi khuẩn của Bergey 1
Sơ đồ phân loại vi khuẩn *Bacillus* spp. 2

Ly trích DNA 3
Thuốc trừ sâu Vi-Bt®32000WP 4
Hình ảnh các hoạt động thực hiện Luận án 5
PHỤ LỤC 2. Giải trình tự các gen *cry*..... 14
PHỤ LỤC 3. Số liệu thí nghiệm 21
PHỤ LỤC 4. Phân tích thống kê 40
PHỤ LỤC 5. Số liệu địa điểm lấy mẫu 69

DANH SÁCH CÁC CHỮ VIẾT TẮT

Chữ viết tắt	Ý nghĩa
ATCC	American Type Culture Collection
Bp	Base pair – Cặp base
Bt	*Bacillus thuringiensis (B. thuringiensis)*
Btk	*Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*
BIOTEC	National Center for Genetic Engineering and Biotechnology
BVTV	Bảo vệ thực vật
CNSH	Công nghệ sinh học
Ctv	Cộng tác viên
Cry	Crystal
CV	Coefficient of variation – hệ số biến thiên
Cyt	Cytolitic
DNA	Deoxyribonucleic acid
ĐC	Đối chứng
ELISA	Enzyme – Linked Immunosorbent Assay
FAO	Food and Agriculture Organization – Quỹ lương nông quốc tế
GSXL	Giờ sau xử lý
LC_{50}	Lethal concentration – Nồng độ gây chết 50 % cá thể
LT_{50}	Lethal time – Thời gian gây chết 50% cá thể
NCBI	National Center Biotechnology Information
NSXL	Ngày sau xử lý
NSP	Ngày sau phun
NT	Nghiệm thức
IPM	Integrated Pest Management – Quản lý dịch hại tổng hợp

ICM	Integrated Crop Management – Quản lý mùa vụ tổng hợp
RNA	Ribonucleic acid
Rep	Repetition – Lần lặp lại
PCR	Polymerase Chain Reaction
TAE	Tris Acetic EDTA
TE	Tris EDTA
Tm	Temperature melting
TBIA	Tissue Blot immunoassay
TKXL	Trước khi xử lý
TP.HCM	Thành phố Hồ Chí Minh
UV	Ultraviolet – Tia cực tím
VBt	Vietnam *Bacillus thuringiensis*
VIP	Vegetative Insecticidal Protein

DANH SÁCH CÁC BẢNG

Bảng 1.1 Tác động ký sinh côn trùng của các loài *Bacillus thuringiensis* 10
Bảng 1.2 Mối quan hệ giữa các lớp gen *cry,* protein, hình dạng tinh thể và hoạt lực diệt côn trùng của vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* 15
Bảng 2.1 Trình tự primer sử dụng khuếch đại gen *cry* của vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* 36
Bảng 2.2 Các nghiệm thức xác định LC_{50} của vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* đối với sâu tơ, sâu khoang, sâu xanh da láng 40
Bảng 2.3 Các nghiệm thức xác định LT_{50} của vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* đối với sâu tơ, sâu khoang, sâu xanh da láng 41
Bảng 2.4 Giá trị mã hóa và giá trị thực nghiệm của các yếu tố thí nghiệm 43
Bảng 3.1 Số mẫu đất phân lập ở các vùng đất tại các tỉnh, thành 49
Bảng 3.2 Số mẫu *Bacillus thuringiensis* phân lập tại các tỉnh, thành 50
Bảng 3.3 Các dạng tinh thể độc *Bacillus thuringiensis* từ các mẫu phân lập 54
Bảng 3.4 So sánh kết quả giải trình từ với dữ liệu gen của GenBank bằng công cụ BLASTn 60
Bảng 3.5 Số chủng vi khuẩn chứa gen độc tố *cry1, cry2, cry4, cry9* 62
Bảng 3.6 Hiệu quả gây chết (%) sâu tơ của các chủng vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* 67
Bảng 3.7 Hiệu quả gây chết (%) sâu khoang của các chủng vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* 68
Bảng 3.8 Hiệu quả gây chết (%) sâu xanh da láng của các chủng vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* 69
Bảng 3.9 LC_{50} của bốn chủng vi khuẩn đối với sâu tơ giai đoạn tuổi 2 và tuổi 4 trong điều kiện phòng thí nghiệm 72

Bảng 3.10 LT_{50} của bốn chủng vi khuẩn đối với sâu tơ giai đoạn tuổi 2 và tuổi 4 trong điều kiện phòng thí nghiệm 73
Bảng 3.11 LC_{50} của bốn chủng vi khuẩn đối với sâu khoang giai đoạn tuổi 2 và tuổi 4 trong điều kiện phòng thí nghiệm 74
Bảng 3.12 LT_{50} của bốn chủng vi khuẩn đối với sâu khoang giai đoạn tuổi 2 và tuổi 4 trong điều kiện phòng thí nghiệm 75
Bảng 3.13 LC_{50} của bốn chủng vi khuẩn đối với sâu xanh da láng giai đoạn tuổi 2 và tuổi 4 trong điều kiện phòng thí nghiệm 76
Bảng 3.14 LT_{50} của bốn chủng vi khuẩn đối với sâu xanh da láng giai đoạn tuổi 2 và tuổi 4 trong điều kiện phòng thí nghiệm 77
Bảng 3.15 Mật số vi khuẩn (CFU/mL) của 12 chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* sau khi chiếu UV ở bước sóng 254 nm 79
Bảng 3.16 Mật số vi khuẩn (CFU/mL) của 12 chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* sau khi chiếu tia UV ở bước sóng 365 nm 81
Bảng 3.17 Diễn biến mật số sâu tơ sống sót sau xử lý vi khuẩn 83
Bảng 3.18 Hiệu quả gây chết (%) sâu tơ của các chủng vi khuẩn 83
Bảng 3.19 Mật độ vi khuẩn thu được trong thực nghiệm 89
Bảng 3.20 Kết quả phân tích sự phù hợp của mô hình với thực nghiệm..... 89
Bảng 3.21 Kết quả phân tích ANOVA 90
Bảng 3.22 Các giải pháp tối ưu với hàm lượng ba biến xác định và giá trị tối ưu mong đợi 91
Bảng 3.23 Hiệu quả gây chết (%) sâu tơ của hai chủng vi khuẩn VBt2110.1 và VBt26310.1 trong điều kiện phòng thí nghiệm..... 92
Bảng 3.24 Hiệu quả gây chết (%) sâu khoang của hai chủng vi khuẩn VBt2110.1 và VBt26310.1 trong điều kiện phòng thí nghiệm..... 93
Bảng 3.25 Hiệu quả gây chết (%) sâu xanh da láng của hai chủng vi khuẩn VBt2110.1 và VBt26310.1 trong điều kiện phòng thí nghiệm..... 94

Bảng 3.26 Mật số vi khuẩn (CFU/mL) sau khi lên men bằng hệ thống lên men tự độ 2 Lít BioFlo 120 96
Bảng 3.27 Mật số sâu tơ ở các nghiệm thức thí nghiệm 100
Bảng 3.28 Ảnh hưởng của chế phẩm VBt đối với cây cải xanh (cấp) 102

Phụ lục

Bảng 1 Đặc điểm khuẩn lạc, tinh thể và gen độc của các chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* 6
Bảng 2 Mật số (con/nghiệm thức) và hiệu lực (%) phòng trừ sâu tơ của các chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* trong phòng thí nghiệm sau **7** ngày xử lý 20
Bảng 3 Mật số (con/nghiệm thức) và hiệu lực (%) phòng trừ sâu khoang của các chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* trong phòng thí nghiệm sau **7** ngày xử lý 21
Bảng 4 Mật số (con/nghiệm thức) và hiệu lực (%) phòng trừ sâu xanh da láng của các chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* trong phòng thí nghiệm sau **7** ngày xử lý 22
Bảng 5a, 5b, 5c Diễn biến mật độ của các chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (CFU/ml) sau khi chiếu UV ở bước sóng 254 nm 23
Bảng 6a, 6b, 6c Diễn biến mật độ của các chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (CFU/ml) sau khi chiếu UV ở bước sóng 365 nm 26
Bảng 7a, 7b, 7c Mật số (con/nghiệm thức) và hiệu lực (%) phòng trừ sâu tơ của các chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* chiếu tia UV 29
Bảng 8a, 8b, 8c Mật số (con/nghiệm thức) và hiệu lực (%) phòng trừ sâu khoang của các chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* chiếu tia UV 31
Bảng 9a, 9b, 97c Mật số (con/nghiệm thức) và hiệu lực (%) phòng trừ sâu xanh da láng của các chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* chiếu tia UV 33

Bảng 10 Diễn biến mật độ của các chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (CFU/mL) ở các môi trường 35
Bảng 11 Diễn biến mật độ của các chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (CFU/mL) ở các mức thời gian 36
Bảng 12 Diễn biến mật độ của các chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (CFU/mL) ở các mức pH 37
Bảng 13 Diễn biến mật độ của các chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (CFU/mL) ở các mức nhiệt độ 38
Bảng 14 Diễn biến mật độ vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (CFU/mL) khi lên men bằng hệ thống lên men tự động 2 lít BioFlo 120 39
Bảng 15 Diễn biến mật số sâu tơ (*Plutella xylostella*) của hai chủng vi khuẩn VBt21110.1 và VBt26310.1 trong điều kiện phòng thí nghiệm 40
Bảng 16 Diễn biến mật số sâu khoang (*Spodoptera litura*) của hai chủng vi khuẩn VBt21110.1 và VBt26310.1 trong điều kiện phòng thí nghiệm 41
Bảng 17 Diễn biến mật số sâu canh da láng (*Spodoptera exigua*) của hai chủng vi khuẩn VBt21110.1 và VBt26310.1 trong điều kiện phòng thí nghiệm . 42
Bảng 18 Diễn biến mật số sâu tơ (*Plutella xylostella*) ở các nghiệm thức phun chế phẩm VBt trong điều kiện nhà lưới 43
Bảng 19 Hiệu quả (%) của chế phẩm VBt đối với sâu tơ trong điều kiện nhà lưới 44
Bảng 20 Hiệu quả (%) của chế phẩm VBt đối với sâu khoang trong điều kiện nhà lưới 44
Bảng 21 Diễn biến mật số sâu khoang (*Spodoptera litura*) ở các nghiệm thức phun chế phẩm VBt trong điều kiện nhà lưới 45
Bảng 22 Diễn biến mật số sâu xanh da láng (*Spodoptera exigua*) ở các nghiệm thức phun chế phẩm VBt trong điều kiện nhà lưới ……46
Bảng 23 Hiệu quả (%) của chế phẩm VBt đối với sâu xanh da láng trong điều kiện nhà lưới 47

Bảng 24 Diễn biến mật số sâu tơ (*Plutella xylostella*) ở các nghiệm thức phun chế phẩm VBt trên cây cải ngoài đồng ruộng 48
Bảng 25 Bảng Anova kết quả phân tích thống kê đánh giá hiệu quả của các chủng vi khuẩn phòng trừ sâu tơ trong phòng thí nghiệm 49
Bảng 26 Bảng Anova kết quả phân tích thống kê đánh giá hiệu quả của các chủng vi khuẩn phòng trừ sâu khoang trong phòng thí nghiệm 49
Bảng 27 Bảng Anova kết quả phân tích thống kê đánh giá hiệu quả của các chủng vi khuẩn phòng trừ sâu xanh da láng trong phòng thí nghiệm 50
Bảng 28 Bảng Anova kết quả phân tích LT_{50} sâu tơ tuổi 2 và tuổi 4 61
Bảng 29 Bảng Anova kết quả phân tích LT_{50} sâu khoang tuổi 2 và tuổi 4 61
Bảng 30 Bảng Anova kết quả phân tích LT_{50} sâu xanh da láng tuổi 2 và tuổi 4 61
Bảng 31 Bảng Anova kết quả phân tích các chủng vi khuẩn chiếu tia UV ở bước sóng 254 nm ở các mức thời gian 62
Bảng 32 Bảng Anova kết quả phân tích các chủng vi khuẩn chiếu tia UV ở bước sóng 365 nm ở các mức thời gian 62
Bảng 33 Bảng ANOVA kết quả phân tích hai chủng vi khuẩn VBt2110.1 và VBt26310.1 phòng trừ sâu tơ (*Plutella xylostella*) 63
Bảng 34a, 34b Bảng ANOVA kết quả phân tích hai chủng vi khuẩn VBt2110.1 và VBt26310.1 phòng trừ sâu khoang (*Spodoptera litura*) 63
Bảng 35 Bảng ANOVA kết quả phân tích hai chủng vi khuẩn VBt2110.1 và VBt26310.1 phòng trừ sâu xanh da láng (*Spodoptera exigua*)..... 64
Bảng 36 Bảng ANOVA kết quả phân tích thống kê lên men bằng hệ thống lên men tự động 2 lít BioFlo 120 65
Bảng 37 Bảng Anova kết quả phân tích thống kê sử dụng chế phẩm VBt phòng trừ sâu tơ trong điều kiện nhà lưới 65
Bảng 38 Bảng Anova kết quả phân tích thống kê sử dụng chế phẩm VBt phòng trừ sâu khoang trong điều kiện nhà lưới 66

Bảng 39 Bảng Anova kết quả phân tích thống kê sử dụng chế phẩm VBt phòng trừ sâu xanh da láng trong điều kiện nhà lưới 66
Bảng 40. Bảng Anova kết quả phân tích thống kê sử dụng chế phẩm VBt phòng trừ sâu tơ trên cây cải ngoài đồng ruộng 67

DANH SÁCH CÁC HÌNH

Hình 1.1 Cấu tạo vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* 7
Hình 1.2 Mô hình cấu trúc protein tinh thể độc tố *cry* 14
Hình 1.3 Tổng quan nội độc tố của *Bacillus thuringiensis* gây chết côn trùng 16
Hình 1.4 Protein vip của *Bacillus thuringiensis* gây bệnh các bộ côn trùng 18
Hình 1.5 Thị trường thuốc trừ sâu sinh học năm 2013 – 2022 27
Hình 2.1 Sơ đồ bố trí thí nghiệm ở điều kiện nhà lưới 48
Hình 2.2 Sơ đồ bố trí thí nghiệm ngoài đồng 49
Hình 3.1 Định danh vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* bằng phản ứng sinh hóa..... 54
Hình 3.2 Nhuộm bào tử và tinh thể vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* 55
Hình 3.3 Hình dạng tinh thề độc của vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* 57
Hình 3.4 Kết quả điện di sản phẩm PCR vùng 16Sr của DNA vi khuẩn..... 58
Hình 3.5 Kết quả điện di sản phẩm PCR với cặp primer Un1F – Un1R 59
Hình 3.6 Kết quả điện di sản phẩm PCR với cặp primer Un2F – Un2R 59
Hình 3.7 Kết quả điện di sản phẩm PCR với cặp primer Un4F – Un4R 60
Hình 3.8 Kết quả điện di sản phẩm PCR với cặp primer Un2F – Un2R 60
Hình 3.9 Kết quả điện di sản phẩm khuếch đại của các mẫu phân lập *Bacillus thuringiensis* với các cặp primer đặc hiệu cho gen *cry2* 61
Hình 3.10 Cây phân nhóm gen *cry1* và *cry2* của các mẫu phân lập *B. thuringiensis* var. *kurstaki* và các trình tự gen *cry* từ cơ sở dữ liệu GenBank. 65
Hình 3.11 Kết quả điện di sản phẩm PCR với cặp primer Un9F – Un9R 66
Hình 3.12 Kết quả SDS – PAGE 67
Hình 3.13 Kết quả điện di sản phẩm PCR vùng gen *vip3a* 68
Hình 3.14 Sâu tơ chết do vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* 72
Hình 3.15 Khuẩn lạc các chủng vi khuẩn hình thành qua các mức thời gian chiếu tia UV ở bước sóng 254 nm 82

Hình 3.16 Khuẩn lạc các chủng vi khuẩn hình thành qua các mức thời gian chiếu tia UV ở bước sóng 365 nm 84
Hình 3.17 Hiệu quả gây chết (%) sâu khoang của các chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* đã được chiếu tia UV 86
Hình 3.18 Hiệu quả gây chết (%) sâu xanh da láng của các chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* đã được chiếu tia UV 86
Hình 3.19 Mật độ vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* ở các môi trường dinh dưỡng ... 87
Hình 3.20 Mật độ vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* ở các thời gian lên men 88
Hình 3.21 Mật độ vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* ở các mức pH..... 89
Hình 3.22 Mật độ vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* ở các mức nhiệt độ..... 90
Hình 3.23 Bề mặt đáp ứng của từng cặp yếu tố ảnh hưởng đến lên men thu sinh khối ở vi khuẩn VBt21110.1 93
Hình 3.24 Mật độ vi khuẩn (log10 CFU/ml) trong chế phẩm VBt qua các thời gian bảo quản ở các nhiệt độ khác nhau 97
Hình 3.25 Đường cong sinh trưởng của vi khuẩn *Bacillus thuringiensis var. kurstaki* ở nhiệt độ 33^0C trong môi trường T3 98
Hình 3.26 Hiệu quả của chế phẩm VBt gây chết sâu tơ trong điều kiện nhà lưới 99
Hình 3.27 Hiệu quả (%) của chế phẩm VBt gây chết sâu khoang trong điều kiện nhà lưới 100
Hình 3.28 Hiệu quả (%) của chế phẩm VBt gây chết sâu xanh da láng trong điều kiện nhà lưới 101
Hình 3.29 Hiệu quả (%) của chế phẩm VBt gây chết sâu tơ gây hại trên cây cải xanh ngoài đồng 103

Phụ lục

Hình 1 Sự phân bố của gen *cry1, cry2, cry4, cry9* và *vip3a* của vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* ở một số tỉnh, thành Việt Nam 5
Hình 2 Thu thập mẫu đất ở khu vực đất nông nghiệp, phi nông nghiệp, đất rừng,

ven sông tại các tỉnh, thành Việt Nam 7
Hình 3 Thu thập mẫu đất ở khu vực đất canh tác, đất kghông canh tác tại một số tỉnh, thành Việt Nam 8
Hình 5 Nhân nuôi sâu tơ, sâu khoang, sâu xanh da láng và trồng cải phục vụ thí nghiệm sinh học tại nhà lưới Viện Nghiên cứu CNSH và Môi trường, Trung tâm Giống cây trồng, vật nuôi và thủy sản TP.HCM 9
Hình 4 Máy lắc lên men thông thường và máy lên men tự động tại Viện Nghiên cứu Công nghệ sinh học và Môi trường 9
Hình 6 Đèn chiếu tia UV ở bước sóng 254 nm và 365 nm 10
Hình 7 Bố trí thí nghiệm chiếu tia UV ở các bước sóng 254 nm và 365 nm 10
Hình 8 Bố trí thí nghiệm đánh giá hiệu quả các chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* trong điều kiện phòng thí nghiệm 11
Hình 9 Sự khác biệt giữa các nghiệm thức phun chế phẩm vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* so với đối chứng (I_1) trên sâu tơ..... 11
Hình 10 Thí nghiệm kết hợp hai chủng vi khuẩn ở các nồng độ khác nhau 12
Hình 11 Thí nghiệm đánh giá hiệu quả của các chủng vi khuẩn trong điều kiện nhà lưới Viện Nghiên cứu Công nghệ sinh học và Môi trường 12
Hình 12 Thí nghiệm đánh giá hiệu quả của chế phẩm VBt trong điều kiện nhà lưới Trung tâm Giống cây trồng, vật nuôi và thủy sản..... 13
Hình 13 Tìm kiếm các trình tự gen tương đồng với sản phẩm của chủng Bt đối chứng dương theo primer 14
Hình 14 Kết quả BLAST trình tự primer của gene *cry1* trên NCBI 14
Hình 15 Kết quả kiểm tra mức độ đặc hiệu của các cặp primer dùng để phát hiện gen *cry2* và khả năng bắt cặp đặc hiệu của primer c*ry2*-f sử dụng công cụ BLAST..... 15

MỞ ĐẦU

1. Tính cấp thiết

Sản xuất nông nghiệp với việc tạo ra các sản phẩm an toàn cho người tiêu dùng, đồng thời bảo vệ môi trường đã và đang được xem là xu hướng tất yếu trên thế giới. Sử dụng các tác nhân sinh học là giải pháp giúp giảm lượng hóa chất nông nghiệp trên đồng ruộng, trong đó, vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* được coi là một loại thuốc trừ sâu sinh học có hiệu quả và đạt độ an toàn cao, tuy nhiên chúng vẫn chưa được ứng dụng phổ biến và sản xuất hàng loạt do chi phí sản xuất cao (Pan và ctv, 2021).

Vi khuẩn *B. thuringiensis* là loại vi khuẩn Gram dương, hiếu khí, với tính chất đặc biệt là khả năng gây chết côn trùng do sản sinh protein nội độc tố *cry,* (Frankenhuyzen, 1993; Kumar và ctv, 1996; Schnepf và ctv, 1998; Ennouri và ctv, 2017, Sun và ctv, 2021). *B. thuringiensis* sản sinh độc tố dưới dạng protein chuyên biệt cho một số loại côn trùng gây hại, không ảnh hưởng đến con người, động vật hữu nhũ và môi trường sinh thái (Mazid và ctv, 2011). Ngoài ra, các sản phẩm không độc hại của các protein này không tích tụ trong môi trường và hoàn toàn có thể phân hủy sinh học (Oberemok và ctv, 2015; Chattopadhyay và ctv, 2018).

Trong những năm qua, các nhà khoa học đã có nhiều nghiên cứu để phân lập vi khuẩn này từ nhiều môi trường khác nhau (Baig và Mehnaz, 2010; Silva và ctv, 2012; Dagga và ctv, 2016). Các nhóm nghiên cứu đã tạo được nhiều bộ sưu tập các chủng *B. 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 chủng *B. thuringiensis* tự nhiên là các gen thuộc nhóm *cry1*, tiếp theo là nhóm *cry2* (Ben-Dov và ctv, 1997; Bravo và ctv., 1998). Sự phụ thuộc này đã dẫn đến gia tăng tính kháng độc tố *cry* ở các quần thể côn trùng (Bravo và ctv, 2011; Ali và ctv, 2018).

Tuy nhiên, mỗi chủng *B. thuringiensis* chỉ chứa một số nhóm gen *cry* gây độc với một số loài côn trùng nhất định (Schnepf và 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.

Theo ghi nhận, *B. thuringiensis* được nghiên cứu và ứng dụng đầu tiên từ năm 1971 tại Viện Bảo vệ thực vật và Phát triển, các nghiên cứu chuyên sâu về gen được thực hiện tại Viện Công nghệ Sinh học Hà Nội. Trong đó, nguồn *B. thuringiensis* thu thập, phân lập từ Việt Nam được xem rất đa dạng về loài và độc tính, với nhiều đề nghị sử dụng cho kiểm soát muỗi nhằm ngừa bệnh truyền nhiễm, nhưng chưa có dòng thuần (Koichi và ctv, 2006; Phạm Thị Thùy, 2013). Ở Việt Nam thuốc trừ sâu sinh học được sử dụng nhiều, đặc biệt có nguồn gốc từ vi khuẩn *B. thuringiensis*. Với vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki,* có khoảng 30 sản phẩm thương mại khác nhau trên thị trường đã và đang được sử dụng rộng rãi tại các vùng trồng rau sạch trên cả nước trong phòng trừ các loại sâu hại rau như sâu khoang, sâu xanh, sâu tơ, sâu cuốn lá. Việc sử dụng chế phẩm từ vi khuẩn *B. thuringiensis* như thuốc bảo vệ thực vật thông thường dễ bị ảnh hưởng bởi các yếu tố môi trường bên ngoài, nhất là bức xạ mặt trời làm giảm độc tố và thời gian tồn tại (Beegle và ctv, 1981; Pozsgay và ctv, 1987; Pusztai và ctv, 1991; Cohen và ctv, 1991).

Do có nhiều ưu điểm bao gồm tác dụng cụ thể đối với ấu trùng, côn trùng gây hại, không có tác dụng không mong muốn đối với môi trường và các sinh vật không phải mục tiêu và dễ dàng kết hợp với các phương pháp kiểm soát khác, *B. thuringiensis* có một vị trí đặc biệt quan trọng trong kiểm soát sinh học (Rodriguea và ctv, 2015; Lima-Perez và ctv, 2019). Trên thực tế, việc tạo ra chế phẩm sinh học từ *B. thuringiensis* chỉ được sản xuất bằng cách lên men (Bernhard và Utz, 1993). Mặt khác, để ứng dụng chúng vào sản xuất công nghiệp, cần phải cải tiến quy trình sản xuất, đặc biệt là môi trường tăng sinh phù hợp với quy mô lớn (Kanekar và ctv, 2002).

Do đó, việc tập trung nghiên cứu các nguồn gen độc tính (*cry, cyt, vip*) và lưu trữ nguồn giống để sử dụng lâu dài cho việc sản xuất các chế phẩm *B. thuringiensis* var. *kurstaki* thật sự cần thiết và việc sử dụng bộ mẫu vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* cho nghiên cứu sản xuất thuốc bảo vệ thực vật ở Việt Nam nhằm xây dựng quy trình công nghệ sản xuất có hệ thống và quy mô lớn. Bên cạnh đó, việc đẩy

mạnh công tác khuyến nông, kết hợp tập huấn sử dụng thuốc BVTV có hoạt chất từ vi khuẩn *B. thuringiensis* một cách thường xuyên và hệ tống sẽ góp phần bảo vệ môi trường, giảm sử dụng thuốc trừ sâu hóa học.

Vì vậy, việc nghiên cứu và khai thác *B. thuringiensis* var. *kurstaki* là rất cấp thiết trong giai đoạn hiện nay, mang một ý nghĩa quan trọng với những đóng góp tích cực vào lĩnh vực nông nghiệp. Nhằm mục đích góp phần vào việc sử dụng vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* trong phòng trừ sâu hại và từ đó sử dụng thuốc bảo vệ thực vật sinh học trên rau, luận án **"Nghiên cứu sự đa dạng và độc tính của vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* trên sâu ăn lá hại rau ở Việt Nam"** được thực hiện từ năm 2015 đến năm 2021.

2. Mục tiêu nghiên cứu

Xác định sự phân bố của vi khuẩn *B. thuringiensis* và đa dạng quần thể vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* ở một số tỉnh, thành tại Việt Nam.

Lập bộ mẫu vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* có độc tính cao là nguồn vật liệu sản xuất chế phẩm sinh học an toàn, thân thiện với môi trường, phù hợp với nông nghiệp hữu cơ.

Xác định môi trường dinh dưỡng và tối ưu hóa điều kiện lên men tự động vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* làm cơ sở cho việc xây dựng qui trình lên men qui mô lớn, tạo chế phẩm sinh học phục vụ cho sản xuất.

3. Đối tượng và phạm vi nghiên cứu

3.1 Đối tượng nghiên cứu

Vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki.*

3.2 Phạm vi nghiên cứu

Mẫu đất được thu thập từ các vùng đất canh tác và không canh tác ở một số tỉnh vùng Đồng bằng sông Hồng, Duyên hải miền Trung, Đông Nam Bộ và Đồng bằng sông Cửu Long. Sâu ăn lá trên cây rau chủ yếu thuộc bộ cánh vảy như: sâu khoang, sâu tơ, sâu xanh da láng.

4. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài nghiên cứu

4.1 Ý nghĩa khoa học

Kết quả từ sự phân bố loài của vi khuẩn *B. thuringiensis* ở các vùng sinh thái Việt Nam, là nguồn cơ sở dữ liệu cho các nhà khoa học nghiên cứu về: nguồn gốc phát sinh, sự đa dạng và phong phú của loài vi khuẩn *B. thuringiensis*.

Bộ mẫu vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* có sự hiện diện của các gen *cry*, *vip;* kết quả của luận án này, đã cung cấp những thông tin cần thiết để thiết lập cơ sở dữ liệu sinh học, tạo điều kiện thuận lợi cho lĩnh vực nghiên cứu chuyên sâu về tính độc của các dòng vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* từ sự phân bố ở các vùng sinh thái của Việt Nam, mang lại những đóng góp tích cực vào phần cơ sở khoa học để bổ sung thêm vào danh sách các chủng vi khuẩn có độc tính trừ sâu cao hơn đang có ở Việt Nam.

4.2 Ý nghĩa thực tiễn

Các dòng vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* từ kết quả nghiên cứu đạt hiệu quả trong phòng trừ sâu hại rau.

Cung cấp cơ sở tin cậy cho việc sử dụng chế phẩm VBt từ kết quả nghiên cứu đến ứng dụng trừ sâu hại trên rau ngoài đồng ruộng, góp phần đưa chế phẩm sinh học áp dụng trong canh tác nông nghiệp hữu cơ.

4.3 Những đóng góp mới của nghiên cứu

Cung cấp những thông tin về sự phân bố và tính đa dạng di truyền của vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* ở các vùng sinh thái của Việt Nam.

Xác định được các gen độc tính *cry*, *vip3a* hiện diện ở các dòng vi khuẩn gây chết trên sâu khoang (*Spodoptera litura),* sâu tơ *(Plutella xyslotella),* sâu xanh da láng (*Spodoptera exigua)* từ các dòng phân lập.

Xác định được khả năng chống chịu tia UV, mật số, thời gian gây chết sâu trung bình (LC_{50}, LT_{50}) của các chủng vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki*.

Xây dựng được quy trình kỹ thuật lên men tự động cho việc gia tăng mật số vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki.*

Chương 1
TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1 Sự phân bố và đa dạng quần thể của vi khuẩn *Bacillus thuringiensis*

Vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* được phát hiện đầu tiên năm 1901 tại Nhật Bản bởi nhà sinh vật học Shigetane Ishiwatari, khi ông phát hiện ra nguyên nhân gây bệnh cho tằm do một loại vi khuẩn thuộc chi Bacillus, ông đặt tên vi khuẩn này là *B. sotto*. Năm 1911, Ernst Berliner phát hiện *B.thuringiensis* trên bướm phấn Địa Trung Hải (*Anagasta kuchniella*) ở vùng Thuringia và đặt tên là *B. thuringiensis.* (Phạm Văn Ty và Vũ Nguyên Thành, 2007).

Bacillus thuringiensis có một vị trí đặc biệt quan trọng trong kiểm soát sinh học, được ứng dụng đầu tiên vào cuối những năm 1920 để kiểm soát côn trùng ở Hungary và đầu những năm 1930 để kiểm soát sâu bệnh hại ngô ở Nam Tư (Lord, 2005). Sản phẩm thương mại Bt đầu tiên được sản xuất ở Pháp vào năm 1938, tiếp sau đó là ở Mỹ vào năm 1950 (Nester và ctv, 2002). Chế phẩm vi khuẩn Bt chỉ phát huy hiệu lực khi hiện diện trên cây tại những bộ phận mà côn trùng sử dụng làm thức ăn; Có hiệu quả cao đối với ấu trùng tuổi nhỏ; Dễ bị phân hủy dưới tác động của môi trường như UV và mưa làm rửa trôi bào tử; Không ảnh hưởng đến môi trường và thiên địch; Có thể kết hợp với các phương pháp kiểm soát sâu hại khác, (Rodriguea và ctv, 2015; Lima-Perez, 2019).

Với hơn 200 loại protein của *B. thuringiensis* đã được phát hiện có khả năng tạo protein nội độc tố, được biết đến như nội độc tố delta hoặc tinh thể protein gây độc cho côn trùng (*insecticidal crystal protein* – ICP) có khả năng diệt một số loại côn trùng khác nhau. *B. thuringiensis* đã được rất nhiều nhà khoa học nghiên cứu khả năng ứng dụng trong nông nghiệp (Schnepf và ctv, 1998; Bùi Chí Bửu, 2002; Ngô Đình Bính và ctv, 2010).

1.1.1 Phân loại vi khuẩn *Bacillus thuringiensis*

Có nhiều cách phân loại *B. thuringiensis*: dựa trên đặc điểm hình thái và đặc điểm sinh hoá (Heimpel và Angus, 1958), phân loại theo type huyết thanh kháng nguyên, phân loại bằng thực khuẩn thể dựa trên tính mẫn cảm, phân loại theo type huyết thanh kháng protein tinh thể, phân loại theo loại enzyme lipase, phân loại theo nguồn bệnh.

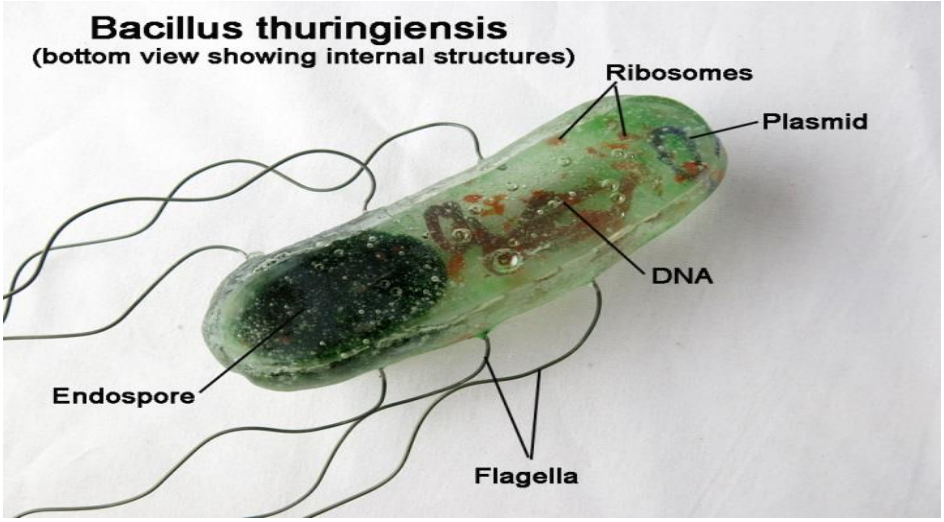
Hofte và Whiteley (1989) đưa ý tưởng đầu tiên về hệ thống phân loại *B. thuringiensis* trên cơ sở các lớp gen *cry*, protein, hình dạng tinh thể, type huyết thanh và hoạt lực diệt côn trùng. Mỗi lớp gen *cry* mã hóa tổng hợp một hoặc vài protein có tác dụng gây độc đặc trưng với một côn trùng. Hệ thống phân loại này hiện nay được sử dụng để phân loại *B. thuringiensis* cho đến các loài phụ. Theo Glare và O'Collaghan (1998) thì việc phân loại ra *B. thuringiensis* thật sự không dễ bởi mối quan hệ di truyền gần giữa *B. thuringiensis*, *B. cereus*, *B. anthracis* và *B. mycoides*.

1.1.2 Đặc điểm hình thái và sinh hoá của vi khuẩn *Bacillus thuringiensis*

Vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* là vi khuẩn gram dương, có kích thước tế bào 1 – 1,2 × 3,5 µm, tiêm mao phủ mỏng, tế bào đứng riêng lẻ hoặc xếp thành từng chuỗi (Hình 1.1) với tính chất đặc biệt là khả năng gây chết côn trùng do sản sinh protein nội độc tố (Schnepf và ctv, 1998; Ennouri, 2017). Hình thái đáng chú ý là vi khuẩn hình thành một dạng protein có cấu trúc tinh thể trong giai đoạn tạo bào tử, gọi là *cry* protein được tổng hợp từ gen *cry* (Sanahuja, 2011). Các protein tinh thể này được sử dụng để tiêu diệt côn trùng trong sản xuất nông lâm nghiệp do chúng an toàn với người và động vật ăn cỏ (Mazid và Kalita, 2011). Ngoài ra, các sản phẩm không độc hại của các protein này không tích tụ trong môi trường và hoàn toàn có thể phân hủy sinh học (Oberemok và ctv, 2015; Chattopadhyay và Banerjee, 2018).

Tinh thể protein hay còn gọi là "thể kèm bào tử" có kích thước khoảng 0,6 – 2 µm, tùy vào từng loài khác nhau mà hình dạng tinh thể có khác nhau như hình tròn, hình quả trám, hình thoi hoặc có hình dạng không xác định (Phạm Thị Thùy, 2010).

Bình thường mỗi tế bào có 1 tinh thể chung, đôi khi có 2 hoặc 3 tinh thể độc đối với côn trùng. *B. thuringiensis* phát triển tốt trong điều kiện có nhiệt độ là 36ºC ± 2 (Knowles, 1994).



Hình 1.1 Cấu tạo vi khuẩn *B. thuringiensis* (***https://www.tes.com***).

Vi khuẩn *B. thuringiensis* có thể phát triển trên nhiều loại môi trường nuôi cấy, trên các môi trường khác nhau thì hình thái khuẩn lạc sẽ khác nhau. Trong môi trường peptone agar bề mặt khuẩn lạc *B. thuringiensis* hình tròn, trong 72 giờ khuẩn lạc có thể đạt kích thước 1 cm, màu trắng sữa, bề mặt phẳng, mép hơi có dạng phóng xạ giống dạng thảm, có tuyến phóng xạ dạng sợi; Môi trường glucose 2,2% agar ở 30ºC trong 24 giờ, khuẩn lạc có màu vàng, sau 48 giờ có hình tròn dày, đường kính 3 mm, ở giữa có vòng màu sẫm hơn bề mặt màu trắng bóng, khô, thô, mép uốn, sau 72 giờ đường kính đạt 2 cm; Môi trường T3 agar, khuẩn lạc có màu trắng, thô, lan nhanh trên đĩa khi được nuôi cấy (Travers, 1987; Trần Văn Mão, 2008).

Bacillus thuringiensis không lên men acid trong môi trường chứa arabinose, xylose, manitol, nhưng tạo acid trong môi trường chứa glucose, khử nitrate thành nitrite, ngưng kết sữa, có khả năng thủy phân tinh bột, có tác dụng hòa tan trong môi trường huyết ngựa, phát triển được ở môi trường chứa 0,001% lysozyme, 7% NaCl với pH 5,7 và có phản ứng với lòng đỏ trứng, không có khả năng khử amine

của phenilalanin, không sử dụng acid citric, không khử muối sulfate (Phạm Thị Thùy, 2010).

1.1.3 Các nghiên cứu trong và ngoài nước về sự phân bố, đa dạng di truyền của vi khuẩn *Bacillus thuringiensis*

Trong đất, *B. thuringiensis* tồn tại ở dạng bào tử, không nảy mầm hoặc nhân lên qua nhiều năm. Mật số của *B. thuringiensis* trong các loại đất rất thấp, khoảng 0,005 – 0,5% loài *Bacillus* spp. phân lập trong đất (DeLucca và ctv, 1981; Travers và ctv, 1987; Rampersad và Ammons; 2005).

Đã có 27.000 mẫu vi khuẩn *B. thuringiensis* được phân lập trên toàn thế giới và phát hiện sự hiện diện của vi khuẩn *B. thuringiensis* ở nhiều môi trường khác nhau như trong đất, ở một số cây hạt trần, trên thuốc lá khô và bụi sản phẩm tồn trữ, hạt giống, đất nông nghiệp, môi trường thủy sản và thậm chí là những vùng có điều kiện khắc nghiệt như sa mạc, trầm tích biển (Martin và Travers, 1989; Kealin và ctv, 1994; Smith và Couche, 1997; Ben Dov và ctv, 1997; Iriarte và ctv, 1998; Baig và Mehnaz, 2010, Oves và ctv, 2013). Bên cạnh đó, từ những mẫu đất bị nhiễm chất thải ở Ấn Độ cũng phát hiện sự hiện diện của *B. thuringiensis.* Kết quả này mang lại khám phá mới về loài *B. thuringiensis* có thể phát triển ở những môi trường ô nhiễm (Mohammad và ctv, 2013).

Việc phân lập từ chất nền tự nhiên ở Kyrgyzstan, trong đó 30% được lấy từ mẫu đất và rác, 69,7% từ côn trùng chết và khoảng 0,3% từ sên, kết quả phân lập có nhiều chủng vi khuẩn *B. thuringiensis* thuộc var *linworthi,* var. *galleria*, var. *sotto*, var. *kurstaki*, var. *aizawai* và var. *entomocidus* chiếm đa số (Tinatin và ctv, 2018).

Từ 146 chủng *B. thuringiensis* đã được phân lập từ các mẫu đất, lá cây ở Costa Rica và các chủng này tổng hợp được nhiều dạng tinh thể khác nhau, có chủng được 1 dạng tinh thể, có chủng được từ 2 đến 3 dạng tinh thể khác nhau như dạng bất định (47%), dạng oval (20%), dạng tháp đôi (3%); dạng tháp đôi và hình lập phương (1%); dạng tháp đôi, oval và dạng bất định (5%); dạng tháp đôi, oval và lập phương (2%) (Glen và Ana, 2005).

Nghiên cứu tại Pakistan đã xác định *B. thuringiensis* hiện diện trong cát lắng vùng ven biển Ả Rập với nhiều mẫu *B. thuringiensis* chứa nhiều gen *cry* trong cùng cá thể. Baig D.N và S. Mehnaz (2010) cho rằng các mẫu *B. thuringiensis* vùng ven biển có tiềm năng trong tạo chế phẩm thuốc sinh học. Nghiên cứu về sự đa dạng *B. thuringiensis* ở vùng Tây Ghats của Ấn Độ thu được 316 mẫu có *B. thuringiensis* và 7 chủng tinh thể độc khác nhau dựa trên SDS – PAGE (Ramalakshmi và Udayasuriyan, 2009). Khi phân lập 1.789 mẫu đất chứa 2.134 chủng *B. thuringiensis* tạo được 3 gen *vip*: *vip3* (67,4%), *vip2* (14,6%), *vip1* (8,1%) (Yu và ctv, 2010). Sau đó, Swamy và ctv (2011) đã mô tả đặc điểm, đa dạng gen *cry* của vi khuẩn *B. thuringiensis* gây độc cho côn trùng tại quần đảo Andaman và Nicobar. Từ 774 mẫu đất ở tỉnh Azerbaijan phía Tây Iran, phân lập được 48 mẫu, trong đó gen *cry1* là 93,8% và *cry2* là 76,2% (Aramideh, 2016). Theo đó, là nhiều nghiên cứu với gen các độc tố: gen *cryI* đặc hiệu cho bộ cánh vảy và gen *cryIV* đặc hiệu cho bộ hai cánh trong cùng một chủng *B. thuringiensis* (Tinatin và ctv, 2018).

Ngoài các nghiên cứu về chủng, tinh thể độc, gen *cry*, *vip* của *B. thuringiensis thì* những nghiên cứu về phòng trừ côn trùng cũng đã được tiến hành: phân lập *B. thuringiensis* ở vùng đất Syria có 25 chủng *B. thuringiensis* mang tinh thể độc gây chết côn trùng Hassan và ctv (2010). Bộ sưu tập ở Quatas có khoảng 700 chủng vi khuẩn *B. thuringiensis* gồm 259 chủng *B. thuringiensis* dạng tinh thể hình thoi và hình cầu có thể diệt sâu thuộc bộ cánh vảy và cánh cứng (Nair và ctv, 2018). Khi phân tích 25 mẫu đất thuộc bang Amazonas, Brazil có 11,8% (57/484 khuẩn lạc), khuẩn lạc chứa *B. thuringiensis* với 6 chủng vi khuẩn *B. thuringiensis* có khả năng phòng trừ *Aedes aegypti* (Culicidae, Diptera). Tại các vùng đất khác nhau ở Argentina với 268 chủng vi khuẩn *B.thuringiensis* đã phân tích và thử nghiệm độc tố, trong đó chọn ra 6 chủng vi khuẩn có khả năng phòng trừ *Epinotia aporema* (Joelma và ctv, 2014; Diego và Graciela, 2017). Bên cạnh đó, chủng HD521 với gen *cry7* có tinh thể hình tháp đôi, có khả năng ức chế sự phát triển của mầm bệnh với *Rhizoctonia solani* AG1IA và AG1IB, và diệt ấu trùng *Henosepilachna vigintioctomaculata* (Bộ Cánh cứng) (Li và ctv, 2015; Sun và ctv, 2021).

Ở Việt Nam, nghiên cứu quần thể *B. thuringiensis* được phân bố ở 12 tỉnh thành vùng Bắc Trung Bộ và Đồng bằng sông Hồng rất phong phú, đa dạng về hình thái tinh thể, về gen *cry*. Phân lập được 463 chủng *B. thuringiensis* có tinh thể hình tháp, hình cầu, hình kim,… trên tổng số 1.479 chủng *Bacillus* nhận được. Thành phần protein của các chủng cũng rất đa dạng. Trên gel polyacrylamide đã phát hiện protein 130 kDa của các chủng *B. thuringiensis* mang gen *cry1*; 130 kDa, 67 kDa, 28 kDa của *B. thuringiensis* mang gen *cry4;* và 70 kDa của các chủng *B. thuringiensis* mang gen *cry3*. Kết quả nghiên cứu sự đa dạng sinh học của chủng *B. thuringiensis* ở Việt Nam đã phát hiện 6 chủng vi khuẩn trong đất rừng ngập mặn có khả năng diệt ấu trùng các loại muỗi sốt rét *Anopheles minimus*, muỗi gây sốt xuất huyết *Aedes aegypti* và *Culex quinquefasciatus* (Nguyễn Thanh Cảnh, 2004; Lê Thị Minh Thành và ctv, 2005; Nguyễn Thiện Phú và Trần Thanh Thủy, 2013).

Có gần 525 loài thuộc 13 bộ côn trùng đã ghi nhận bị nhiễm *B. thuringiensis*, trong đó nhiều nhất là bộ cánh vảy (318 loài), sau đó là bộ hai cánh (59 loài), bộ cánh màng (57 loài), bộ cánh cứng (34 loài), nhện và cả tuyến trùng có từ 1 – 12 loài bị nhiễm vi khuẩn này (Nguyễn Xuân Thành, 2003). Kết quả Bảng 1.1 cho thấy các loài vi khuẩn *B. thuringiensis* ký sinh trên nhiều loài côn trùng, trên các loại cây trồng khác nhau đã được nhiều tác giả và ở nhiều quốc gia nghiên cứu.

Bảng 1.1 Tác động ký sinh côn trùng của các loài vi khuẩn *B. thuringiensis*

STT	***Bacillus* spp.**	**Côn trùng ký chủ**	**Tài liệu tham khảo**
1	*B. sphaericus*, *B. thuringiensis* var. *israelensis*	*Culex quinquefasciatus, C. pipiens, C. tarsalis*	Cohen và ctv, 2008
2	*B. thuringiensis* (BRL43, H14, IPS78/11)	*Acyrthosiphon pisum, Aedes aegypti, Autographa californica, Cacyreus marshalli, Epinotia aporema, Lobesia botrana, Manduca sexta, Manduca sexta, Pectinopho gossypiella, Pieris brassicae, Plutella xylostella, Rhizoglypus*	Naimov và ctv, 2001; Tigue và ctv, 2001 Jiménez-Juárez và ctv, 2007; Chandi và ctv, 2007; Hanan và ctv 2008; Porcar và ctv 2009.

		robini Spodoptera exigua, Spodoptera frugiperda *Helicoverpa armigera, Leishmania major, Manduca sexta*	
3	*B. thuringiensis* var. *berliner*	*Lygus hesperus*	Wellman-Desbiens và Cote, 2005.
4	*B.thuringiensis* finitimus B-1166 VKPM		Wojciechowska, 2009
5	*B. thuringiensis* var. *galleriae*	*Galleria mellonella L.*	Dubovskii và ctv, 2005
6	*B. thuringiensis* var. *israelensis* IPS78/11	*Lucilia cuprina, L. sericata, Calliphora stygia*	Chilcott và ctv, 1998
7	*B. thuringiensis* var. *sotto*	*Cabbage butter fly*	Iizuka và ctv, 1994
8	*B. thuringiensis* var. *kurstaki*	*Helicoverpa zea; Scrobipalpula absoluta;Malacosoma neustria; Lymantria dispar*	Vasquez và ctv, 1995; Kati và ctv 2007.
9	*B. thuringiensis* var. *kurstaki* (serotype H3a, 3b, 3c) strain BNS3	*Prays oleae , Epinotia aporema*	Rouis và ctv, 2007; Soares-da-Silva và ctv, 2014
10	BtkHD1 & BtkHD73	*Manduca sexta Heliothis irescens*	Aronson và ctv, 1999
11	*B. thuringiensis* var. *tolworthi*	*Spodoptera frugiperda, Ostrinia nubilali, Plutella xylostella, S.exigua*	Capalbo và ctv, 2001; Saey và Peferoen, 1996
12	*B. thuringiensis* var. *tenebrionis*	*Synanthropic mites*	Erban và ctv, 2009
13	*B. thuringiensis* var. *malayensis*	*Aedes aegypti,*	Joelma và ctv 2014
14	*B. thuringiensis* var. *linworthi*	*Helicoverpa armigera*	Tinatin và ctv, 2018

Việc nghiên cứu, sản xuất và ứng dụng *B. thuringiensis* đầu tiên được thực hiện năm 1973 tại Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Từ nhiều nghiên cứu cho thấy: các chủng *B. thuringiensis* 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 týp huyết thanh, và đặc biệt đa dạng về gen mã hóa protein diệt côn trùng bộ cánh vảy, cánh cứng, hai cánh, tuyến trùng hại cây trồng, diệt tế bào ung thư ở người. 3 gen *cry1 (cry1Aa, cry1Ab, cry1Ac, cry1B, cry1C, cry1E, cry1F)* chiếm 57 %*, cry2* - 5%*, cry4 (cry4A, cry4B)* - 43%, *cry8* - 8%.

1.2 Độc tố gây hại côn trùng của vi khuẩn *Bacillus thuringiensis*

1.2.1 Phân loại độc tố của vi khuẩn *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis khả năng sản sinh các protein có hoạt tính diệt sâu, khác nhau về cơ chế tác động, tính đặc hiệu và cơ chế biểu hiện. Các protein có tính diệt sâu này gồm: ngoại độc tố VIP (Vegetative Inserticidal Protein); nội độc tố bao gồm hai dạng là protein *cry* (crystalline) và các protein *cyt* (cytolitic) (Hofte và Whiteley, 1989). Dựa vào tính chuyên biệt của các nội độc tố đối với côn trùng và tính tương đồng xét trên trình tự của các độc tố, Hoftey và Whiteley (1989) đã phân gen tạo ra độc tố làm 4 loại như sau:

Ngoại độc tố α (α- exotoxin) bản chất là một enzyme gọi là phospholipase hoặc leucithinase, phân huỷ phospholipid ở mô của côn trùng, gây hiệu lực với các loài sâu thuộc bộ cánh vảy, bộ cánh cứng (Toumanoff, 1953). Ngoại độc tố β (β-exotoxin) được Halt và Arkawwa (1959) tìm ra khi nuôi ấu trùng ruồi nhà bằng thức ăn có chứa *B. thuringiensis,* ngoại độc tố β còn có phổ hoạt tính rộng, gây bệnh trên côn trùng thuộc bộ cánh vảy, cánh cứng và bộ hai cánh. Ngoại độc tố γ (γ - exotoxin) mang khối lượng phân tử thấp, mẫn cảm với nhiệt độ, ánh sáng và không khí, có khả năng tan trong nước.

Nội độc tố δ: Bản chất là một protein gồm 1.180 gốc amino acid, các amino acid chủ yếu là glutamic và aspartic, chiếm trên 20% tổng số amino acid trong phân tử protein, đây cũng chính là nguyên nhân gây ra điểm đẳng điện thấp. Lượng

cysteine nhỏ hơn 20% tổng acid amin quy định sự không hoà tan của tinh thể, ngoài ra còn có các amino acid: arginine, threonine, leucine, isoleucine (Abad và ctv, 2002).

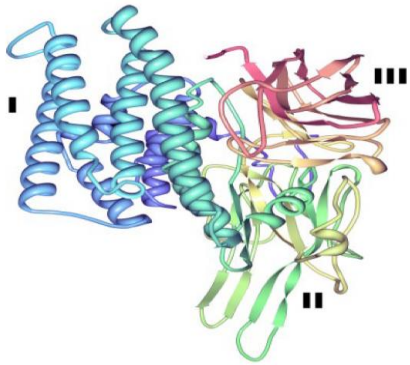
Nội độc tố δ có đặc điểm không hòa tan trong các dung môi hữu cơ, không tan trong nước, rất bền nhiệt. Khi đun ở 65°C trong một giờ không bị mất hoạt tính, chỉ khi đun ở 100°C trong 30 – 40 phút thì tinh thể bị mới mất tính độc. Mặc dù tinh thể độc có thể tan ở pH kiềm, nhưng không phải pH kiềm nào cũng thích hợp. Qua nghiên cứu các nhà khoa học nhận thấy rằng, pH quá cao hay quá thấp cũng đều ảnh hưởng tới độc tính của tinh thể. Tuy nhiên lúc mới tách ra khỏi bào tử, nó có thể hòa tan ở pH rất kiềm. Sự tổng hợp tinh thể độc và bào tử xảy ra gần như đồng thời trong khoảng 3 giờ sau pha cân bằng (Klier, 1985; Ngô Đình Bính, 2005).

So với nhóm ngoại độc tố, tinh thể độc *cry* được tạo ra nhiều hơn và có tác động chủ yếu diệt côn trùng. Tinh thể độc *cry* còn được gọi là nội độc tố δ (δ - endotoxin) là một protein kết tinh có kích thước khác biệt nhau tùy từng nhóm, gây hiệu quả diệt côn trùng mạnh nhất. Tinh thể độc được tạo ra khi khởi đầu quá trình hình thành bào tử tích lũy từ chính protein trong tế bào, có liên hệ mật thiết với màng bào tử (Phạm Văn Ty và Vũ Nguyên Thành, 2007).

1.2.2 Gen *cry* của vi khuẩn *Bacillus thuringiensis*

Vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* gây bệnh cho côn trùng qua đường tiêu hóa. Bào tử nảy mầm dẫn đến sự sinh sản của vi khuẩn trong cơ thể vật chủ làm côn trùng chết, song yếu tố chính làm cho côn trùng chết nhanh là độc tố do vi khuẩn sinh ra. Các chủng khác nhau thuộc loài *B. thuringiensis* sinh ra hai loại độc tố chính: độc tố tinh thể (*cry*) được mã hóa bởi các gen *cry* khác nhau (đây cũng là một dấu hiệu để phân loại các nhóm *B. thuringiensis*); các chất độc phân giải tế bào (*cyt*) tác động riêng rẽ và tổ hợp cùng *cry* làm tăng tác dụng của tinh thể độc. Các gen *cry* thường nằm trên các plasmid có hệ số sao chép thấp. Số lượng plasmid dao động từ 2 đến 12 trong 21 loài phụ *B. thuringiensis* (Carlton và Gonzalez, 1985). Để xác định sự tồn tại gen *cry* trong các chủng *B. thuringiensis* phân lập, sử dụng kỹ thuật PCR với các cặp mồi đặc hiệu với các gen đó. Các tinh thể diệt côn trùng được mã hóa bởi rất nhiều gen *cry* khác nhau. Hiện nay, hơn 200 gen *cry* đã được

mô tả và phân loại thành các nhóm dựa vào hoạt tính diệt côn trùng và trình tự amino acid. Các chủng mang gen *cry1* sẽ nhận được sản phẩm PCR kích thước 490 bp và 980 bp; các chủng mang gen *cry4* sẽ nhận được sản phẩm PCR 690 bp và 1290 bp; còn các chủng mang gen *cry3* sẽ nhận được sản phẩm PCR 649 bp và 1060 bp. Tuy nhiên, hầu hết mối quan tâm đều tập trung vào nhóm gen *cry1, cry3, cry4* (Li và ctv, 1991; Hernandez và Ferre, 2005). Các protein tinh thể được hình thành ở cuối quá trình hình thành bào tử và có cấu trúc chung gồm 3 vùng riêng biệt (Hình 1.2).



Hình 1.2 Mô hình cấu trúc protein tinh thể độc tố *cry* (Palma, 2014).

Vùng 1: là một chuỗi polypeptide gồm 290 amino acid, đây là vùng đầu N. Mặt bên của chuỗi xoắn thứ nhất và thứ 7 là các amino acid kị nước và nó nằm liền kề với vùng 2.

Vùng 2: bắt đầu từ amino acid 291 đến amino acid 500. Vùng này gồm 3 tấm *β* có cấu trúc tương đồng, song song và xếp ngược chiều nhau, trong đó tấm 1 và tấm 2 có tính tương đồng cao hơn. Vùng 2 là vùng không bền vững của độc tố.

Vùng 3: có chứa 2 cuộn xoắn, các tấm *β* đối song song tạo thành một kẹp *β* (*β-sandwich*) hình học topo gọi là "*jelly roll*", tham gia vào việc gắn thụ thể (Li và ctv, 1991).

Thành phần protein tinh thể của *B. thuringiensis* không những quyết định hoạt lực diệt côn trùng mà còn liên quan đến sự tồn tại các lớp gen *cry* (Bảng 1.2). Các protein 130 kDa do gen *cry1* mã hoá diệt côn trùng cánh vảy. Gen *cry3* mã hoá protein có trọng lượng phân tử thấp hơn (66 – 73 kDa), diệt côn trùng cánh cứng.

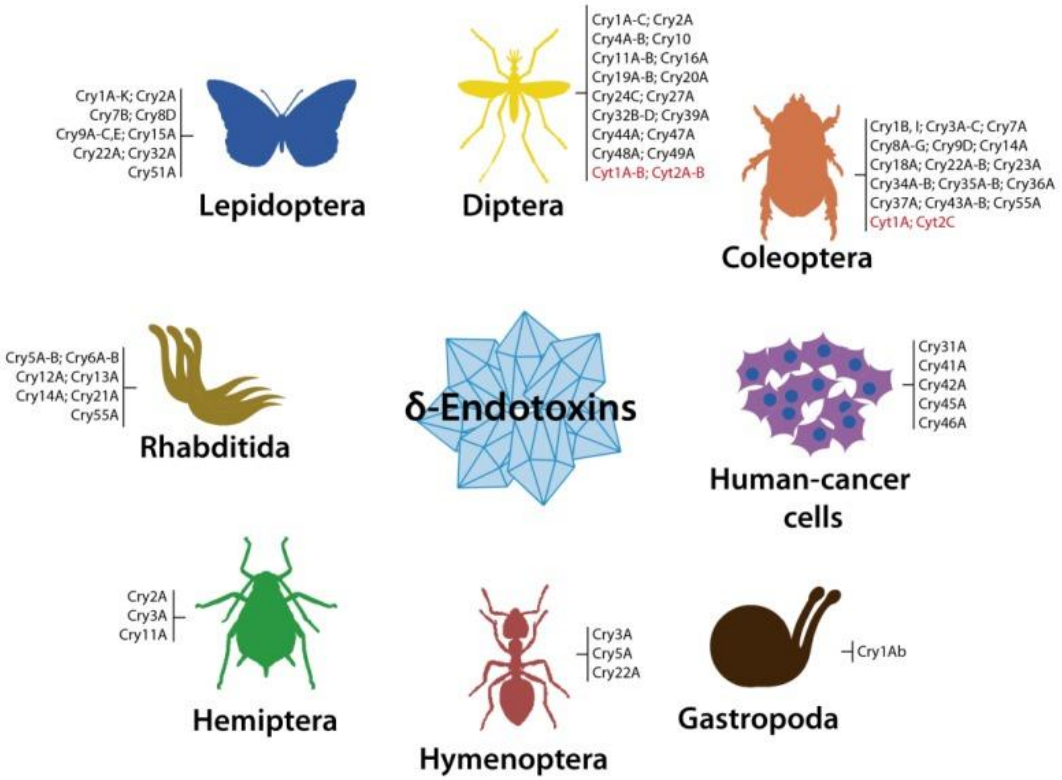
Protein tinh thể diệt côn trùng bộ hai cánh đa dạng nhất bao gồm các protein 130 kDa, 128 kDa, 67 kDa, 28 kDa do gen *cry4, cry10, cry11* mã hoá. Các protein này đều có hoạt lực diệt ruồi, muỗi, tuy nhiên mức độ gây độc khác nhau. Trong mỗi vùng sinh thái thường hiện diện những loài và chủng *B. thuringiensis* mang nhiều gen *cry* khác nhau, vì vậy việc thu mẫu từ nhiều vùng đất khác nhau sẽ giúp phân lập nhiều gen *cry* bản địa có thể gây độc cho côn trùng khác không thuộc bộ cánh vảy (Uribe và ctv, 2003; Swamy, 2011).

Bảng 1.2 Mối quan hệ giữa các lớp gen *cry*, protein, hình dạng tinh thể và hoạt lực diệt côn trùng (Hofte và Whiteley, 1989; Lereclus và ctv, 1989)

Lớp gen *cry*		**Protein (trọng lượng phân tử kDa)**	**Hình dạng tinh thể**	**Hoạt lực diệt côn trùng**
cry1	A	131 hay 133	Hình tháp đôi	Bộ cánh vảy
	B	138	Hình tháp đôi	
	C	135	Hình tháp đôi	
	D	133	Hình tháp đôi	
	E	133	Hình tháp đôi	
cry2	A	71	Hình tròn	Cánh vảy/Hai cánh
	B	71	Hình tròn	Bộ cánh vảy
cry3	A	73	Hình tháp đôi	Bộ cánh cứng
	B	74	Hình tháp đôi	
	C	129	Hình tháp đôi	
	D	73	Hình tháp đôi	
cry4	A	134	Không đồng nhất	Bộ hai cánh
	B	128	Không đồng nhất	
	C	78	Không đồng nhất	
	D	72	Không đồng nhất	
cry5		81	Hình tháp đôi	Cánh vảy/cánh cứng
cyt	A	28		

Theo xếp loại protein tinh thể độc tố *cry4* và *cyt* đặc hiệu với côn trùng bộ Diptera. Kết quả nghiên cứu diệt bọ gậy cho thấy, *B. thuringiensis* tạo ra 4 nhóm tinh thể nội độc tố gồm các *cry4B, cry4A, cry11Aa* và *cyt1Aa*. Tất cả các protein đều độc với muỗi, tuy nhiên nếu có đầy đủ và tương tác của các protein *cytAa* và *cry4, cry11* sẽ tạo ra độc tính mạnh hơn (Tanada và Kaya, 1993; Glare và O'Callaghan, 1998).

Độc tính của *B. thuringiensis* được ghi nhận đến côn trùng bộ Lepidoptera, Diptera, Coleoptera, Hymenoptera, Hemiptera, Isoptera, Orthoptera, Siphonoptera, Thisanoptera, nhện và cả tuyến trùng *Bacillus thuringiensis* sản sinh những tinh thể có tính độc trong giai đoạn hình thành bào tử (Hình 1.3; Palma, 2014).



Hình 1.3 Tinh thể cry của vi khuẩn *B. thuringiensis* ảnh hưởng đến các bộ côn trùng (Palma, 2014).

Xavier (2007) đã phân lập được 30 chủng *B. thuringiensis* mang gen *cry1* có khả năng diệt sâu xanh *Helicoverpa armigera*. Đặc biệt là 2 chủng BTRX24 (Rathinam Xavier 24) và BTRX28 (Rathinam Xavier 28) có độc tính mạnh hơn các

chủng còn lại, có sự hiện diện của nhiều gen *cry* và có khả năng diệt sâu tơ. Cùng năm đó, Kati và ctv đã phân lập được 1 chủng vi khuẩn từ loài *Melolontha melolontha,* kết quả cho thấy chủng này mang gen *cry3* và có nhiều sự tương đồng với *B. thuringiensis* var. *tenebrionis*.

Khi chuyển độc tố "*cry"* vào các cây trồng chuyển gen, một số nghiên cứu cho rằng côn trùng đã phát triển sức đề kháng chống lại một số các độc tố này. Với các nghiên cứu như: về sức đề kháng của sâu bệnh trên cây bông đối với độc tố *cry1Ac* của vi khuẩn *B. thuringiensis* (Akhurst và ctv, 2003); Zaidi (2005) đã tạo cây thuốc lá biến đổi gen, *Nicotiana tabacum* với *cry2A* để bảo vệ chống lại *Heliothis virescens*. Tuy nhiên, thông tin về gen *cry2* vẫn còn hạn chế. Điều này dẫn đến, cần phải tìm kiếm nhiều hơn nữa các chủng mới và có phạm vi tác dụng mạnh hơn, đặc biệt là các mẫu trên thế giới chưa có. Việt Nam là một trong những khu vực cần được khám phá các chủng mới với phạm vi rộng lớn hơn.

1.2.3 Gen *cyt* của vi khuẩn *Bacillus thuringiensis*

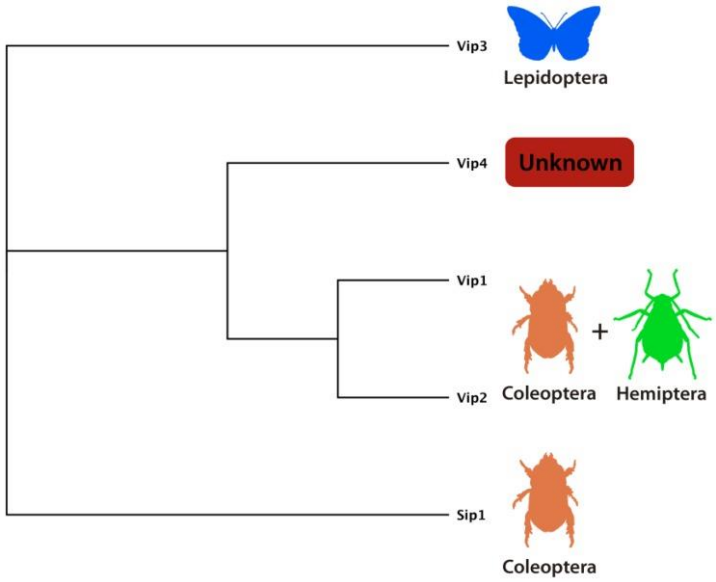
Gen *cyt* là nhóm gen độc tố phân giải tế bào, chúng có tác động riêng lẻ hoặc kết hợp cùng với nhóm gen *cry* để làm tăng tính độc của tinh thể. Gen *cyt* mã hóa cho proein 27 kDa và chiếm khoảng 40 – 50% tinh thể, bao gồm các ngoại độc tố (sản phẩm tiết ra của vi khuẩn) đã được khám phá: beta-exotoxin, alpha-exotoxin và độc tố gamma-exotoxin (Phạm Văn Ty và Vũ Nguyên Thành, 2007). Gen *cyt* có 45 gen thuộc 3 lớp *cyt*1*, cyt*2 và *cyt*3 mã hóa protein gây độc đối với côn trùng và động vật không xương sống.

1.2.4 Gen mã hóa protein *vip* của vi khuẩn *Bacillus thuringiensis*

Ở một số chủng vi khuẩn *B. thuringiensis* trong pha sinh trưởng, sinh dưỡng của tế bào đã sản sinh ra một số protein diệt được sâu. Các protein này gọi chung là vip (Vegetative Insecticidal Protein), các độc tố *vip* này không phải là protein tinh thể mà là protein tiết từ tế bào (Ngô Đình Bính và ctv, 2013).

Loại độc tố *vip* được phát hiện lần đầu tiên là v*ip3a* và *vip3b* do Estruch và ctv (1996). Đến nay, người ta đã phát hiện được 85 gen *vip* thuộc bốn nhóm khác nhau, trong đó đáng chú ý nhất là gen *vip3a* mã hóa protein 88 kDa có hoạt tính diệt đối

với côn trùng bộ cánh vảy, độc tố này cũng chính là nguyên nhân gây phân giải tế bào biểu mô ruột giữa của côn trùng. *Vip3a* có khả năng gây bệnh đối với một loạt các côn trùng thuộc bộ cánh vảy và đặc biệt hơn, gen này còn có khả năng ảnh hưởng đến một số loài ít nhạy cảm với một số gen *cry1A* (*Agrotis ipsilon, Spodoptera exigua và S. frugiperda*). Cho đến nay gen *vip3* được chia ra làm 3 nhóm lớn là *vip3a, vip3b, vip3c*, tuy nhiên các nhà khoa học chưa thể đưa ra cấu trúc 3D chính xác của các protein này (Estruch và ctv, 1996). Gen mã hóa cho protein *vip* có khả năng diệt côn trùng phổ rộng, độc tố cao và chưa phát hiện được loại côn trùng có khả năng kháng độc tố này (Hình 1.4, Estruch và ctv, 1996).



Hình 1.4 Gen mã hóa protein vip của vi khuẩn *B. thuringiensis* gây chết các bộ côn trùng (Estruch và ctv, 1996).

Gen *vip3a* khi vào trong dịch ruột non của côn trùng thường tạo thành 4 sản phẩm protein lớn với trọng lượng phân tử khoảng 22, 23, 45 và 66 kDa. Trọng lượng của protein này có thể dao động trong khoảng 62 – 66 kDa và luôn có mặt trong các protein vip3 khác nhau. Ngoài ra, cả trong thí nghiệm lẫn thực nghiệm cho thấy mức độ kháng chéo giữa *vip3a* và *cry1* là rất thấp. Những đặc tính của *vip3a* mở ra khả năng ứng dụng rất cao trong việc sử dụng thuốc trừ sâu vi sinh có

nguồn gốc từ *B. thuringiensis* trên một số lượng lớn các loài gây hại hiện nay trên cây trồng (Palma, 2014).

1.2.5 Cơ chế tác động của vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* đối với côn trùng

Nghiên cứu mô học đã chứng minh cơ chế gây bệnh của *B. thuringiensis* đặc biệt tại hệ thống tiêu hóa của côn trùng. Thông qua đường tiêu hóa, tinh thể độc và bào tử đi vào cơ thể côn trùng sau khi chúng ăn phải vi khuẩn. *B. thuringiensis* gây tê liệt hoạt động của ruột giữa làm giảm sự hấp thụ dinh dưỡng, mất sự thèm ăn, bỏ ăn và tê liệt hoàn toàn dẫn đến con trùng chết với triệu chứng thường thấy là ấu trùng có màu đen (Liliana, 2013)..

Độc tính của tinh thể độc tố còn phụ thuộc vào sự hiện diện của các thụ thể trên màng ruột của côn trùng. Khi các thụ thể được gắn vào tinh thể độc sẽ tạo nên những lỗ dò cho ion và nước đi qua, sự kết hợp đã làm biến dạng cấu trúc màng ruột, làm thay đổi áp suất bên trong và ngoài dẫn đến sự phá vỡ tế bào, làm cho cơ thể sâu phình to và các tế bào bị phân giải, côn trùng ngừng ăn và chết (Herrero và ctv, 2004; Sousa và ctv, 2010; Liliana, 2013).

Gen gây độc của vi khuẩn *B. thuringiensis* là chất độc đường tiêu hóa, chỉ có hiệu quả khi sâu hại ăn đủ lượng. Nếu cơ thể côn trùng có cơ chế giải độc, sau khi có sự xâm nhập của *B. thuringiensis* nhờ cơ chế giải độc nên đường tiêu hóa có thể phục hồi. Trường hợp, sâu có pH > 8,9 và cơ thể không có cơ chế tự giải độc thì khi *B. thuringiensis* xâm nhập sẽ tác động vào đường tiêu hóa. Nhờ protease - một men tiêu hóa trong dịch ruột của sâu xử lý các nội độc tố 130 – 140 kDa thành các mảnh độc có kích thước 60 – 65 kDa. Các mảnh độc bám vào các thụ thể trên màng tạo thành các kênh ion và lỗ chân lông làm sốc thẩm thấu (Ngô Đình Bính và ctv, 2010).

Bào tử *B. thuringiensis* không thường xuyên lan rộng tới các côn trùng khác hoặc gây bệnh bộc phát trên các ký chủ như đã xảy ra với nhiều mầm bệnh. Các nghiên cứu và khám phá về phổ kháng của *B. thuringiensis* cho thấy *B. thuringiensis* không chỉ gây độc ấu trùng của bộ cánh vảy mà còn gây độc cả với ấu trùng của bộ cánh cứng và hai cánh. Theo Chilcott và ctv (1993) tác động của vi

khuẩn *B. thuringiensis* đến bọ gậy trong vòng 1 giờ bọ gậy sẽ ngừng ăn, sau 2 giờ giảm hoạt động, mất hoạt động trong vòng 4 giờ và bị tê liệt trong vòng 6 giờ.

1.2.6 Các nghiên cứu về vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* trong và ngoài nước

1.2.6.1 Nghiên cứu về gen *cry*

Sun và Park (2010) tìm thấy *cry60Ba* từ var. *malayensis* có độc tính đối với muỗi. Liu và ctv (2010) đã tạo chủng BIOT185 có khả năng gây chết bọ hung từ chủng HBF-1 chứa *cry8ca2* và BTO 185 chứa *cry8Ea1*. Wang và ctv (2008) tạo 1 chủng mới bởi chuyển gene *cry3Aa7* vào chủng UV17 chứa *cry1Aa, cry1Ac, cry1Ca* và *cry2Ab*, nhằm gây bệnh cho côn trùng ở bộ cánh vảy và cánh cứng. Tính gây độc của *cry* có thể được tạo đột biến điểm tại vùng mã hóa protein hoặc đột biến đoạn tại vùng N-terminal (Pardo, 2009).

Kết quả nghiên cứu của Joelma và ctv (2014) với 5 gen độc tố *cry4Aa, cry4Ba, cry10Aa, cry11Aa và cry11Ba* trong việc phòng trừ *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) ở nồng độ LC_{50} (95%) 0,0011 – 0,0014.10^5 (mật số vi khuẩn Bt 7,16 x 10^4 CFU/ml). Diego và Graciela (2017), với 2 nhóm gen độc tố *cry1Aa, cry1Ab, cry1Ac, cry1la, cry2Aa, cry2Ab*, *vip3Aa* với nồng độ LC_{50} (95%) 0,69 – 0,79 µg/ml và *cry1Aa, cry1Ac, cry1la, cry2Aa, cry2Ab*, *vip3Aa* với nồng độ LC_{50} (95%) 0,11 – 0,50 µg/ml gây chết *Epinotia aporema* (Lepidoptera).

Sự tồn tại của bào tử trong đất và nước phụ thuộc vào dạng sản phẩm gồm tinh thể hoặc bào tử. Độc tính dưới da cho chuột trong phòng thí nghiệm là 10^6 bào tử, hay 10^7 bào tử theo đường mũi (Siegel, 2001), tương đương 10^{12} ở người cao hơn 1 triệu lần liều lượng phun trên đồng ruộng.

Trên cơ sở phát hiện, tách chủng và đọc trình tự gen có trong các chủng *B. thuringiensis* phân lập tại Việt Nam, đã tách chủng và biểu hiện gen mã hóa tổng hợp protein *cry1C* và *cry1D* diệt sâu khoang trong *E. coli* thu được các protein tái tổ hợp có hiệu quả diệt sâu cao hơn so với đối chứng (Ngô Đình Bính và ctv, 2005).

Khi mô tả về khả năng sinh trưởng, hình thành bào tử cũng như khả năng diệt sâu xanh và sâu tơ, các chủng B. *thuringiensis* đều có tinh thể hình tháp đôi và chứa các gen *cryIA(a), cryIA(b)* tổng hợp protein có trọng lượng phân tử 130 kDa. Qua

quá trình nghiên cứu, 4 chủng *B. thuringiensis* đều có khả năng gây chết đối với sâu tơ với LC_{50} (0,42; 0,23; 0,87; 0,07) trong đó khả năng diệt sâu xanh của 4 chủng tương ứng là 1,09; 2,3; 3,44; 4,15. Các chủng trên đều tạo bào tử sau 34 – 40 giờ nuôi cấy và đạt được lượng bào tử khoảng 0,66 – 0,78 x 10^9 bào tử/ml. Các chủng đều chứa gen *cryIA(a), cryIA(b)* tổng hợp protein có trọng lượng phân tử 130 kDa (Nguyễn Thị Hoài Hà và Ngô Giang Liên, 2003)

1.2.6.2 Nghiên cứu về khả năng chống chịu UV

Xue và Nicholson (1996) đã chứng minh rằng các bào tử của *B. subtilis* dễ bị ảnh hưởng bởi bức xạ mặt trời và với tia cực tím ở bước sóng 254 nm (UV-C). Vi khuẩn *B. thuringiensis* hoạt động chậm, rất nhạy cảm đối với bức xạ UV và có thể chết khi tiếp xúc với tia tử ngoại và ion hóa, với các protein liên kết chéo bởi các gốc hydroxyl và bức xạ ion hóa, đặc biệt là tia cực tím UV-B (280 – 315nm). Do đó, bảo vệ bào tử của vi khuẩn *B. thuringiensis* khỏi tác động bức xạ mặt trời sẽ giữ độc tính của vi khuẩn bền vững (Jones và ctv, 1991; Pusztai và ctv, 1991; Garcia-Pichel và Castenholz, 1993; Xue và Nicholson, 1996). Bên cạnh đó, bằng cách chiếu tia UV đã tạo ra các dòng vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* đột biến có khả năng phòng trừ *Helicoverpa armigera* và *Spodoptera litura* (Saxena và ctv, 2002; Zhang và ctv, 2009).

Năm 2002, Deepak và ctv đã gây đột biến vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* bằng cách chiếu xạ tia UV ở bước sóng 254 nm và 365 nm, thời gian 48 – 72 giờ nhiệt độ 28^0C để sản sinh melanin (Bt-m: Btk gây đột biến sản sinh melanin) phòng trừ *Helicoverpa armigera* và *Spodoptera litura*. Với nồng độ LC_{50} (ng) của Bt-m giảm 62,5% so với *B. thuringiensis* var. *kurstaki* trong phòng trừ *Helicoverpa armigera* và *Spodoptera litura*. Và melanin chỉ sản sinh ở độc tố *cry1Ac,* nhưng rất ít ở *cry1Aa, cry2Aa, cry2Ab.* Zhang và ctv (2008) đã sử dụng tia cực tím chiếu xạ trong 4 giờ với chủng *B. thuringiensis* mang gen *cry1Aa* đạt hiệu quả phòng trừ *Helicoverpa armigera* 98,7%.

Việc sử dụng chiếu xạ tia UV ở hai bước sóng 254 nm và 366 nm làm mất khoảng 35% độc tính của chủng vi khuẩn *B. thuringiensis* var *kurstaki* đối với

Helicoverpa armigera, Spodoptera exigua, Spodoptera littoralis so với chủng gây đột biến bằng tia UV sản sinh ra melanin, chỉ giảm 5% độc tính. Tuy nhiên, việc sản sinh ra melanin làm nó có thể mất đi 3 gen độc tố *cry1Aa, cry2Aa* và *cry2Ab* (Saxena và ctv, 2001; Myasnik và ctv, 2001; Zang và ctv, 2007).

1.2.7 Các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình nhân sinh khối vi khuẩn *B. thuringiensis*

Saoussen và ctv (2013) đã xác định tinh bột, bột đậu nành và sodium chloride ảnh hưởng đến lượng delta – endotoxin trong môi trường dinh dưỡng lỏng. Sử dụng phù hợp môi trường sẽ cải tiến giúp tăng 50% lượng delta – endotoxin so với môi trường cơ bản, đặc biết đối với những chủng *B. thuringiensis* tạo ít bào tử. Còn theo Plackett và ctv (2013) thì tinh bột, bột đậu nành, và sodium chloride ảnh hưởng đến lượng nội độc tố delta trong môi trường dinh dưỡng lỏng. Sử dụng phù hợp môi trường cải tiến giúp tăng 50% lượng nội độc tố delta so với môi trường cơ bản, đặc biệt đối với những chủng *B. thuringiensis* tạo ít bào tử.

Mặt khác, nghiên cứu cho thấy enzyme thủy phân tạo bởi *B. thuringiensis* bị ảnh hưởng rất nhiều từ nguồn carbon và đạm tham gia vào chu trình chuyển hóa đường và ion kim loại. Li và Yousten (1975) xác định *B. thuringiensis* var. *kurstaki* gia tăng sản sinh protease trong môi trường khi cung cấp Mn^{2+}, K^{+}. Phân tích cho thấy bột đậu nành, $MnSO_4$, $MgSO_4$ ảnh hưởng thuận đến lượng δ-endotoxin và hoạt tính phân giải protein; trong khi tinh bột và $FeSO_4$, K_2HPO_4 có ảnh hưởng nghịch đến lượng protease sản sinh, ngoài ra KH_2PO_4 còn gây ảnh hưởng ngăn cản.

Ảnh hưởng rõ nét của cystine và cysteine đến sự hình thành tinh thể độc tính và bào tử kháng nhiệt của *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* khi bổ sung một tỷ lệ thấp cystine/cysteine (0,05% w/v) vào môi trường. Khi tăng 0,15% cystine/cysteine chỉ có bào tử hình thành, nhưng không hiện diện tinh thể protein. Tăng lượng cystine/cysteine đến 0,25%) sẽ ngăn cản sự sản sinh protein độc và cả bào tử. Qua đó, thúc đẩy sự sản sinh bào tử của vi khuẩn *B. thuringiensis* khi dùng 0,2 mM sodium sulphate, zinc sulphate, lead, copper, cadmium, cobalt acetate hoặc 0,2%

potassium pyruvate, citrate, cisaconitate, oxalosuccinate, keto-glutarate, succinate, fumarate, malate, oxalacetate môi trường lên men (Rajalakshmi và Shethna, 1980).

Ảnh hưởng của polysaccharides pectin và xylan thực vật đối với sự hình thành màng sinh học và các hoạt động diệt côn trùng của các chủng *B. thuringiensis*. Pectin thúc đẩy màng sinh học được tạo thành bởi tế bào *B. thuringiensis* trong giai đoạn tăng trưởng logarit và giai đoạn ổn định ở bề mặt phân cách không khí - lỏng, trong khi nó ức chế màng sinh học do tế bào *B. thuringiensis* hình thành trong pha bào tử ở bề mặt phân cách không khí-lỏng. Pectin không làm thay đổi sự phát triển sống tự do và khả năng vận động của tế bào của các chủng *B. thuringiensis*. Pectin có thể cải thiện các hoạt động kiểm soát sinh học của hỗn hợp protein tinh thể diệt côn trùng bào tử của thuốc trừ sâu thương mại *B. thuringiensis* và *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, cũng như các màng sinh học được hình thành bởi giai đoạn tăng trưởng logarit hoặc giai đoạn ổn định của tế bào *B. thuringiensis* (Li và ctv, 2021).

Môi trường với các thành phần như rỉ mật đường, bã bắp, $CaCO_3$, bã đậu nành, bột hạt bông vải, bột cá, tinh bột, lúa mì, bột vỏ lúa, và lượng bào tử hình thành bị ảnh hưởng của các nguyên tố vi lượng như Mn^{2+}. Thu nhận lượng nội độc tố cao khi bổ sung carbohydrate (20g/l) và protein (12,5g/l) vào hệ thống fermenter (600 lít) (Vecht, 1989). Đường được xem là nguồn cung cấp năng lượng quan trọng trong lên men *B. thuringiensis*, quá nhiều đường sẽ làm tích lũy hạt polyhydroxybutyrate trong tế bào và sự hình thành tinh thể protein độc tính. Kết quả nghiên cứu của Li và ctv (2021) thông qua việc sử dụng thứ cấp chất thải thực vật thải ra làm môi trường lên men thô, tinh bột hòa tan (6 g/l), bột đậu nành (6 g/l), Al^{3+} (0,4 g/l) và Fe^{2+} (0,4 g/l) là các chất phụ gia ngoại sinh tối ưu và điều kiện lên men ở pH 7,0, nhiệt độ 35°C và sục khí 80 ml /250 ml. Kết quả kiểm tra hoạt tính sinh học cho thấy chủng Bt được điều chế bằng phương pháp canh tác rẻ tiền vẫn thể hiện hiệu quả diệt côn trùng tốt trên *Helicoverpa armigera* so với môi trường LB tiêu chuẩn.

Vi khuẩn *B. thuringiensis* ít bị ảnh hưởng khi pH trong môi trường từ 5,5 đến 8,5 và khi ở điều kiện trung tính hoặc kiềm nhẹ thì thích hợp cho tạo bào tử. Trong

môi trường nhân sinh khối hợp lý, thời gian tạo bào tử hoàn thành và chuyển sang giai đoạn phân hủy khoảng 18 – 24 giờ, thu sản phẩm trong 4 – 5 giờ trước khi xảy ra sự phân hủy. Nhiều trường hợp cho thấy mật số tế bào, lượng bào tử hình thành, và lượng protein độc tính không có mối tương quan, tuy nhiên tốc độ sinh trưởng và hình thành bào tử là thông số quan trọng cho thí nghiệm thành công.

Các yếu tố ảnh hưởng tới quá trình sinh trưởng và phát triển của *B. thuringiensis* đều ảnh hưởng đến quá trình sinh độc tố như: nhiệt độ, pH, Oxy, môi trường lên men. Để quá trình lên men *B. thuringiensis* đạt hiệu quả cao nhất thì việc nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng đến sự hình thành bào tử và tinh thể độc là rất cần thiết.

1.3 Ứng dụng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* trong sản xuất nông nghiệp

Hiện nay, vi khuẩn *B. thuringiensis* được sử dụng để tạo chế phẩm sinh học, trong đó thuốc trừ sâu vi sinh đã được lựa chọn, bản chất là việc sử dụng độc tố ở dạng tinh thể hay bào tử của vi khuẩn để tiêu diệt côn trùng có hại. Trong đó thuốc BVTV *B. thuringiensis* thuộc nhóm trừ sâu vi sinh có nhiều ưu điểm đối với cây trồng và an toàn với môi trường được nhiều người lựa chọn.

Sản phẩm thương mại chứa vi khuẩn *B. thuringiensis* được sản xuất dựa vào 2 quy trình kỹ thuật chính nhằm gia tăng hiệu quả sản phẩm và hiệu lực của vi khuẩn. Đó là quy trình dựa vào kỹ thuật lên men và quy trình thu hồi vi khuẩn.

Dạng dung dịch thì thuận lợi trong sản xuất nhưng khó tồn trữ; dạng bột dễ vận chuyển và tồn trữ nhưng chi phí cao, do làm khô nên khó hòa tan khi sử dụng. Như vậy, sử dụng các chất phụ gia thích hợp giúp ngăn cản sự lắng đọng kết tủa và kéo dài thời gian tồn trữ, tăng độ hòa tàn và ngăn cản quá trình quang hóa.

Ở Việt Nam thuốc trừ sâu sinh học được sử dụng nhiều, đặc biệt có nguồn gốc từ vi khuẩn *B. thuringiensis*. Với vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* có khoảng 30 sản phẩm thương mại khác nhau trên thị trường đã và đang được sử dụng rộng rãi tại các vùng trồng rau sạch trên cả nước trong phòng trừ các loại sâu hại rau như sâu khoang, sâu xanh, sâu tơ, sâu cuốn lá. Việc sử dụng chế phẩm từ vi khuẩn *B. thuringiensis* như thuốc bảo vệ thực vật thông thường dễ bị ảnh hưởng bởi các yếu tố môi trường bên ngoài, nhất là bức xạ mặt trời làm giảm độc tố và thời gian

tồn tại (Beegle và ctv, 1981; Pozsgay và ctv, 1987; Pusztai và ctv, 1991; Cohen và ctv, 1991).

Trên thực tế, chế phẩm sinh học từ Bt chỉ được sản xuất bằng cách lên men (Bernhard và Utz, 1993). Để đạt được hiệu quả sản xuất chế phẩm công nghiệp, cần phải cải tiến quy trình sản xuất, đặc biệt bằng cách thiết kế môi trường nuôi cấy phù hợp với quy mô lớn (Kanekar và ctv, 2002). Các nguyên liệu như bột cá, rượu ngô, chất thải dừa, cám gạo và mật đường cũng đã được sử dụng trong sản xuất chế phẩm Bt (Saalma và ctv, 1983; Lee và Seleena, 1991; Zouari và ctv, 1998). Quá trình lên men phân hủy chất hữu cơ thành chất đơn giản hơn, là một bước quan trọng trong công nghệ sinh học công nghiệp. Phương pháp truyền thống dựa trên việc tối ưu từng yếu tố tuy đơn giản, dễ thực hiện nhưng tác động chung của các yếu tố không xác định được. Đây là vấn đề rất quan trọng trong lên men quy mô lớn. Hiện nay, nhiều phương pháp toán học quy hoạch thực nghiệm, đã cho phép xác định chính xác mức tối ưu của nhiều yếu tố và mức độ ảnh hưởng của các yếu tố đến sinh khối vi khuẩn thu nhận. Phương pháp này làm cho việc thực hiện mang lại hiệu quả cao, chi phí thấp; cho phép nghiên cứu sự tương tác và tiên đoán đạt được giá trị tối ưu của các yếu tố theo Plackett-Burman (Plackett và Burman, 1946). Bên cạnh đó, phương pháp đáp ứng bề mặt cũng đã được sử dụng rộng rãi.

1.3.1 Thuốc bảo vệ thực vật nguồn gốc *Bacillus thuringiensis*

Việc dùng thuốc hóa học để kiểm soát sâu hại trên cây trồng đã có nhiều tác động xấu đến môi trường sống, quần thể thiên địch trong tự nhiên, làm gia tăng khả năng kháng thuốc của sâu hại, khó phòng trị sâu hại nếu chỉ sử dụng biện pháp phun thuốc hóa học đơn thuần (Lin, 1974; Whalon và ctv, 2011; Kathirvelu và ctv, 2012).

Chế phẩm sinh học *B. thuringiensis* xuất hiện vào giữa những năm 1970 là loại thuốc cho hiệu lực khả quan trong phòng trị sâu, ít ảnh hưởng nhất đối với môi trường, bảo vệ thiên địch và các loài động vật có ích, ngoài ra còn mang lại hiệu quả kinh tế cao nhất cho người dân (Tasbashnik, 1990). Thuốc trừ sâu sinh học sản xuất từ *B. thuringiensis* trên thị trường thế giới chiếm đến 90% tổng số thuốc trừ sâu sinh học nói chung. Đa số các sản phẩm *B. thuringiensis* chứa nội độc tố delta và nội bào tử

còn sống. Các thuốc *B. thuringiensis* chủ yếu diệt côn trùng thuộc bộ cánh vảy, cánh cứng và hai cánh. Cho đến nay khoảng hơn 130 giống côn trùng thuộc 3 bộ trên đã được được kiểm soát (Dean, 1984). Có nhiều chủng *B. thuringiensis* khác nhau, mỗi loại tạo ra một loại protein độc tố cho từng nhóm sâu hại.

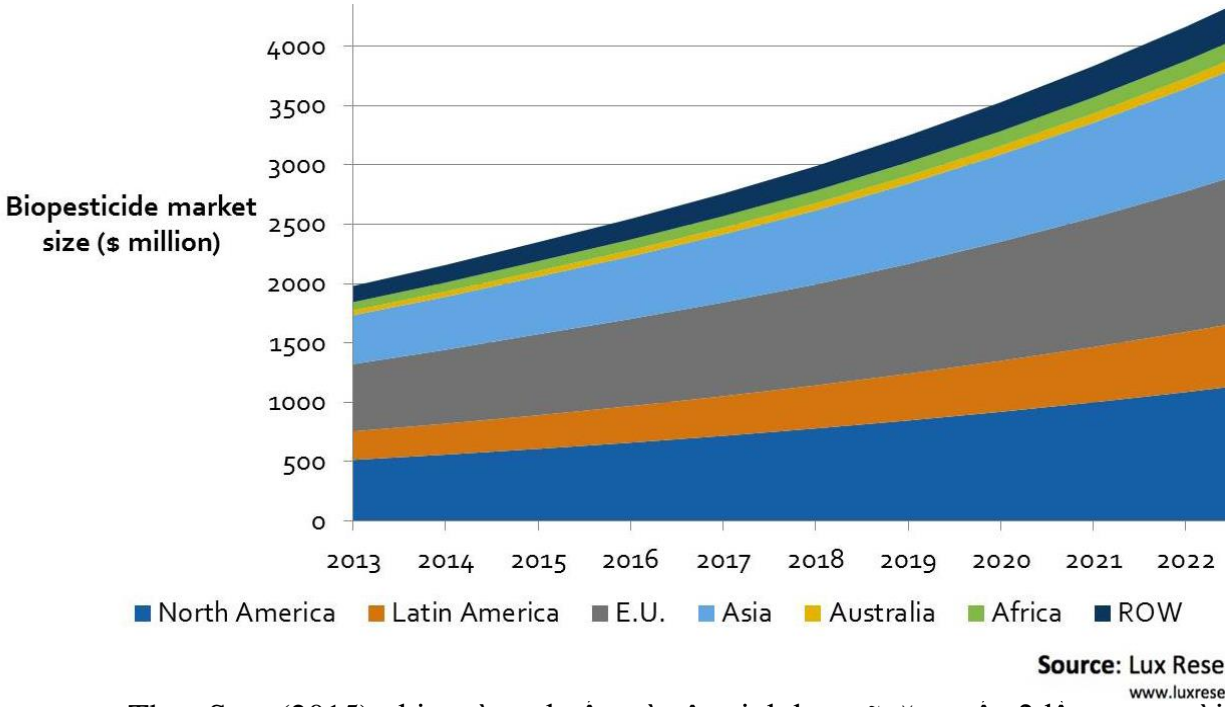
Chọn lọc chủng vi khuẩn *B. thuringiensis* cho thương mại được thực hiện từ năm 1960 đến nay với hiệu lực gây chết tăng gấp 10 lần so với chủng đầu tiên. Hầu hết sản phẩm Bt dựa vào loài như: *B. thuringiensis* var. *kurstaki* diệt côn trùng bộ cánh vảy, var. *israeliensis* kiểm soát bộ hai cánh, và var. *tenebrionis* diệt côn trùng bộ cánh cứng. Nghiên cứu dựa vào phương pháp sinh hóa và thử nghiệm sinh học (bioassay) cùng với PCR trên vùng gen liên quan đến độc tính, nhằm chọn lọc chủng vi khuẩn có tiềm năng sản sinh độc tố cao và phát hiện các độc tố mới. Xác định vật chủ và phổ ký chủ liên quan đến sự khám phá các độc tố mới và qua kỹ thuật tái tổ hợp tạo những chủng vi khuẩn có hiệu lực cao (Carlton và Gonzalez, 1985; Vasques và ctv, 1995).

Thuốc trừ sâu *B. thuringiensis* là một loại thuốc lý tưởng để quản lý tổng hợp dịch hại, chúng được sử dụng phổ biến bởi nhiều ưu điểm, nhưng biện pháp nào thì cũng có mặt giới hạn của nó Sanahuja và ctv (2011), do phổ ký chủ nhiễm chuyên tính nên không gây ảnh hưởng tiêu cực đến sức khỏe con người, vật nuôi, cây trồng. Không gây ô nhiễm môi trường sinh thái do phân hủy nhanh và không tồn dư lượng. Vì thế, việc sử dụng chế phẩm Bt từ vi khuẩn *B. thuringiensis* như là thuốc bảo vệ thực vật thông thường dễ bị ảnh hưởng từ nhiều yếu tố môi trường, bởi các yếu tố môi trường bên ngoài làm giảm độc tố và thời gian tồn tại (Pusztai và ctv, 1991; Cohen và ctv, 1991).

Điều quan trọng trong ứng dụng thuốc trừ sâu vi sinh là phải ứng dụng theo hệ thống phòng trừ tổng hợp để những ưu điểm của thuốc đạt hiệu quả tối đa. Ngoài ra, còn sử dụng thiên địch, nấm gây bệnh và các tác nhân vi sinh như *B. thuringienis* (Kunimi, 2007)

Ở Việt Nam, thuốc trừ sâu sinh học *B. thuringiensis* thương mại được ứng dụng đầu tiên tại Viện Bảo vệ Thực vật năm 1971. Tuy nhiên, việc nghiên cứu, sản

xuất và ứng dụng *B. thuringiensis* đầu tiên được thực hiện năm 1973 tại Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Lịch sử phát triển thuốc trừ sâu sinh học *B. thuringiensis* của nước ta được chia thành 3 thời kỳ: thời kỳ mở đầu (1973 – 1983), thời kỳ sản xuất và áp dụng (1984 – 1994), thời kỳ nghiên cứu cơ bản, ứng dụng và phát triển (1995 đến nay) (Ngô Đình Bính, 2010).



Theo Sara (2015), thị trường thuốc trừ sâu sinh học sẽ tăng gấp 2 lần sau mười năm từ 2 tỷ USD năm 2013 sẽ tăng lên 4 tỷ USD vào năm 2022. Trong đó, khu vực Bắc Mỹ sẽ là nơi sử dụng thuốc trừ sâu sinh học nhiều nhất so với các khu vực khác trên thế giới.

Ngày nay, ở nước ta thuốc trừ sâu sinh học được sử dụng nhiều, đặc biệt thuốc trừ sâu sinh học có nguồn gốc từ vi khuẩn *B. thuringiensis*. Với hơn 30 chế phẩm thương mại có tên gọi khác nhau trên thị trường đã và đang được sử dụng tại các vùng trồng rau sạch trên cả nước trong việc phòng trừ các loại sâu hại rau như: sâu khoang, sâu xanh, sâu tơ, sâu cuốn lá…. Với các hoạt chất *B. thuringiensis* var. *kurstaki* gồm có: Sản phẩm An huy (8000 IU/mg) WP, Biobit 32WP, Biocin 16WP, 8000SC, Baolus 50000 IU/mg WP, Bicilus 18WP, Comazol (16000 IU/mg) WP, Cymax 35WP, Dipel 6.4WG, Thuricide HP, OF 36BIU; *B. thuringiensis* var.

kurstaki 16000 IU + Gramulosis virus 10^8 với sản phẩm Bitadin WP; *B. thuringiensis* var. *kurstaki* 1,6% + Spinosad 0,4% có sản phẩm Xi-men 2 SC; *B. thuringiensis* var. *kurstaki* + Abamectin với sản phẩm Kuraba WP, 3.6EC, Akido 20WP, Atimecusa 20WP, 54EC, Tridan 21.8WP. Hoặc các sản phẩm thuộc *B. thuringiensis* var. *aizawai,* var. *israelensis*, var. *tenebrionis,* var. *thuringiensis,* var. *dendrolimus* (Danh mục Thuốc BVTV được phép sử dụng tại Việt Nam năm 2021, Bộ Nông nghiệp và PTNT, 2021).

Ngoài việc sử dụng làm thuốc trừ sâu, các nhà khoa học đã tách một số gen từ *B. thuringiensis* ghép vào hệ thống gen của cây để tạo ra các giống cây trồng kháng sâu như giống bông kháng sâu xanh, giống lúa kháng sâu đục thân, sâu cuốn lá (Bùi Chí Bửu, 2002; Ngô Đình Bính và ctv, 2010).

1.3.2 Cây trồng chuyển gen vi khuẩn *Bacillus thuringiensis*

Ngày nay, ở nước ta thuốc trừ sâu sinh học được sử dụng nhiều, đặc biệt thuốc trừ sâu sinh học có nguồn gốc từ vi khuẩn *B. thuringiensis*. Với hơn 30 chế phẩm thương mại có tên gọi khác nhau trên thị trường đã và đang được sử dụng tại các vùng trồng rau sạch trên cả nước trong việc phòng trừ các loại sâu hại rau như: sâu khoang, sâu xanh, sâu tơ, sâu cuốn lá…. Với các hoạt chất *B. thuringiensis* var. *kurstaki* gồm có: Sản phẩm An huy (8000 IU/mg) WP, Biobit 32WP, Biocin 16WP, 8000SC, Baolus 50000 IU/mg WP, Bicilus 18WP, Comazol (16000 IU/mg) WP, Cymax 35WP, Dipel 6.4WG, Thuricide HP, OF 36BIU; *B. thuringiensis* var. *kurstaki* 16000 IU + Gramulosis virus 10^8 với sản phẩm Bitadin WP; *B. thuringiensis* var. *kurstaki* 1,6% + Spinosad 0,4% có sản phẩm Xi-men 2 SC; *B. thuringiensis* var. *kurstaki* + Abamectin với sản phẩm Kuraba WP, 3.6EC, Akido 20WP, Atimecusa 20WP, 54EC, Tridan 21.8WP. Hoặc các sản phẩm thuộc *B. thuringiensis* var. *aizawai,* var. *israelensis*, var. *tenebrionis,* var. *thuringiensis,* var. *dendrolimus* (Danh mục Thuốc BVTV được phép sử dụng tại Việt Nam năm 2020, Bộ Nông nghiệp và PTNT, 2020).Những nghiên cứu về lĩnh vực chuyển gen kháng côn trùng vào cây trồng để tạo ra các cây có khả năng kháng các sâu bệnh mới đã được bắt đầu từ cuối thế kỷ 20. Có rất nhiều nghiên cứu chuyển gen *cry1A* kháng

sâu vào cây trồng thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* để tạo ra các giống cây trồng có khả năng kháng sâu như: cây đậu xanh, cây cải bông (Nguyễn Lân Dũng và ctv, 2000; Nguyễn Xuân Cảnh và ctv, 2004).

Các nhà nghiên cứu đã chuyển nội độc tố delta từ *B. thuringiensis* vào các cây trồng để tạo ra các cây chuyển gen *B. thuringiensis* "kháng sâu hại" như chuyển gen *cry2Aa* vào cây đậu để kháng sâu *Helicoverpa armigera*, sử dụng Bt5422 và Bt5422CBCL chuyển gen vào cây bắp kháng *Spodoptera litura,* chuyển gen *cry1Ac, cry2Ab,* Vip hoặc sự kết hợp của các gen Bollgard 3 (*cry1Ac* + *cry2Ab* + *vip3A*), Twin Link Plus (*cry1Ab* + *cry2AC* + *vip3Aa19*) và Wide Strike 3 (*cry1AC,* + *cry1F* + *vip3A)* vào cây bông nhằm kháng sâu *Spodoptera exigua, Helicoverpa armigera, H. virescens* (Abbas, 2018; Singh và ctv, 2018; Xu và ctv, 2019). Đối với cây trồng mang gen *B. thuringiensis*, nhờ khả năng tự kháng sâu nên lượng thuốc trừ sâu sử dụng đã được giảm đáng kể, vì thế góp phần tăng cường sự phát triển của các sinh vật có ích. Các sinh vật này có thể giúp khống chế các loài sâu hại thứ cấp.

Cây trồng mang gen *B. thuringiensis* được xem là công cụ kháng sâu, giảm thiểu thiệt hại mùa màng và gia tăng sản lượng lương thực. Bên cạnh đó, vấn đề cấp thiết khác cần được giải quyết, đó là dân số toàn cầu ngày một tăng lên nhanh chóng, trong khi diện tích đất canh tác ngày càng thu hẹp. Chính vì vậy, cùng với kỹ thuật canh tác nông nghiệp thích hợp, đưa công nghệ chuyển gen *B. thuringiensis* vào cây nhằm kháng côn trùng có thể đem lại rất nhiều lợi ích cho loài người. Tuy nhiên, việc đánh giá chính xác sự phát triển của các loại cây trồng chuyển gen này vẫn còn nhiều ý kiến gây tranh cãi trên thế giới.

Chương 2
NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Nội dung nghiên cứu

2.1.1 Sự phân bố của vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* và đa dạng quần thể vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* từ các tỉnh, thành ở Việt Nam

- Sự phân bố của vi khuẩn *B. thuringiensis* và chọn lọc vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* trong đất từ các tỉnh, thành ở Việt Nam.

- Xác định sự hiện diện các gen *cry* của vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki.*

- Xác định sự hiện diện *vip3a* của vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki.*

2.1.2 Đánh giá độc tính của các chủng *B. thuringiensis* var. *kurstaki* trên sâu ăn lá

2.1.2.1 Đánh giá khả năng gây chết của các chủng *B. thuringiensis* var. *kurstaki* trên sâu ăn lá bộ cánh vảy

- Đánh giá khả năng gây chết của các chủng vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* phân lập trên sâu khoang (*Spodoptera litura*), sâu tơ (*Plutella xylostella*), sâu xanh da láng (*Spodoptera exigua*) trong điều kiện phòng thí nghiệm.

- Xác định giá trị LC_{50}, LT_{50} của vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* trên sâu khoang, sâu tơ, sâu xanh da láng.

2.1.2.2 Chọn lọc chủng *B. thuringiensis* var. *kurstaki* kháng tia UV và tối ưu điều kiện lên men vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki*

- Chọn lọc các chủng vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* kháng tia UV.

- Tối ưu hóa thời gian, pH môi trường và nhiệt độ nuôi vi khuẩn

- Đánh giá khả năng tăng sinh của vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* .

2.1.2.3 Đánh giá hiệu quả trừ sâu ăn lá của chế phẩm VBt ở điều kiện nhà lưới và ngoài đồng ruộng.

- Đánh giá độc tính của chế phẩm vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* trên sâu khoang (*Spodoptera litura*), sâu tơ (*Plutella xylostella*), sâu xanh da láng (*Spodoptera exigua*) điều kiện nhà lưới

- Đánh giá độc tính của chế phẩm vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* trên sâu tơ (*Plutella xylostella*) ngoài đồng ruộng.

2.2 Thời gian và địa điểm

2.2.1 Thời gian

Đề tài được thực hiện từ năm 2015 đến năm 2021.

2.2.2 Địa điểm

Thu mẫu đất ở 22 tỉnh, thành: đồng bằng sông Hồng, ven biển miền Trung, Đông Nam bộ, đồng bằng sông Cửu Long.

Phân lập mẫu vi khuẩn *B. thuringiensis* tại Viện Nghiên cứu Công nghệ Sinh học và Môi trường, Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh.

Nhân nuôi sâu để thí nghiệm tại Viện Nghiên cứu Công nghệ Sinh học và Môi trường, Trường Đại học Nông Lâm TP.HCM, Trung tâm Giống cây trồng, vật nuôi và thủy sản TP.HCM, Chi cục Trồng trọt và Bảo vệ thực vật TP. HCM.

Đánh giá độc tính của vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* trừ sâu trong phòng thí nghiệm và nhà lưới tại Viện Nghiên cứu Công nghệ Sinh học và Môi trường, Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh.

Đánh giá độc tính của vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* trừ sâu ngoài đồng ruộng tại huyện Hóc Môn, Bình Chánh, Thành phố Hồ Chí Minh.

2.3 Vật liệu nghiên cứu

2.3.1 Hóa chất thí nghiệm

Hóa chất dùng phân lập vi khuẩn *B. thuringiensis*: Dịch chiết nấm men, NaCl, Tryptone, Agar, $MnCl_2$, NaH_2PO_4, Na_2HPO_4; Bộ nhuộm Gram (Nam Khoa, Việt Nam) gồm: Crystal violet, lugol, cồn, safranin; dầu soi kính, dung dịch lục malachite ($C_{23}H_{25}N_2Cl$), dung dịch Fuchsin, dung dịch acid carbolic, NaOH.

Hóa chất dùng tạo sản phẩm: dịch chiết nấm men, Casamino acids, Na_2HPO_4, KH_2PO_4, $MgSO_4.7H_2O$, $MnSO_4.H_2O$, $FeSO_4.7H_2O$, Citric acid, Distilled water, Sodium pyruvate.

Các hóa chất dùng chuẩn bị môi trường giữ giống và bổ sung vào môi trường nuôi cấy dạng lỏng: KH_2PO_4, K_2HPO_4, $MgSO_4$, $MnSO_4$, $FeSO_4$, $MnCl_2$, Na_2HPO_4, NaH_2PO_4, Glycerol, $CaCO_3$, NaCl, pepton, glucose.

Hoá chất dùng trong sinh học phân tử: Taq DNA Polymerase, nước khử ion, Primer xuôi, Primer ngược, Agarose, TBE, CH_3COONa, TE Buffer, Loading dye, Gel Red.

2.3.2 Nguồn sâu

Sâu tơ (*Plutella xylostella*), sâu khoang (*Spodoptera litura*), sâu xanh da láng (*Spodoptera exigua*) được thu trên ruộng rau tại Trại Thực nghiệm thuộc Khoa Nông Học, Trường Đại học Nông Lâm thành phố Hồ Chí Minh, các vườn rau tại vùng trồng rau chuyên canh tại thành phố Hồ Chí Minh, Đồng Nai, Bình Dương và Lâm Đồng.

Sâu được nuôi trong nhà lưới kín và trong phòng (nhiệt độ phòng 28 – 30^0C, ẩm độ 75%). Sâu được nuôi bằng thức ăn tự nhiên (cải ngọt, cải xanh), có kèm mật ong và cây có hoa tạo tiểu sinh thái phù hợp với tự nhiên, chọn sâu khỏe mạnh lớn đều và nuôi cho tới khi hóa nhộng. Loại bỏ sâu non có hiện tượng bị virus hay bị các bệnh khác.

Hộp nuôi sâu trong phòng thí nghiệm có kích thước 20 x 10 x 6 cm được bọc lưới hai bên và trên nắp hộp để đảm bảo tính thông thoáng.

2.4 Phương pháp nghiên cứu

2.4.1 Sự phân bố của vi khuẩn *B. thuringiensis* và chọn lọc vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* trong đất từ các tỉnh, thành

2.4.1.1 Phương pháp thu thập mẫu đất

Mẫu đất được lấy ở 5 điểm theo đường chéo góc (điểm giữa và 4 góc của khu đất). Dùng dụng cụ lấy mẫu gạt bỏ lớp đất mặt, đào sâu và lấy phần đất cách lớp mặt 5 – 10 cm. Trộn đất ở 5 điểm lại với nhau thành mẫu chung và cho vào hộp nhựa đậy kín nắp, ghi nhận thông tin chi tiết về mẫu đất (địa điểm, loại đất, tọa độ). Các mẫu thu thập được bảo quản ở nhiệt độ phòng suốt quá trình thực hiện nghiên cứu.

Số mẫu thu thập: 616 mẫu đất được thu thập ở 22 tỉnh, thành vùng Đồng bằng sông Hồng, vùng Duyên Hải miền Trung, vùng Đông Nam Bộ, vùng Đồng bằng

sông Cửu Long tập trung ở các khu vực đất canh tác chưa sử dụng chế phẩm có nguồn gốc từ vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* (đất trồng rau màu, lúa, cây ăn quả và cây công nghiệp – 476 mẫu), đất không canh tác (trầm tích sông, hồ, cát ven biển, vùng hải đảo (Phú Quý, Phú Quốc, Lý Sơn), rừng bảo tồn, ven đường – 140 mẫu) vị trí lấy mẫu được địa phương hóa và xác định tọa độ theo GPS.

2.4.1.2 Phương pháp đặt tên mẫu đất và chủng vi khuẩn (mã mẫu)

Mẫu đất thu được sẽ mã hóa theo địa điểm, số thứ tự. Ví dụ: VBt241.10 (số 24 - mã vùng điện thoại của Hà Nội; số 1 - mẫu số 1; số 10: chủng số 10) hay VBt2752.11 (số 275 - mã vùng điện thoại của Bến Tre; số 2 - mẫu số 2; số 11: chủng số 11).

2.4.1.3 Phương pháp chuẩn bị môi trường phân lập mẫu đất

Môi trường T3 agar (môi trường phân lập): tryptone 3 g/L, dịch chiết nấm men 1,5 g/L, tryptose 2 g/L, $MnCl_2$ 0,005 g/L, NaH_2PO_4 6,9 g/L, Na_2HPO_4 8,9 g/L, agar 15 g/L, nước cất 1 lít.

Môi trường T3 lỏng (môi trường tăng sinh, môi trường lắc mẫu): tương tự môi trường T3 đặc nhưng không có agar.

Môi trường Clark - lubs: peptone 5 g/L, NaCl 5 g/L, Glucose 5 g/L.

Môi trường phản ứng thủy phân tinh bột: peptone 5 g/L, Nacl 7 g/L, dịch chiết nấm men 3 g/L, tinh bột 2 g/L, agar 15 g/L.

Tất cả các môi trường đều được điều chỉnh pH 7,0 sau đó hấp khử trùng ở 121°C, 1 atm trong 20 phút.

2.4.1.4 Phân lập mẫu vi khuẩn

Phân lập vi khuẩn theo phương pháp của Traves (1987). Cân 0,5 g đất trộn cho vào bình tam giác chứa 10 mL môi trường LB lỏng chứa 0,25M đệm natri acetace (pH 6,8), nuôi lắc 150 vòng/phút, 30°C/18 giờ. Mẫu được xử lý nhiệt ở 80°C với thời gian 10 phút trong bồn ủ nhiệt để diệt những vi khuẩn không có khả năng chịu nhiệt, các tế bào không sinh bào tử.

Pha loãng mẫu bằng nước cất thành các mức: 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}. Hút 100 µl dịch mẫu ở các mức 10^{-3} đến 10^{-5} cho vào đĩa môi trường LB agar, dùng que cấy trải đều

dịch mẫu cho đến khi bề mặt môi trường khô, dùng parafilm quấn quanh vành đĩa để tránh nhiễm khuẩn từ bên ngoài. Để đĩa sau khi cấy ở nhiệt độ 30°C.

Sau 2 ngày, chọn khuẩn lạc với đặc điểm: màu trắng, thô, lan nhanh trên đĩa, đem cấy ria trên đĩa petri có chứa môi trường T3 đặc. Tiếp tục cấy các khuẩn lạc đến khi vi khuẩn xuất hiện trên đĩa có cùng hình dạng và kích thước.

Các chủng phân lập được giữ trong ống nghiệm chứa môi trường LB.

2.4.1.5 Định danh vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* bằng thử nghiệm sinh hóa

*** Nhuộm Gram**

Vi khuẩn Gram dương bắt màu tím, vi khuẩn Gram âm bắt màu hồng. *B. thuringiensis* là vi khuẩn Gram dương, tế bào hình que.

*** Nhuộm bào tử và tinh thể**

Bacillus thuringiensis sinh bào tử bắt vòng đỏ, hình oval. Tinh thể độc bắt màu đỏ có nhiều hình dạng như: hình thoi, hình tròn, hình quả trám,…

*** Thử hoạt tính catalase**

Phản ứng dương tính nếu bọt khí xuất hiện nhanh và mạnh, ngược lại nếu không có bọt khí hoặc có bọt khí nhỏ là âm tính. *B. thuringiensis* dương tính với catalase.

*** Phản ứng VP (Voges-Proskauer)**

Phản ứng cho kết quả dương tính khi bề mặt môi trường có màu đỏ, âm tính khi không đổi màu. *B. thuringiensis* cho phản ứng dương tính.

*** Phản ứng thủy phân tinh bột**

Phân biệt *B. thuringiensis* và *B. spharicus* dựa vào sự phản ứng tạo màu của tinh bột và dung dịch lugol. Khi dung dịch Lugol tác dụng với tinh bột sẽ tạo màu tím. Trong trường hợp khi nhỏ dung dịch lugol lên đĩa môi trường chứa tinh bột có vi khuẩn mà không xuất hiện màu tím chứng tỏ vi khuẩn có khả năng sinh enzyme thủy phân tinh bột thành glucose.

*** Thử nghiệm khả năng di động**

Phân biệt *B. anthracis* và *Bacillus* sp. khác. Thử nghiệm dương tính khi vi khuẩn mọc lan ra khỏi đường cấy, làm đục môi trường xung quanh; âm tính khi vi

khuẩn xuất hiện dọc theo đường cấy trong khi môi trường xung quanh vẫn trong. *Bacillus thuringiensis* cho thử nghiệm dương tính.

*** Đo kích thước tế bào vi khuẩn**

Tiến hành đo kích thước tế bào vi khuẩn bằng kính hiển vi điện tử ở vật kính 100X có giọt dầu soi kính.Theo Bergey (1977) thì *B. thuringiensis* có chiều rộng lớn hơn hoặc bằng 1 µm.

2.4.1.6 Phương pháp tăng sinh khối vi khuẩn *Bacillus thuringiensis*

Nuôi cấy các chủng vi khuẩn nghi ngờ là *B. thuringiensis* đã phân lập được trên môi trường T3 lỏng ở 30°C, lắc 180 vòng/phút trong 48 giờ, đem xử lý mẫu ở 70°C trong 10 phút rồi pha loãng mẫu đến 10^{-7}. Lấy 0,1 mL ở mỗi nồng độ pha loãng từ 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7} trang vào đĩa thạch vô trùng chứa môi trường T3. Để vào tủ ấm ở 28°C trong 24 giờ rồi đếm số lượng khuẩn lạc hiện diện trên mỗi đĩa.

Số lượng bào tử được tính theo công thức: $Q = (a \times 10^{-n}) / b$ (cfu/mL)

Trong đó: Q là số bào tử trong 1mL; a là số khuẩn lạc đếm được; b là thể tích dịch khuẩn cấy vào đĩa petri (mL)

Môi trường nhân nuôi vi khuẩn: dịch chiết nấm men 30 g/L; Casamino acids 20 g/L, Na_2HPO_4 2,48 g/L, KH_2PO_4 0,41 g/L, $MgSO_4.7H_2O$ 20 mg/L, $MnSO_4.H_2O$ 7,5 mg/L, $FeSO_4.7H_2O$ 6.4 mg/L, Citric acid 6.4 mg/L, Distilled water 900 mL, Sodium pyruvate 23,2 g/L.

2.4.1.7 Phương pháp bảo quản giống vi khuẩn *Bacillus thuringiensis*

Bảo quản giống bằng dầu khoáng: tạo môi trường yếm khí bằng dầu khoáng để ức chế sự sinh trưởng của vi khuẩn. Cho một ít dầu khoáng vào ống Eppendorf được khử trùng 121^{0}C, 1 atm trong 20 phút. Dùng que cấy vô trùng lấy một ít vi khuẩn cho vào ống Eppendorf, đậy nắp và dùng paraffin quấn quanh miệng ống, nuôi trong khoảng 24 giờ đem bảo quản ở - 20^{0}C.

2.4.2 Khuếch đại trình tự 16S-rDNA và gen *cry* của các chủng vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki*

2.4.2.1 Ly trích DNA

Các chủng vi khuẩn *B. thuringiensis* phân lập được nuôi cấy trong môi trường LB lỏng ở 30°C, lắc 180 vòng/phút trong 24 giờ. DNA tổng số được tách bằng bộ kít Wizar Genomic DNA Purification (Promega) và GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific) theo hướng dẫn sử dụng. DNA sau khi ly trích được hòa và trữ ở tủ âm 20^{0}C.

2.4.2.2 PCR

Phản ứng PCR được thực hiện với 5 cặp primer để khuếch đại trình tự 16S–rDNA và 4 gen *cry1, cry2, cry4,* và *cry9* ở các chủng vi khuẩn phân lập (Bảng 2.1).

Bảng 2.1 Trình tự primer sử dụng khuếch đại gen *cry* của vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kusrtaki* (Ben-Dov và ctv, 1997)

Gen	Tên mồi	Trình tự	Sản phẩm PCR (bp)
16Sr	63F	5’ – CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC – 3’	**1,5 kb**
	1489R	5’ – TAC CTT GTT ACG ACT TCA – 3’	
cry1	Un1(F)	5’ – CAT GAT TCA TGC GGC AGA TAA AC – 3’	**277**
	Un1(R)	5’ – AAT GGG AAG CAG AAG TGT CAC AA – 3’	
cry2	Un2(F)	5’ – GTT ATT CTT AAT GCA GAT GAA TGG G – 3’	**701**
	Un2(R)	5’ – CGG ATA AAA TAA TCT GGG AAA TAG T – 3’	
	2AaR	5’ – GAG ATT AGT CGC CCC TAT GAG – 3’	**498**
	2AbR	5’ – TGG CGT TAA CAA TGG GGG GAG AAA T – 3’	**546**
	2AcR	5 – GCG TTG CTA AT AGT CCC AAC AAC A – 3’	**725**
cry4	Un4(F)	5’- GCA TAT GAT GTA GCG AAA CAA GCC – 3’	**439**
	Un4(R)	5’ – GCG TGA CAT ACC CAT TTC CAG GTC C – 3’	
cry9	Un9 (F)	5’ – CGG TGT TAC TAT TAG CGA GGG GGG – 3’	**351**
	Un9 (R)	5’ – GCT TGA GCC GCT TCA CAG CAA TCC – 3’	

Thành phần phản ứng PCR bao gồm 2X Taq mix 12,5 µL, primer xuôi 0,2 µM, primer ngược 0,2 µM, DNA mẫu 2 µL, nước khử ion tiệt trùng 8,5 µL. Tổng thể tích phản ứng là 25 µL.

Phản ứng PCR được thực hiện trên máy PCR (Life ECO Thermo Cycler, Bioer – Trung Quốc và Applied Biosystems, SimpliAmp^{TM} Thermal Cycler – Mỹ). Chu trình phản ứng gồm 1 chu kỳ ở 95ºC, 3 phút và 35 chu kỳ gồm (30 giây ở 95°C, 30 giây ở 50/52°C, 30 giây ở 72°C), và 7 phút ở 72ºC. Tất cả sản phẩm được bảo quản ở 4ºC (Khojan và ctv, 2013).

2.4.2.3 Điện di trên gel agarose và đọc kết quả sản phẩm PCR

Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng cách điện di trên gel agarose 1,0%, nhuộm với SYBGreen. Chạy điện di ở hiệu điện thế 100V trong 35 phút. Quan sát kết quả dưới tia UV. Đọc kết quả, chụp ảnh gel bằng máy chụp ảnh gel (UVP MultiDoc – It Digital Imaging System).

Sản phẩm PCR được gửi giải trình tự ở First Base, Malaysia. Kết quả giải trình tự được kiểm tra có trùng khớp với vùng gen *cry1, cry2, cry4, cry9* và đối chứng dương (chủng *B. thuringiensis* var. *kurstaki)* trên ngân hàng gene.

2.4.3 Xác định sự hiện diện protein vip3a của vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki*

2.4.3.1 PCR phát hiện gen *vip3a*

Phản ứng PCR khuếch đại gen *vip3a* của vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* được thực hiện với cặp primer Vip3a – Fw (5'– AT ATG AAC AAG AAT AAT ACT AAA TTA A – 3') và Vip3a – Rv (5'– CTC GAG TTA CTT AAT AGA GAC ATC GGA– 3') theo Abdelkefi và ctv, 2005. Thành phần phản ứng bao gồm Taq DNA polymerase (5 units/µL) 6,5 µL, primer xuôi (10 nM) 26 µL, primer ngược (10 nM) 26 µL, dNTP mixture (2 mM) 26 µL, 10X PCR buffer + 25 mM $MgCl_2$ 26 µL, nước tinh khiết 139,5 µL. Tổng thể tích phản ứng là 250 µl. Chu trình phản ứng khuếch đại gồm 1 chu kỳ ở 95°C, 90 giây và 24 chu kỳ (30 giây tại 94°C, 30 giây tại 45°C, và 90 giây ở 72°C) và 420 giây ở 72ºC .

2.4.3.2. Phương pháp phân lập protein vip3a

*** Vật liệu:** Tris buffer (pH 6,8 và 8,8 cho polyacrylamide gel), 30% acrylamide + bis-acrylamide solution, 10% SDS, 10% ammonium persufate và TEMED solution, Tris-Glycine buffer; 5x SDS-PAGE loading buffer (5x protein loading dye), Coomassie blue R250 dye; Glacial acetic acid, Ethanol 95% (Hoặc Methanol); Nước cất.

*** Phương pháp thực hiện qua các bước:**

Kỹ thuật SDS-PAGE (Abdelkefi-Merrati và ctv, 2005): Ly trích protein tổng số: Tăng sinh các giống có khả năng sinh tinh thể trong môi trường LB lỏng, lắc qua đêm ở 37 ^{0}C trong 16 - 18 tiếng. Hút 1 mL dịch tăng sinh cho vào tuýp, ly tâm 10000 vòng/ phút trong vòng 10 phút, loại bỏ dịch môi trường (lặp lại 3 lần). Thêm 40 µL nước cất và vortex đều. Thêm 8 µL loading dye protein 6X vào trong tuýp. Đun sôi mẫu trong 10 phút. Ly tâm nhanh trong thời gian ngắn và trữ mẫu ở -20^{0}C.

Chuẩn bị gel SDS-polyacrylamide: Tiến hành đổ phần gel tách trước, sau đó dùng butanol để loại bỏ bọt trong phần gel. Đợi đến khi phần gel gom đông lại thì đổ bỏ butanol và rửa lại bằng nước. Sau đó đổ gel gom vào và thêm lược. Phần gel tách phải cách chân lược khoảng 1,5 cm. Chạy SDS – PAGE ở hiệu điện thế 100 – 120V, khoảng 3 giờ, Nhuộm và rửa nhuộm: Fixing: 50% ehanol + 10% acid acetic + 40% nước. Staning : 0.1% Commassie BR250 + fixing solution. Destaning: 40% ethanol + 10% acid acetic + 50% nước.

Mẫu *B. thuringiensis* được cấy trên LB agar và ủ ở 30°C qua đêm; 2. Tiếp theo cấy mỗi bào tử *B. thuringiensis* phân lập trong 2 – 3 mL LB trong tube 15 mL và ủ 30^{0}C, lắc 200 – 250 vòng qua đêm (16 – 18 giờ); 3. Trích 50 µL sản phẩm ở bước 2 thêm 5 mL TB (Terrific Broth) trong tube 50 mL và ủ 30°C, lắc 200 – 250 vòng ở 96 giờ; 4. Trích mỗi tube một 1 mL và giữ ở - 20°C; 5. Rã đông bằng cách ly tâm 10.000 vòng cho 10 phút; 6. Lấy phần dịch nổi ở trên cho vào tube mới; 7. Cho vào 200 µL nước và lắc; 8. Lấy 20 µL ở bước 6 + 5 µl 5x protein loading dye; 9. Lấy 20 µL ở bước 7 + 5 µL 5x protein loading dye; 10. Đun sôi mẫu ở bước 8 và

9 trong 10 phút; 11. Để 1 đến 2 phút cho mẫu lắng xuống và cho mỗi mẫu 20 µL vào SDS – polyacrylamide gel.

*** Điện di và xem kết quả**

Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng cách điện di trên gel agarose 1% trong dung dịch đệm TBE 0.5X. Đun nóng dung dịch agarose 1% trong 3 phút, để dung dịch đến nhiệt độ khoảng 45 – 55°C. Đổ dung dich chạy điện di TBE 0,5X vào bồn điện di có chứa gel agarose.

Sử dụng 5 μL sản phẩm PCR trộn đều với 0,5μl loading dye buffer và 1 μL gel Red rồi bơm vào từng giếng. Chạy điện di ở hiệu điện thế 100V trong 35 phút. Quan sát kết quả dưới chiếu xạ UV. Đọc kết quả, chụp ảnh gel.

2.4.4 Đánh giá độc tính của các mẫu phân lập *B. thuringiensis* var. *kurstaki* trên sâu khoang (*Spodoptera litura*), sâu tơ (*Plutella xylostella*), sâu xanh da láng (*Spodoptera exigua*) trong điều kiện phòng thí nghiệm

Sâu được nhân nuôi ở phòng thí nghiệm ít nhất 3 vòng đời, đồng đều về tuổi (đang ở giai đoạn tuổi 2). Cây cải được 15 ngày tuổi, có từ 8 – 12 lá được trồng trong chậu đường kính 25 cm. Trên mỗi cây cải ngọt thả 10 con sâu tuổi 2. Chậu được đặt trên đĩa nhựa có chứa nước để đảm bảo cho sâu không bò ra khỏi cây cải. Mỗi chậu cải được đặt trong lồng lưới bằng vải màn thưa để đảm bảo môi trường bên trong luôn được thoáng khí. Bố trí các lồng thí nghiệm ở nơi thoáng mát.

Dịch các chủng vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kusrtaki* phân lập được pha loãng 1% và phun lên các cây cải vào buổi chiều. Nghiệm thức đối chứng phun nước lã. Thí nghiệm bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên, 1 yếu tố, 4 lần lặp lại. Theo dõi và đếm số sâu còn sống sau 1 ngày, 2 ngày, 3 ngày, 5 ngày và 7 ngày sau phun dịch vi khuẩn.

Hiệu lực diệt sâu được tính theo công thức Abbott (1925): A (%) = (1 – T/C) x 100. Trong đó A (%) là chỉ số hiệu lực diệt sâu; C là số sâu sống sót ở nghiệm thức đối chứng; T là số sâu sống sót ở các nghiệm thức thí nghiệm.

2.4.5 Xác định giá trị LC_{50}, LT_{50} của các chủng vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* tuyển chọn

2.4.5.1 Xác định giá trị LC_{50}

Sau khi chọn được các chủng vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kusrtaki* có khả năng diệt sâu, giá trị LC_{50}, LT_{50} của các chủng này được xác định đối với sâu tơ, sâu khoang và sâu xanh da láng.

Thí nghiệm được tiến hành khi sâu ở giai đoạn tuổi 2 và tuổi 4. Sâu được cân trọng lượng nhằm đảm bảo sự đồng đều với 50 sâu/độ tuổi, các sâu sẽ được cho vào 10 hộp (5 sâu/hộp) nhằm tạo môi trường thông thoáng. Chuẩn bị dịch vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kusrtaki* thành 4 mật độ 10^3, 10^5, 10^7, 10^9 CFU/mL và đối chứng (sử dụng nước cất). Tiến hành lây nhiễm bằng cách phun dung dịch chứa *B. thuringiensis* var. *kusrtaki* lên lá cải ngọt, để ráo và cho vào hộp để sâu ăn, bổ sung thức ăn cho sâu bằng lá cải ngọt sạch ở những lần cho ăn tiếp theo nhằm duy trì nguồn thức ăn cho sâu. Ghi nhận số liệu sâu chết hàng ngày.

Bảng 2.2 Các nghiệm thức xác định LC_{50} của vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kusrtaki* đối với sâu tơ, sâu khoang và sâu xanh da láng

Tuổi sâu	**Mật độ vi khuẩn Btk (CFU/mL)**	**Liều lượng** (µL/sâu)		
		Sâu tơ	**Sâu khoang**	**Sâu xanh da láng**
Tuổi 2	10^3 – 10^9	3	3	3
Tuổi 4	10^3 – 10^9	5	5	5

Chỉ tiêu theo dõi: số lượng sâu chết hàng ngày ở các thí nghiệm.

2.4.5.2 Xác định giá trị LT_{50}

Dựa vào kết quả thí nghiệm LC_{50} và tham khảo kết quả thí nghiệm LC_{50} trên sâu xanh da láng, sâu xanh của Zang và ctv (2009), chọn ra được nồng độ phù hợp cho sâu tuổi 2 và tuổi 4 của từng loại sâu thí nghiệm để xác định giá trị LT_{50}.

Bảng 2.3 Các nghiệm thức xác định LT_{50} của vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* var. *kusrtaki* đối với sâu tơ, sâu khoang và sâu xanh da láng

Tuổi sâu	Mật độ vi khuẩn Btk (CFU/mL)	Liều lượng (µL/sâu)		
		Sâu tơ	Sâu khoang	Sâu xanh da láng
Tuổi 2	$2,5 \times 10^7$	3	3	3
Tuổi 4	$2,5 \times 10^9$	5	5	5

Chỉ tiêu theo dõi: theo dõi thời gian sâu chết hàng ngày, từ đó tính thời gian trung bình sâu chết bằng ước lượng Kaplan Meier (Bland và Altman, 1998; Kleinbaum và Klein, 2010; Collett, 2015).

2.4.6 Chọn lọc chủng *Bacillus thuringiensis* var. *kusrtaki* chống chịu tia UV

2.4.6.1 Khảo sát khả năng chống chịu tia UV của các chủng vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kusrtaki* ở hai bước sóng 254 nm và 365 nm

Chuẩn bị 10 mL dịch các chủng vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kusrtaki* phân lập có chứa gen *cry1, cry2, cry4, cry9* và *vip3a* ở mật số 10^8 CFU/mL trong đệm 0,5 M phosphate ở pH 6,8 được rót vào các đĩa petri thủy tinh. Vi khuẩn được chiếu UV (BII, Illuminator, 1 A-7 SBS Korea) ở bước sóng 254 nm (UV-C) và 365 nm (UV-A) từ khoảng cách 30 cm (Deepak và ctv, 2001, Saxena và ctv, 2002).

Thí nghiệm gồm 12 chủng vi khuẩn, được bố trí 4 lần lặp lại với 1 đĩa petri/lần lặp lại ở 5 mức thời gian 0, 30, 60, 90, 120 phút ở từng bước sóng và đối chứng không chiếu tia UV.

Chỉ tiêu theo dõi: sự xuất hiện bào tử của vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kusrtaki* ở các mức thời gian chiếu UV.

2.4.6.2 Đánh giá hiệu quả gây chết sâu của các chủng vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kusrtaki* có khả năng chống chịu tia UV trong điều kiện phòng thí nghiệm

Dựa vào thí nghiệm ở nội dung 2.4.6.1, chọn ra các chủng vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kusrtaki* có khả năng chống chịu tia UV tốt nhất ở bước sóng 254 nm và 365 nm và thử nghiệm hiệu quả diệt sâu tơ, sâu khoang và sâu xanh da láng (sâu ở giai đoạn tuổi 2).

Cây cải 15 ngày tuổi, có từ 8 – 12 lá được trồng trong chậu đường kính 25 cm. Trên mỗi cây cải thả 10 con sâu tuổi 2. Chậu được đặt trên dĩa nhựa có chứa nước để đảm bảo cho sâu không bò ra khỏi cây cải. Mỗi chậu cải được đặt trong lồng lưới bằng vải màn thưa để đảm bảo môi trường bên trong luôn được thoáng khí. Bố trí các lồng thí nghiệm ở nơi thoáng mát.

Dịch các chủng vi khuẩn pha loãng 1% và phun lên các cây cải vào buổi chiều. Nghiệm thức đối chứng phun nước lã. Thí nghiệm bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên, 1 yếu tố, 4 lần lặp lại. Theo dõi và đếm số sâu còn sống sau 1 ngày, 2 ngày, 3 ngày, 5 ngày và 7 ngày sau phun dịch vi khuẩn. Hiệu lực diệt sâu được tính theo công thức Abbott (1925): A (%) = (1 – T/C) x 100. Trong đó A (%) là chỉ số hiệu lực diệt sâu; C là số sâu sống sót ở nghiệm thức đối chứng; T là số sâu sống sót ở các nghiệm thức thí nghiệm.

2.4.7 Tối ưu điều kiện lên men của vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki*

2.4.7.1 Xác định môi trường dinh dưỡng phù hợp nhân sinh khối vi khuẩn

Chọn ba chủng vi khuẩn mang gen *cry1*, *cry2*, *cry9* và *vip3a,* gây chết côn trùng bộ cánh vảy và có khả năng chống chịu tia UV tiến hành nhân sinh khối trong bốn loại môi trường được sử dụng theo Navon, 2000 gồm:

Môi trường 1 (g/L): tinh bột 30; đậu nành 25; KH_2PO_4 1; K_2HPO_4 1; $MgSO_4$ 0,3; $MnSO_4$ 0,01; $FeSO_4$ 0,01 và nước cất đủ 1 lít.

Môi trường 2 (g/L): NaCl 2,5; Na_2HPO_4 1; $MgSO_4$ 0,2; $MnCl_2$ 0,05 và nước cất đủ 1 lít.

Môi trường 3 (g/L): dịch chiết nấm men 30; casamino acid 20; Na_2HPO_4 2,48; KH_2PO_4 0,41; $MgSO_4.7H_2O$ 0,02; $MnSO_4.H_2O$ 0,0075; $FeSO_4.7H_2O$ 0,0064; citric acid 0,0064; sodium pyruvate 23,2 và nước cất đủ 1 lít.

Môi trường 4 (g/L): glucose 10; glycerol 10; bã bắp 10; yeast extract 5; NZ-amine B 10; $CaCO_3$ 2; $MaCl_2$ 2 và nước cất đủ 1 lít.

Cho 1 mL dịch vi khuẩn vào bình chứa 100 mL môi trường T3 lỏng đã hấp tiệt trùng (121°C/20 phút), nuôi ở nhiệt độ phòng (28 – 30°C). Đếm và tính mật độ vi khuẩn sau 24 giờ nuôi cấy. Nhân 1% dịch khuẩn (mật số 10^5 CFU/mL) trên 4 loại môi

trường ở điều kiện nhiệt độ 30°C, pH ban đầu là 7. Sau 48 giờ lên men, xác định mật độ vi khuẩn. Chọn môi trường tối ưu cho các khảo sát tiếp theo.

2.4.7.2 Khảo sát các điều kiện nhân sinh khối vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki*

Sau khi chọn được môi trường thích hợp từ nội dung 2.4.7.1, tiến hành khảo sát ảnh hưởng của thời gian, độ pH và nhiệt độ đến tăng sinh khối của các chủng vi khuẩn. Nghiên cứu gồm 4 thí nghiệm, mỗi thí nghiệm có 5 nghiệm thức, mỗi nghiệm thức lặp lại 4 lần.

- Thí nghiệm thời gian sinh trưởng: vi khuẩn được tăng sinh ở 30°C, pH 7. Sau 24, 36, 48, 60 và 72 giờ kiểm tra mật độ vi khuẩn.

- Thí nghiệm về pH: các mức pH môi trường khảo sát là 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 và 8,0. Dịch khuẩn được tăng sinh ở 30°C. Sau 48 giờ, xác định mật độ vi khuẩn.

- Thí nghiệm về nhiệt độ: Dịch khuẩn được tăng sinh ở 30°C, pH 7, ở các mức nhiệt độ gồm 27, 30, 33, 36 và 39°C. Sau 48 giờ đếm và tính mật độ vi khuẩn.

2.4.7.3 Tối ưu hóa các yếu tố ảnh hưởng đến tăng sinh khối vi khuẩn bằng phương pháp quy hoạch thực nghiệm

Bảng 2.4 Giá trị mã hóa và giá trị thực nghiệm của các yếu tố thực nghiệm

Ký hiệu	Biến số	Đơn vị	Giá trị mã hóa		
			-1	0	+1
X_1	Thời gian	Giờ	24	48	72
X_2	pH		7	7,5	8
X_3	Nhiệt độ	^{0}C	27	30	33

Mức tối ưu của ba yếu tố thời gian, nhiệt độ và pH được xác định từ kết quả thực nghiệm đơn yếu tố và được thiết kế ở 3 mức (-1, 0, +1). Ma trận thực nghiệm gồm 17 nghiệm thức, trong đó có 5 nghiệm thức ở tâm được thiết kế bởi phần mềm Design - Expert® 11.0 Stat - Ease, Inc., Minneapolis, USA.

Hàm đáp ứng được chọn là mật độ vi khuẩn (CFU/mL), mô hình hóa được biểu diễn bằng phương trình bậc hai: $Y = B_o + B_1X_1 + B_2X_2 + B_3X_3 + B_{12}X_1X_2 + B_{13}X_1X_3 + B_{23}X_2X_3 + B_{11}X_1^2 + B_{22}X_2^2 + B_{33}X_3^2$.

Trong đó: B_o là hệ số hồi quy tại tâm; B_1, B_2, B_3 là các hệ số bậc 1; B_{11}, B_{22}, B_{33} là các hệ số bậc 2; B_{12}, B_{23}, B_{13} là các hệ số tương tác của từng cặp yếu tố X_1, X_2, X_3 là các biến độc lập. Mỗi hệ số B đặc trưng cho ảnh hưởng của các yếu tố đến quá trình thu sinh khối của các chủng vi khuẩn.

2.4.7.4 Đánh giá hiệu quả gây chết sâu khi kết hợp các chủng vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kusrtaki*

Dựa vào thí nghiệm ở nội dung 2.4.5 và 2.4.6, chọn ra hai chủng vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kusrtaki* có khả năng chống chịu tia UV tốt nhất ở bước sóng 254 nm và 365 nm và khả năng lên men tối ưu, phối trộn hai chủng với tỷ lệ 1: 1. Tiến hành thử nghiệm hiệu quả diệt sâu tơ, sâu khoang và sâu xanh da láng (sâu ở giai đoạn tuổi 2). Thí nghiệm bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên, 1 yếu tố, 4 lần lặp lại.

Cây cải được 15 ngày tuổi, có từ 8 – 12 lá được trồng trong chậu đường kính 25 cm. Trên mỗi cây cải thả 10 con sâu tuổi 2. Chậu được đặt trên dĩa nhựa có chứa nước để đảm bảo cho sâu không bò ra khỏi cây cải. Mỗi chậu cải được đặt trong lồng lưới bằng vải màn thưa để đảm bảo môi trường bên trong luôn được thoáng khí. Bố trí các lồng thí nghiệm ở nơi thoáng mát.

Dịch vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kusrtaki* phân lập được pha loãng 1% với nồng độ 10^7, 10^8, 10^9 CFU/mL và phun lên các cây cải vào buổi chiều. Nghiệm thức đối chứng phun nước lã. Theo dõi và đếm số sâu còn sống sau 1 ngày, 2 ngày, 3 ngày, 5 ngày và 7 ngày sau phun dịch vi khuẩn.

Hiệu lực diệt sâu được tính theo công thức Abbott (1925): A (%) = (1 – T/C) x 100. Trong đó A (%) là chỉ số hiệu lực diệt sâu; C là số sâu sống sót ở nghiệm thức đối chứng; T là số sâu sống sót ở các nghiệm thức thí nghiệm.

2.4.7.5 Khảo sát mức nhiệt độ bảo quản chế phẩm VBt

Nhân sinh khối chủng vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* có hiệu lực diệt sâu cao trên môi trường dịch chiết nấm men tạo chế phẩm VBt ở điều kiện nhiệt độ

33ºC, pH 7, thời gian lên men là 48 giờ và 1% dịch tăng sinh (với mật độ 10^5 CFU/mL). Chế phẩm VBt được bảo quản ở các điều kiện nhiệt độ 4ºC, 25ºC và 35ºC trong thời gian 12 tháng. Định kỳ hàng tháng tiến hành đếm bào tử để xác định sự hiện diện của vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki.*

2.4.8 Khảo sát khả năng tăng sinh vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kusrtaki* bằng hệ thống lên men tự động 2 lít BioFlo 120

Bioflo 120 là hệ thống lên men loại nhỏ (dung tích 2 lít) sản xuất theo tiêu chuẩn công nghiệp ứng dụng cho lên men vi sinh hoặc nuôi cấy mô tế bào. Thiết kế công nghiệp với những đầu dò cao cấp và phần mềm điều khiển thông minh. Tính linh hoạt: Bình nuôi cấy được tiệt trùng bằng autoclave; Mô tơ khuấy trực tiếp với khả năng điều khiển tốc độ khuấy và chiều khuấy, 4 bơm nhu động gồm bơm điều khiển được tốc độ và bơm một tốc độ để nạp môi trường nuôi cấy, acid, base để cân bằng pH theo lập trình.

Phương pháp thực hiện: sử dụng 1 lít môi trường dịch chiết nấm men cho vào bình nuôi cấy và hấp tiệt trùng (121^0C/20 phút). Lên men ở điều kiện nhiệt độ 33ºC, pH 7, tốc độ khuấy 170 vòng/phút, DO 30, không khí 100%. Thí nghiệm được bố trí đơn yếu tố với 3 lần lặp lại và 4 nghiệm thức

Nghiệm thức	**Dịch tăng sinh (mật độ 10^3 CFU/mL)**
NT 1 (Lên men tự động BioFlo 120)	0,1%
NT 2 (Lên men tự động BioFlo 120)	0,5%
NT 3 (Lên men tự động BioFlo 120)	1,0%
NT 4 (Lên men thông thường - Đối chứng)	1,0%

Chi tiêu theo dõi: Mật độ vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kusrtaki* ở 12, 24 và 48 giờ sau lên men.

2.4.9 Đánh giá độc tính của chế phẩm VBt trên sâu khoang (*Spodoptera litura)*, sâu tơ (*Plutella xylostella)*, sâu xanh da láng (*Spodoptera exigua)* trong điều kiện nhà lưới

Tiến hành thử nghiệm chế phẩm vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kusrtaki* lên men bằng hệ thống lên men tự động (gọi tắt là chế phẩm VBt) với đối tượng thử nghiệm: sâu tơ, sâu khoang, sâu xanh da láng.

Phương pháp bố trí: Mỗi nghiệm thức là một chậu cải với đường kính 20 – 25 cm và thả 10 con sâu/nghiệm thức, chế phẩm được phun 1 lần, lúc sâu tuổi 2. Thí nghiệm được bố trí với 4 nghiệm thức, 4 lần lặp lại.

Nghiệm thức	Liều lượng (mL, g/ha)
NT 1 (Chế phẩm VBt lên men tự động)	1.000
NT 2 (Chế phẩm VBt lên men thông thường)	1.000
NT 3 (Vi-Bt® 32000 WP)	1.000
NT 4 Đối chứng (Phun nước cất)	1.000

Ghi chú: nồng độ dịch khuẩn của VBt lên men tự động – 10^{14} CFU/mL; VBt lên men thông thường – 10^{9} CFU/mL; Vi-Bt® 32000WP – 32.000 UI/mg

Chỉ tiêu theo dõi: Số sâu sống, chết trước phun, 1 ngày, 2 ngày, 3 ngày, 5 ngày và 7 ngày sau phun chế phẩm VBt ở tất cả nghiệm thức. Hiệu lực diệt sâu được tính theo công thức Abbott (1925): A (%) = (1 – T/C) x 100.

Rep 1	Rep 2	Rep 3	Rep 4
NT1	NT3	NT2	NT4
NT2	NT4	NT3	NT1
NT3	NT1	NT4	NT2
NT4	NT2	NT1	NT3

Hình 2.1 Sơ đồ bố trí thí nghiệm ở điều kiện nhà lưới.

2.4.10 Đánh giá độc tính của chế phẩm VBt trên sâu tơ (*Plutella xylostella*) ngoài đồng ruộng

Qua kết quả thử nghiệm hiệu lực diệt sâu trong điều kiện nhà lưới ở nội dung 2.4.9 tiến hành thử nghiệm ngoài đồng ruộng chế phẩm VBt với đối tượng thử nghiệm là sâu tơ ở ngoài đồng.

Phương pháp: Thí nghiệm được bố trí theo khối đầy đủ ngẫu nhiên, 4 lần lặp lại, mỗi ô thí nghiệm có diện tích 30 m^2. Ruộng bố trí thí nghiệm: không phun thuốc BVTV trong 2 vụ. Cây trồng: cải xanh.

Nghiệm thức	Liều lượng (mL, g/ha)
NT 1 (Chế phẩm VBt lên men tự động)	1.000
NT 2 (Chế phẩm VBt lên men thông thường)	1.000
NT 3 (Vi-Bt® 32000 WP)	1.000
NT 4 Đối chứng (Phun nước cất)	1.000

Ghi chú: nồng độ dịch khuẩn của VBt lên men tự động – 10^{14} CFU/mL; VBt lên men thông thường – 10^9 CFU/mL; Vi-Bt® 32000WP – 32.000 UI/mg

Số lần và thời điểm xử lý chế phẩm: Chế phẩm được phun 1 lần, lúc sâu tuổi 2 và mật độ sâu tơ 1 – 3 con/cây (cây cải ở giai đoạn 20 ngày sau trồng) . Phun thuốc vào buổi chiều mát. Lượng nước 400 L/ha. Dụng cụ xử lý: phun bằng bình bơm tay đeo vai.

Rep 1	Rep 2	Rep 3	Rep 4
NT 2	NT 3	NT 4	NT 1
NT 1	NT 4	NT 3	NT 2
NT 3	NT 1	NT 2	NT 4
NT 4	NT 2	NT 1	NT 3

Hình 2.2 Sơ đồ bố trí thí nghiệm ngoài đồng

Chỉ tiêu theo dõi: Mật số sâu tơ (con/cây) vào các thời điểm: trước khi xử lý thuốc và 1, 3, 5, 7, 14 ngày sau phun thuốc.

Phương pháp điều tra: Mỗi ô thí nghiệm chọn 05 điểm trên đường chéo góc, mỗi điểm điều tra 04 cây. Đếm số sâu tơ còn sống. Tính hiệu lực của thuốc theo công thức Henderson-Tilton: Hiệu lực (%) = (1 - (Ta.Cb)/(Tb.Ca)) x 100

Trong đó: Ta: Số sâu sống ở ô thí nghiệm sau xử lý; Tb: Số sâu sống ở ô thí nghiệm trước xử lý; Ca: Số sâu sống ở ô đối chứng sau xử lý; Cb: Số sâu sống ở ô đối chứng trước xử lý.

* Ảnh hưởng của chế phẩm đối với cây trồng: theo dõi từ 1, 3, 5 và 7 ngày sau phun chế phẩm. Theo dõi ảnh hưởng của chế phẩm đối với cây trồng theo thang phân cấp sau;

Cấp hại	Triệu chứng
1	Cây khỏe mạnh/không có triệu chứng ngộ độc.
2	Triệu chứng ngộ độc nhẹ, cây hơi cằn.
3	Triệu chứng ngộ độc nhẹ, nhưng dễ nhận biết.
4	Triệu chứng ngộ độc nặng hơn, nhưng chưa ảnh hưởng đến năng suất.
5	Cây biến màu, cháy lá nặng hoặc còi cọc. Có ảnh hưởng đến năng suất.
6, 9 ⟶	Triệu chứng ngộ độc tăng dần cho tới khi cây chết hoàn toàn

2.5 Xử lý và phân tích số liệu

Kết quả giải trình tự sẽ được xử lý bằng phần mềm Bioedit (ver 5.20), và so sánh với trình tự gen *cry1, cry2, cry4, cry9* trên cơ sở dữ liệu Genbank (NCBI).

Các số liệu trong thử nghiệm hiệu lực trừ sâu được xử lý thống kê ANOVA bằng phần mềm SPSS 16.0; tính giá trị trung bình và vẽ đồ thị bằng phần mềm Excel.

Các giá trị thu được từ thí nghiệm xác định LC_{50} và LT_{50} được tính bằng phần mềm PoloPlus© do LeOra Software viết vào năm 2002 để thực hiện các phép tính được mô tả trong phân tích probit của Finney (Finney, 1971).

Phần mềm quy hoạch thực nghiệm Design - Expert 11.0 (Stat-Ease Inc., USA) được sử dụng để phân tích phương sai (ANOVA), tính toán hệ số của phương trình hồi quy và đề xuất giải pháp cho mô hình tối ưu hóa.

Chương 3
KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1 Phân bố vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* và chọn lọc vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* trong đất ở các tỉnh, thành của Việt Nam

3.1.1 Phân bố vi khuẩn *Bacillus thuringiensis*

Phân lập *Bacillus thuringiensis* có nhiều phương pháp như sử dụng sốc nhiệt, kháng sinh và chọn lọc sodium acetate kết hợp với xử lý nhiệt. Phương pháp chọn lọc sodium acetate môi trường MPA được sử dụng phổ biến (Trương Phúc Hưng, 2010; Nguyễn Thiện Phú và Trần Thanh Thủy, 2013). Theo phương pháp của Travers và ctv (1987), môi trường T3 được dùng để phân lập vi khuẩn *B. thuringiensis* với hình thái khuẩn lạc có đặc điểm: thô, màu trắng và lan nhanh trên đĩa. Việc sử dụng môi trường T3 trong nghiên cứu phân lập *B. thuringiensis* cho kết quả phân lập cao hạn chế lẫn tạp với các vi khuẩn khác.

Bảng 3.1 Số mẫu đất phân lập ở các vùng đất tại các tỉnh, thành

Chỉ tiêu	Đất canh tác	Đất không canh tác				
		Trầm tích	Cát ven biển	Hải đảo	Rừng	Ven đường
Số mẫu đất thu thập	476	20	20	20	40	40
Số mẫu có khuẩn lạc nghi ngờ là *B. thuringiensis*	220	10	5	10	20	20
% (*)/Số mẫu thu thập	46,2	50,0	25,0	50,0	50,0	50,0
% (*)/Tổng số mẫu	35,7	1,6	0,8	1,6	3,2	3,2

Số mẫu có khuẩn lạc nghi ngờ là B. thuringiensis (*)

Kết quả trong 616 mẫu đất thu thập chưa từng sử dụng chế phẩm có nguồn gốc từ vi khuẩn *B.thuringiensis* từ các vùng đất canh tác và không canh tác ở các tỉnh, thành đã phân lập được 1.337 khuẩn lạc có hình thái khác nhau thuộc chi Bacillus, tiến hành thử nghiệm sinh hóa có 285 khuẩn lạc nghi ngờ là vi khuẩn *B.*

thuringiensis với các đặc điểm đặc trưng như: có khuẩn lạc màu trắng đục hoặc hồng nhạt, viền nhăn, bề mặt phẳng, khô, kích thước khuẩn lạc lớn (3 – 12 mm), chiếm 21,3 % tổng số mẫu khuẩn lạc (Bảng 3.1 và Bảng 3.2).

Bảng 3.2 Số mẫu *B. thuringiensis* phân lập tại các tỉnh, thành

Địa điểm	**Số mẫu đất hoặc bùn**	**Số chủng *Bacillus* spp. phân lập**	**Số chủng *Bt***	**Chỉ số *Bt***
Hà Nội	30	75	10	0,13
Vĩnh Phúc	30	62	8	0,13
Thái Bình	16	24	7	0,29
Hải Phòng	16	26	3	0,12
Hải Dương	20	32	2	0,06
Hưng Yên	15	27	3	0,11
Bắc Ninh	10	30	3	0,10
Hà Nam	20	48	2	0,04
Nam Định	15	39	3	0,08
Đà Nẵng	15	28	3	0,11
Quảng Nam	30	40	6	0,15
Bình Thuận	24	37	5	0,14
Lâm Đồng	30	219	73	0,33
Đồng Nai	30	42	17	0,40
Bà Rịa - Vũng Tàu	30	45	10	0,22
Tp.Hồ Chí Minh	120	228	69	0,30
Tây Ninh	25	45	5	0,11
Tiền Giang	50	60	9	0,15
Bến Tre	45	106	43	0,41
An Giang	15	37	1	0,03
Đồng Tháp	15	42	1	0,02
Kiên Giang	15	45	2	0,04
Tổng	**616**	**1.337**	**285**	

Chỉ số Bt: chỉ số giữa số khuẩn lạc sinh tinh thể trên số khuẩn lạc phân lập được

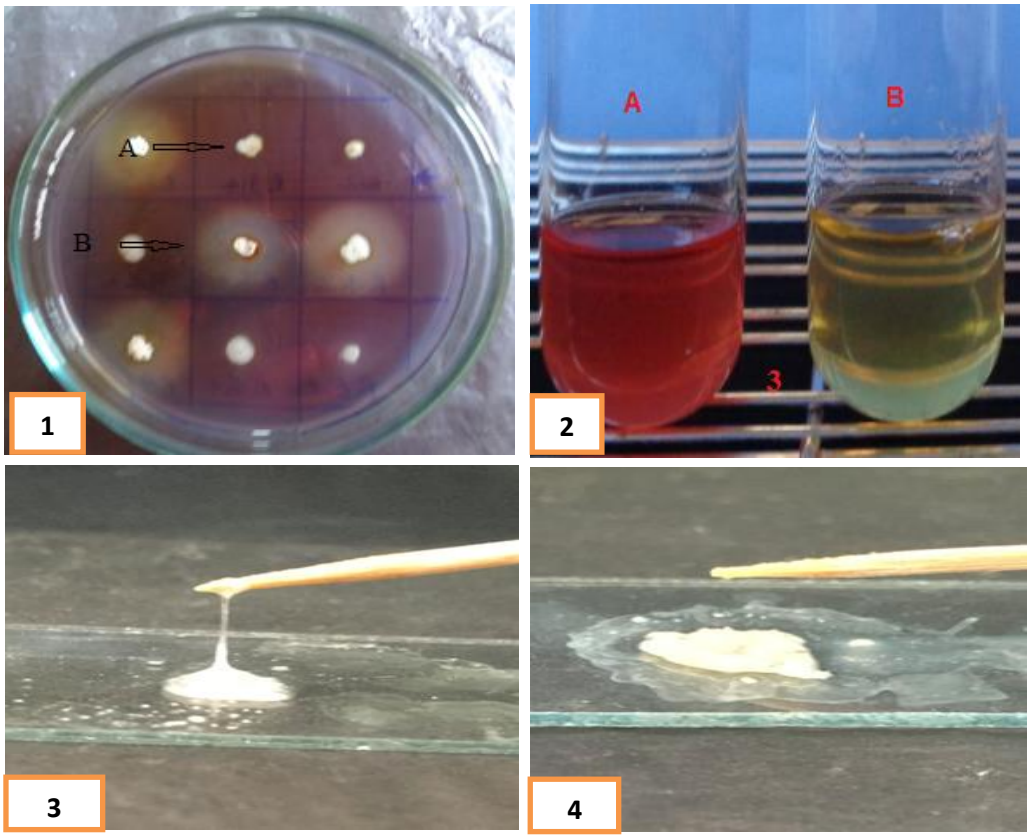
Sự hiện diện của vi khuẩn *B. thuringiensis* trong đất không có sự khác biệt giữa đất canh tác (46,2%) và đất không canh tác (46,4%). Tuy nhiên, mẫu đất canh tác (sản xuất lúa, rau, cây công nghiệp và cây ăn trái) luôn có chỉ số Bt cao hơn so với mẫu đất không canh tác. Chỉ số Bt ở những mẫu đất phân lập tại các vùng đất rừng của huyện Đơn Dương, Đức Trọng, thành phố Đà Lạt (0,30) cũng có sự khác nhau và cao hơn so với đất rừng ngập mặn Cần Giờ, thành phố Hồ Chí Minh (0,27). Chỉ số Bt cao nhất ở những mẫu thu thập từ tỉnh Đồng Nai (0,40), Bến Tre (0,41) trong khi những mẫu thu thập từ tỉnh Đồng Tháp và An Giang (0,02; 0,03) thấp nhất. Giữa các khu vực có sự khác nhau về chỉ số Bt, cụ thể khu vực Đông Nam bộ có chỉ số Bt cao nhất (0,74), Đồng bằng sông Cửu Long (0,40), Đồng bằng sông Hồng (0,24) và thấp nhất khu vực Duyên hải miền Trung (0,20). Từ đó có thể nhận thấy sự phân bố của vi khuẩn *B. thuringiensis* rất đa dạng tùy thuộc vào vùng địa lý, điều kiện tự nhiên, mẫu đất hay mẫu bùn, đồng thời cho thấy sự phân bố của vi khuẩn *B. thuringiensis* ở các mẫu đất canh tác và không canh tác cũng có sự khác nhau.

Theo Martin và Travers (1989) mẫu đất ở châu Á có chỉ số Bt là 0,85. Ở Việt Nam, Bùi Thị Hương và ctv (2005) cho thấy mẫu đất ở các tỉnh Miền Bắc có chỉ số Bt là 0,35 với các chủng vi khuẩn thuộc loài *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, var. *aizawai*, và var. *morrisoni.* Trong nghiên cứu này, *B. thuringiensis* hiện diện ở các vùng địa lý khác nhau ở Việt Nam với chỉ số Bt từ 0,2 đến 0,41.

3.1.2 Xác định chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* bằng phân tích sinh hóa

Từ 1.337 khuẩn lạc có đặc điểm hình thái khác nhau đã thu được 285 chủng vi khuẩn có các đặc điểm như hình que, Gram dương, sinh bào tử, catalase dương tính, có khả năng thủy phân tinh bột, phản ứng V.P dương tính. Theo Bergey, 285 chủng vi khuẩn này thuộc chi *Bacillus* spp. và là một trong số những loài: *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. polymyxa*, *B. licheniformic*, *B. alvei*, *B. coagulans*. Ngoài giống nhau về đặc điểm sinh hóa, 285 chủng vi khuẩn này có cùng đặc điểm là vi khuẩn Gram dương bắt màu tím, tế bào hình que, sinh bào tử bắt vòng đỏ, hình oval; Phản ứng catalase dương tính tạo bọt khí xuất hiện nhanh và mạnh; Phản ứng VP (Voges-Proskauer) cho kết quả dương tính khi bề mặt

môi trường có màu đỏ; Phản ứng thủy phân tinh bột xuất hiện quần sáng trắng xung quanh khuẩn lạc; Về khả năng di động, vi khuẩn mọc lan ra khỏi đường cấy, làm đục môi trường xung quanh; Vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* có chiều rộng lớn hơn hoặc bằng 1 µm (Bergey, 1977; Nguyễn Lân Dũng, 2000; Trần Văn Mão, 2008), (Hình 3.2, Hình 3.3).

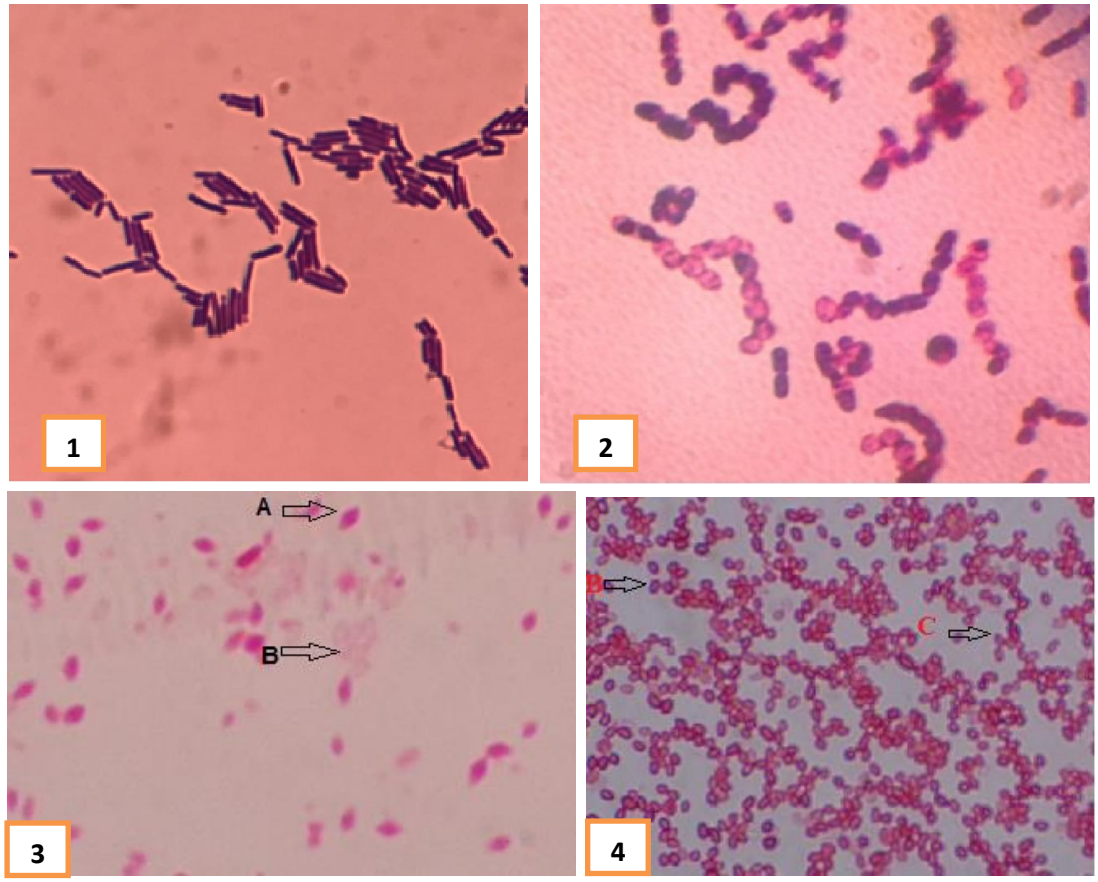


Hình 3.1 Các phản ứng sinh hóa định danh vi khuẩn *B. thuringiensis*

(1) Kết quả phản ứng thủy phân tinh bột: (A) vi khuẩn không có khả năng thủy phân tinh bột, (B) vi khuẩn có khả năng thủy phân tinh bột tạo vòng trắng sáng; (2) Kết quả phản ứng VP (Voges – Proskauer) A: Phản ứng VP dương tính (dung dịch màu đỏ nâu); B: Phản ứng VP âm tính (dung dịch màu vàng); (3) Phản ứng Catalase dương tính; (4) Phản ứng Catalase âm tính;

Dựa vào kích thước, các chủng vi khuẩn được phân thành 2 nhóm. Nhóm thứ nhất, vi khuẩn có chiều rộng nhỏ hơn 1 µm: có 24 chủng vi khuẩn, nhóm này không phù hợp với khoá phân loại của Bergey. Tuy nhiên, theo Đỗ Lý Thanh (2009) *B. thuringiensis* có thể có chiều rộng 0,72 - 1,02 µm, chiều dài là 2,35 - 3,25

µm. Nhóm thứ hai, vi khuẩn có chiều rộng lớn hơn hoặc bằng 1 µm: có 261 chủng vi khuẩn. So sánh với khóa phân loại của Bergey có khả năng là *B. thuringiensis*. Điều này cho thấy, sự biến động về kích thước vi khuẩn phụ thuộc vào điều kiện địa lý, khí hậu, môi trường nơi thu mẫu.



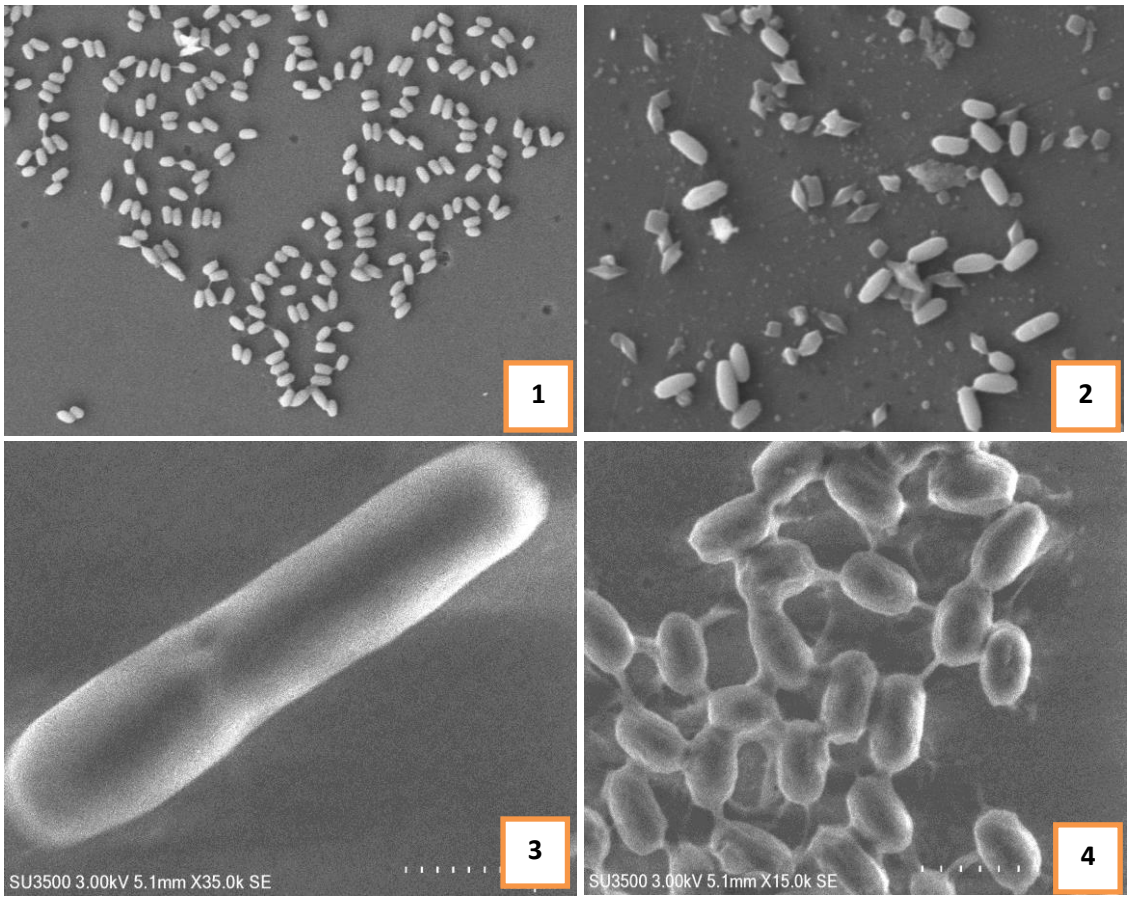
Hình 3.2 Bào tử và tinh thể vi khuẩn *Bacillus thuringiensis.*

Hình thái vi khuẩn (1) hình que, (2) hình cầu; (3) Hình dạng tinh thể độc vi khuẩn Bt quan sát dưới kính hiển vi với độ phóng đại 100X: (A) Tinh thể hình thoi; (B) bào tử vòng ngoài màu đỏ; (4) (C) tinh thể hình cầu

Sau khi nhuộm 261/285 chủng vi khuẩn có tinh thể bắt màu đỏ, bào tử có viền màu đỏ. Có 4 dạng tinh thể độc gồm hình thoi (48,3%), hình ovan (19,2%), hình cầu (19,9%) và hình quả trám (12,6%) trong các mẫu khảo sát. Phần lớn chủng vi khuẩn sinh tinh thể hình thoi tập trung ở các mẫu đất canh tác (Bảng 3.3).

Bảng 3.3 Các dạng tinh thể độc của *B. thuringiensis* từ các mẫu phân lập

Địa điểm	Số chủng vi khuẩn sinh tinh thể	Hình dạng tinh thể độc			
		Hình thoi	Hình ovan	Hình cầu	Hình quả trám
Hà Nội	10	-	4	5	1
Vĩnh Phúc	8	5	3	-	-
Thái Bình	7	4	1	1	1
Hải Phòng	3	1	1	-	1
Hải Dương	2	-	1	1	-
Hưng Yên	3	-	1	1	1
Bắc Ninh	3	1	-	2	-
Hà Nam	2	1	1	-	-
Nam Định	3	2	-	1	-
Đà Nẵng	3	3	-	-	-
Quảng Nam	6	2	1	2	1
Bình Thuận	5	3	1	1	
Lâm Đồng	70	29	14	15	12
Đồng Nai	16	10	1	1	4
Bà Rịa - Vũng Tàu	10	5	1	2	2
Tp.Hồ Chí Minh	62	34	11	12	5
Tây Ninh	5	3	-	2	-
Tiền Giang	9	5	2	1	1
Bến Tre	30	15	6	5	4
An Giang	1	1	-	-	-
Đồng Tháp	1	1	-	-	-
Kiên Giang	2	1	1	-	-
Tổng số tinh thể	**261**	**126**	**50**	**52**	**33**
%/tổng số tinh thể	**100**	**48,3**	**19,2**	**19,9**	**12,6**



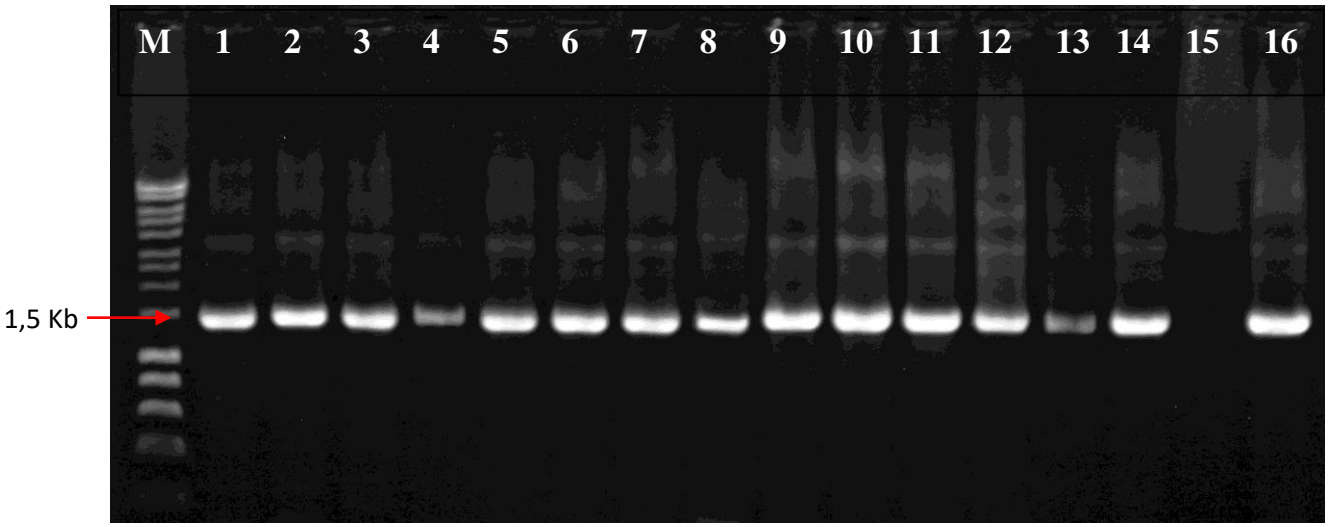
Hình 3.3 Hình dạng tinh thể độc của vi khuẩn *B. thuringiensis* quan sát dưới kính hiển vi điện tử quét SU3500.

(1) bào tử vi khuẩn Bt, (2) các dạng tinh thể vi khuẩn Bt (hình cầu, hình thoi, hình ovan; (3) tinh thể hình thoi; (4) tinh thể hình cầu.

Từ 616 mẫu đất nông nghiệp và phi nông nghiệp (trầm tích trong sông hồ, cát ven biển, hải đảo, rừng bảo tồn và ven đường) tại các vùng địa lý khác nhau ở Việt Nam, đã xác định có sự hiện diện của vi khuẩn *B. thuringiensis* ở 46,3% số mẫu đất. Qua đó cho thấy, sự phong phú về các dạng tinh thể độc của vi khuẩn *B. thuringiensis* ở các mẫu đất canh tác (46,2%). Trong bốn dạng tinh thể độc, hình thoi và hình cầu chiếm ưu thế trong quần thể *B. thuringiensis*. Kết quả nghiên cứu của luận án có sự tương đồng với các kết quả nghiên cứu của Martin và Travers (1989), Ngô Đình Bính và ctv (2005), Koichi và ctv (2006) về sự đa dạng, phong phú của các dạng tinh thể và sự phân bố của vi khuẩn *B. thuringiensis* ở trong đất.

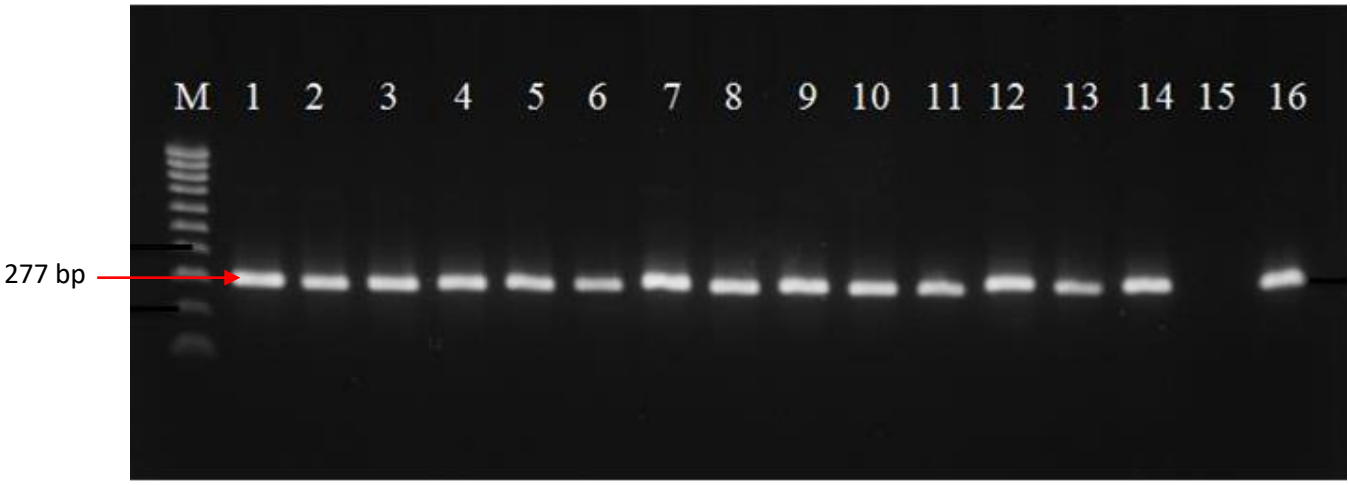
3.2 Xác định sự hiện diện gen *cry* của vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki*

Bên cạnh định danh vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* từ các phản ứng sinh hoá, việc định danh bằng kỹ thuật sinh học phân tử nhằm xác định chính xác được dòng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* mang các gen *cry* đã được công bố bởi các nhà nghiên cứu trong và ngoài nước. Trong đó, nhóm gen *cry1* mã hóa protein tinh thể diệt côn trùng bộ cánh vảy, nhóm gen *cry2* mã hóa protein tinh thể có khả năng diệt côn trùng bộ cánh vảy và hai cánh, nhóm *cry4* mã hóa protein tinh thể có khả năng diệt côn trùng bộ hai cánh và nhóm *cry9* mã hóa protein tinh thể diệt côn trùng bộ cánh vảy và cánh cứng (Wang và ctv, 2002). Theo lý thuyết, sản phẩm gen *cry1, cry2, cry4* với trình tự cặp mồi đặc hiệu có kích thước tương ứng 277 bp, 701 bp và 439 bp, sản phẩm gen *cry9* với cặp primer có kích thước 351 bp và vùng 16S-rDNA sản phẩm 1,5 Kb (Hình 3.4 – 3.7).



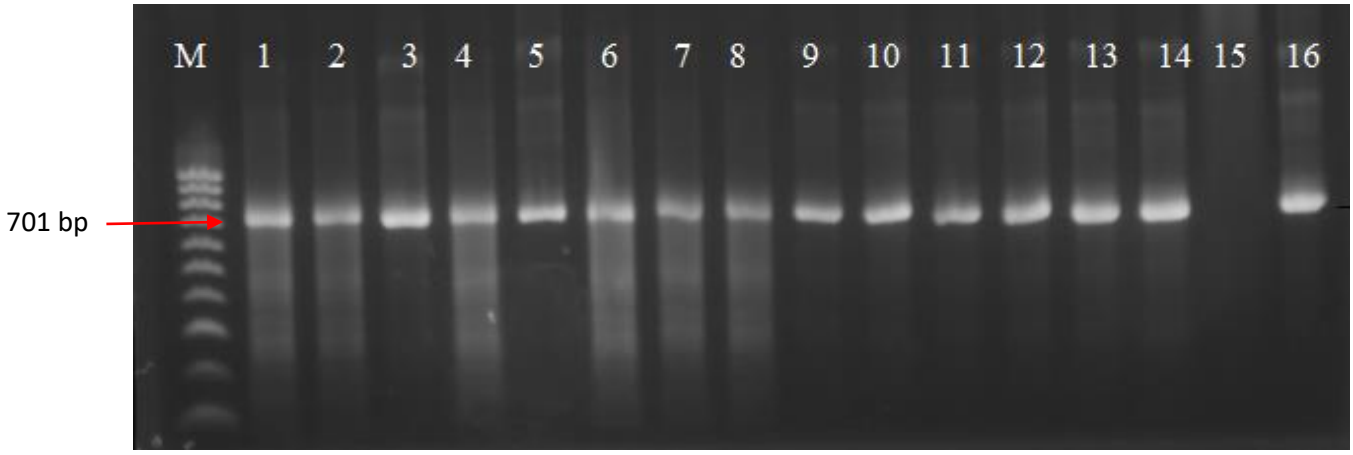
Hình 3.4 Kết quả điện di sản phẩm PCR vùng 16S-rDNA

M: thang chuẩn 1 Kb; (1) chủng VBt246.1, (2) chủng VBT2119.1, (3) chủng VBt21110.1, (4) chủng VBt22210.2, (5) chủng VBt25211.1, (6) chủng VBt283.2, (7) chủng VBt2847, (8) chủng VBt2735, (9) chủng VBt26310.1, (10) chủng VBt27322.2, (11) chủng VBt27525.1, (12) chủng VBt27526.1, (13) chủng VBt2762.2, (14) chủng VBt27618.2, (15) đối chứng âm, (16) đối chứng dương (vi khuẩn B. thuringiensis var. k*urstaki).*



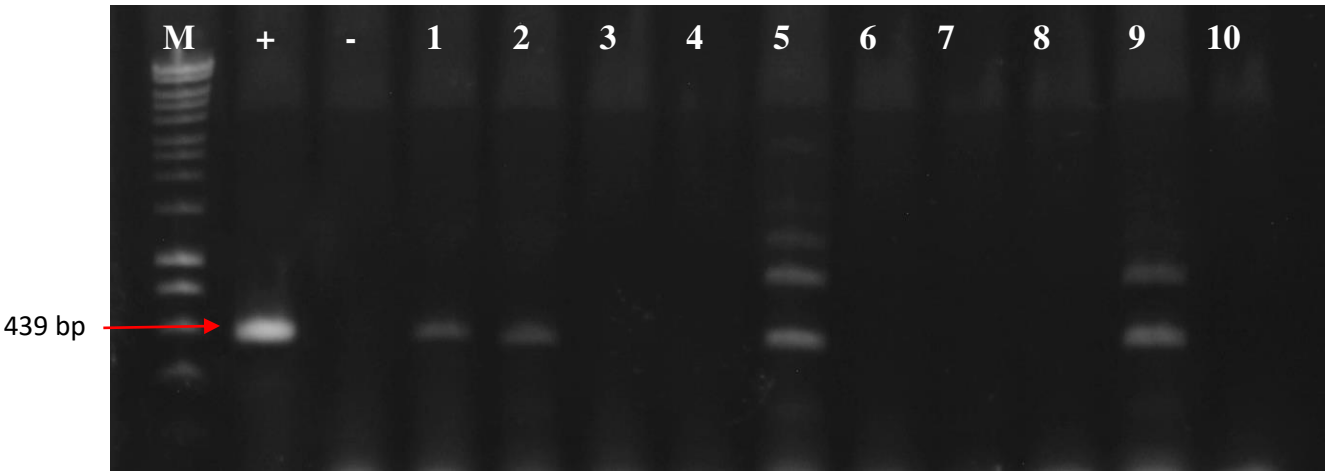
Hình 3.5 Kết quả điện di sản phẩm PCR với cặp primer Un1F - Un1R

M: thang chuẩn 100 bp, (1) chủng VBt246.1, (2) chủng VBT2119.1, (3) chủng VBt21110.1, (4) chủng VBt22210.2, (5) chủng VBt25211.1, (6) chủng VBt283.2, (7) chủng VBt2847, (8) chủng VBt2735, (9) chủng VBt26321.1, (10) chủng VBt27322.2, (11) chủng VBt2751, (12) chủng VBt2752, (13) chủng VBt2762.2, (14) chủng VBt27618.2, (15) đối chứng âm, (16) đối chứng dương (vi khuẩn B. thuringiensis var. k*urstaki).*



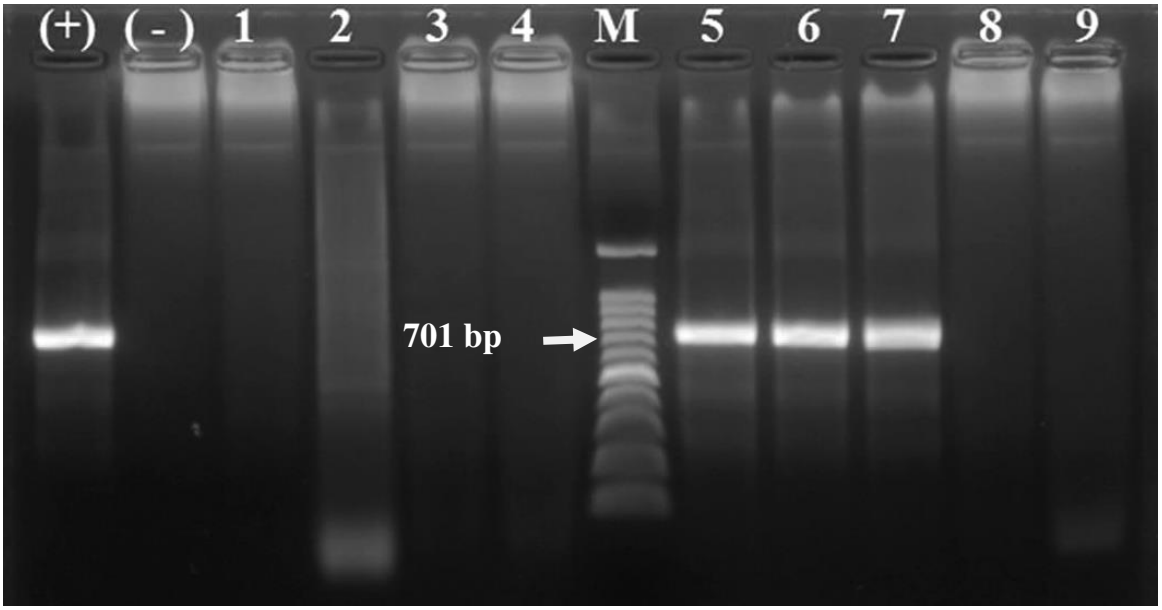
Hình 3.6 Kết quả điện di sản phẩm PCR với cặp primer Un2F - Un2R

M: thang chuẩn 100 bp, (1) chủng VBt246.1, (2) chủng VBt2413.1, (3) chủng VBt21110.1, (4) chủng VBt26310.1, (5) chủng VBt26321.1, (6) chủng VBt27310, (7) chủng VBt2767, (8) chủng VBt27611, (9) chủng VBt2874, (10) chủng VBt28150.2, (11) chủng VBt2751, (12) chủng VBt2752, (13) chủng VBt2857.1, (14) chủng VBt2836.1, (15) đối chứng âm, (16) đối chứng dương (vi khuẩn B. thuringiensis var. k*urstaki).*



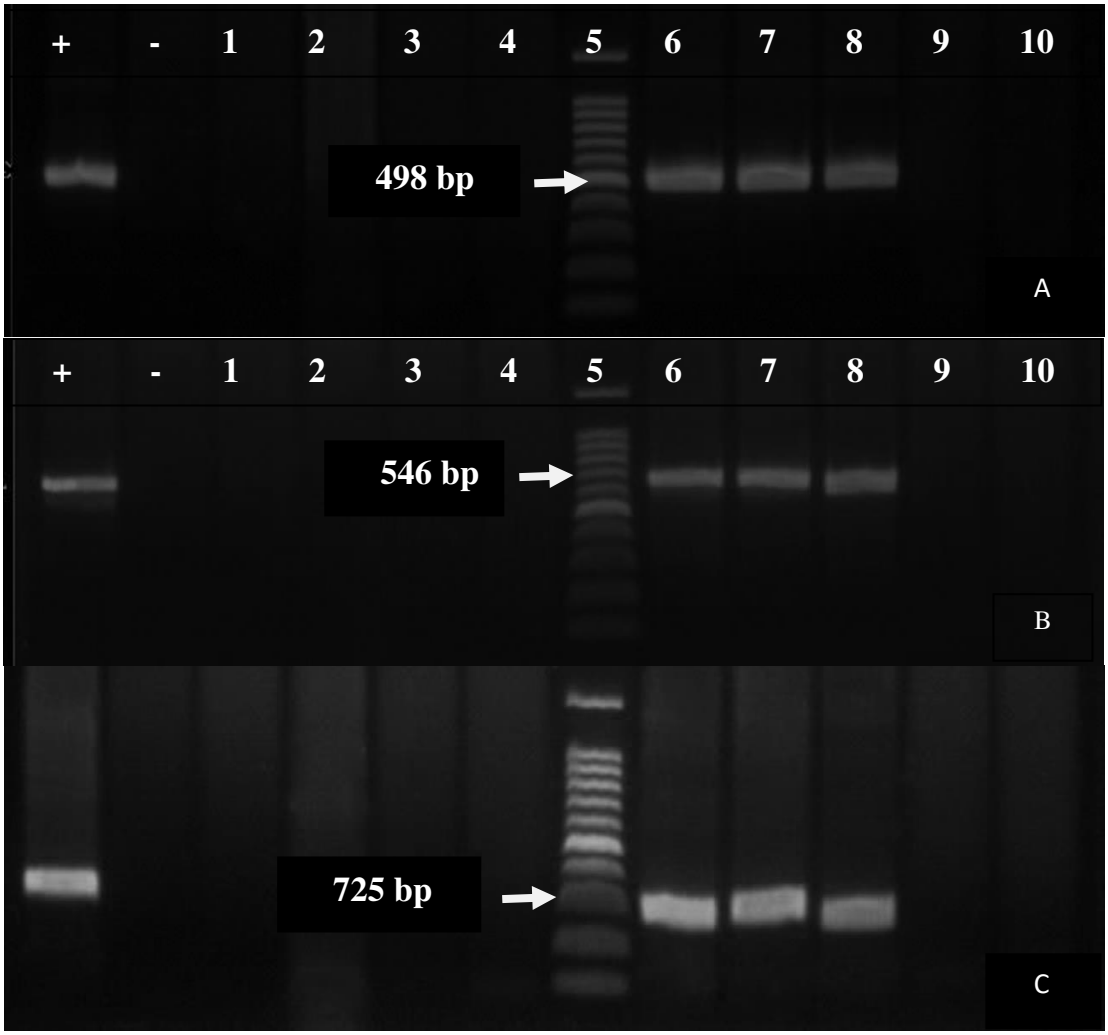
Hình 3.7 Kết quả điện di sản phẩm PCR với cặp primer Un4F- Un4R

M: thang chuẩn 100 bp, (+) đối chứng dương (vi khuẩn B. thuringiensis var. k*urstaki), (-) đối chứng âm,* ***(1)*** *chủng VBt246.1,* ***(2)*** *chủng VBt2857.1, (3) chủng VBt21110.1, (4) chủng VBt27611,* ***(5)*** *chủng VBt26310.1; (6) chủng VBt27618.2, (7) chủng VBt2767; (8) chủng VBt27525.1,* ***(9)*** *chủng VBt26321.1; (10) chủng VBt27526.1*



Hình 3.8 Kết quả điện di sản phẩm PCR với cặp primer Un2F- Un2R

(+) : đối chứng dương (vi khuẩn B. thuringiensis var *kurstaki); (-): nước cất,; các mẫu phân lập Bt, (1) dòng VBt2836.1; (2) dòng VBt2857.2; (3) dòng VBt2874.4; (4) dòng VBt28105.2; M: Thang đo;* ***(5)*** *dòng VBt2762.1;* ***(6)*** *dòng VBt2767.6****; (7)*** *dòng VBt26311.2; (8) dòng VBt27614.2; (9) dòng VBt27618.1*



Hình 3.9 Kết quả điện di sản phẩm khuếch đại của các mẫu phân lập *B. thuringiensis* với cặp primer 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) dòng VBt2836.1; (2) dòng VBt2857.2; (3) dòng VBt2874.4; (4) dòng VBt28105.2; (5) thang chuẩn DNA 100 bp (Promega);* ***(6)*** *dòng VBt2762.1;* ***(7)*** *dòng VBt2767.6;* ***(8)*** *dòng VBt26311.2; (9) dòng VBt27614.2; (10) dòng VBt27618.1.*

Từ kết quả kiểm tra mức độ tương đồng của sản phẩm PCR bằng công cụ Clustal Omega và BLAST- NCBI, cho thấy sự tương đồng cao giữa trình tự sản phẩm PCR với các trình tự gen *cry1* của vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* trên GenBank có từ 96 đến 100%, với sự hiện diện của gen *cry1Aa* và *cry1Ac*.

Nhiều primer chuyên biệt để phát hiện các phân nhóm *cry2A* bằng kỹ thuật PCR đã được phát triển và sử dụng (Ben-Dov và ctv, 1997). Kết quả xác định sự hiện diện của gen *cry2A* trên 9 mẫu *B. thuringiensis* phân lập ở Thành phố Hồ Chí Minh và Tây Ninh khi xuất hiện sản phẩm khuếch đại đặc trưng cho gen *cry2Aa* và *cry2Ab* ở 3/9 mẫu *B. thuringiensis* gồm VBt2762.1, VBt2767.6, VBt26311.2 (Hình 3.9). 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. Sản phẩm khuếch đại vùng gen *cry2Ac* với primer Un2F và EE-2AcR của các mẫu phân lập và đối chứng dương (Hình 3.9) có kích thước khoảng 300 bp – 350 bp không đúng với kích thước đã được công bố (725 bp).

Bảng 3.4 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)
Bt var *kurstaski* (*cry2A*)	677	96	MH475907.1, CP009999.1
VBt2110.1 (*cry1Aa, cry1Ac*)	512	100	MT892766
VBt27525.1 (*cry1Aa, cry1Ac*)	512	100	MT892767
VBt27526.1 (*cry1Aa, cry1Ac*)	512	100	MT892768
VBt2735 (*cry1Aa, cry1Ac*)	512	100	MT892769
VBt27611 (*cry2A*)	672	100	MW194253
VBt21110.1 (*cry2A*)	672	100	MW194254
VBt2751 (*cry2A*)	674	100	MW194255
VBt2752 (*cry2A*)	671	100	MW194256
VBt2755 (*cry2A*/Un2F)	674	93	MH475907.1
VBt2755 (*cry2A*/Un2R)	675	97	KP053646.1, KY212748.1
VBt2762.1 (*cry2A*/Un2F)	644	98 - 99	MH475907.1, KX24304.1,
VBt2762.1 (*cry2Aa*/Un2F)	469	99	KX24304.1
VBt2762.1 (*cry2Ab*/Un2F)	522	99	KY212748.1

Theo các tài liệu đã công bố, *B. thuringiensis* var. *kurstaki* thường mang gen *cry2Aa* và *cry2Ab* của phân nhóm *cry2A* (Ben-Dov và ctv, 1997; Katara và 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 và ctv, 1997; Mendoza và ctv, 2012) hoặc *cry2Aa* (Katara và ctv, 2016). Vì thế, sự khác biệt về kích thước ở sản phẩm khuếch đại gen *cry2Ac* trong nghiên cứu có thể là sản phẩm không đặc hiệu.

Để khẳng định kết quả PCR, tiến hành giải trình tự sản phẩm PCR, trong đó gồm 3 sản phẩm khuếch đại với primer Un2 (VBt2755, VBt2762.1 và *B. thuringiensis* var. *kurstaki*) và 3 sản phẩm khuếch đại của mẫu VBt2762.1 với primer chuyên biệt cho gen *cry2Aa*, *cry2Ab* và *cry2Ac*. Mẫu VBt2755 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 – 100%) với các trình tự thuộc nhóm *cry2A* của *B. thuringiensis* đã được công bố trên GenBank (Bảng 3.5). Giá trị tương đồng của mẫu đối chứng dương *B. thuringiensis* var. *kurstaki* đạt 96%. Sản phẩm khuếch đại với primer đặc hiệu gen *cry1Aa, cry1Ac*, *cry2Ac* được xác định trình tự và công bố trên Genbank.

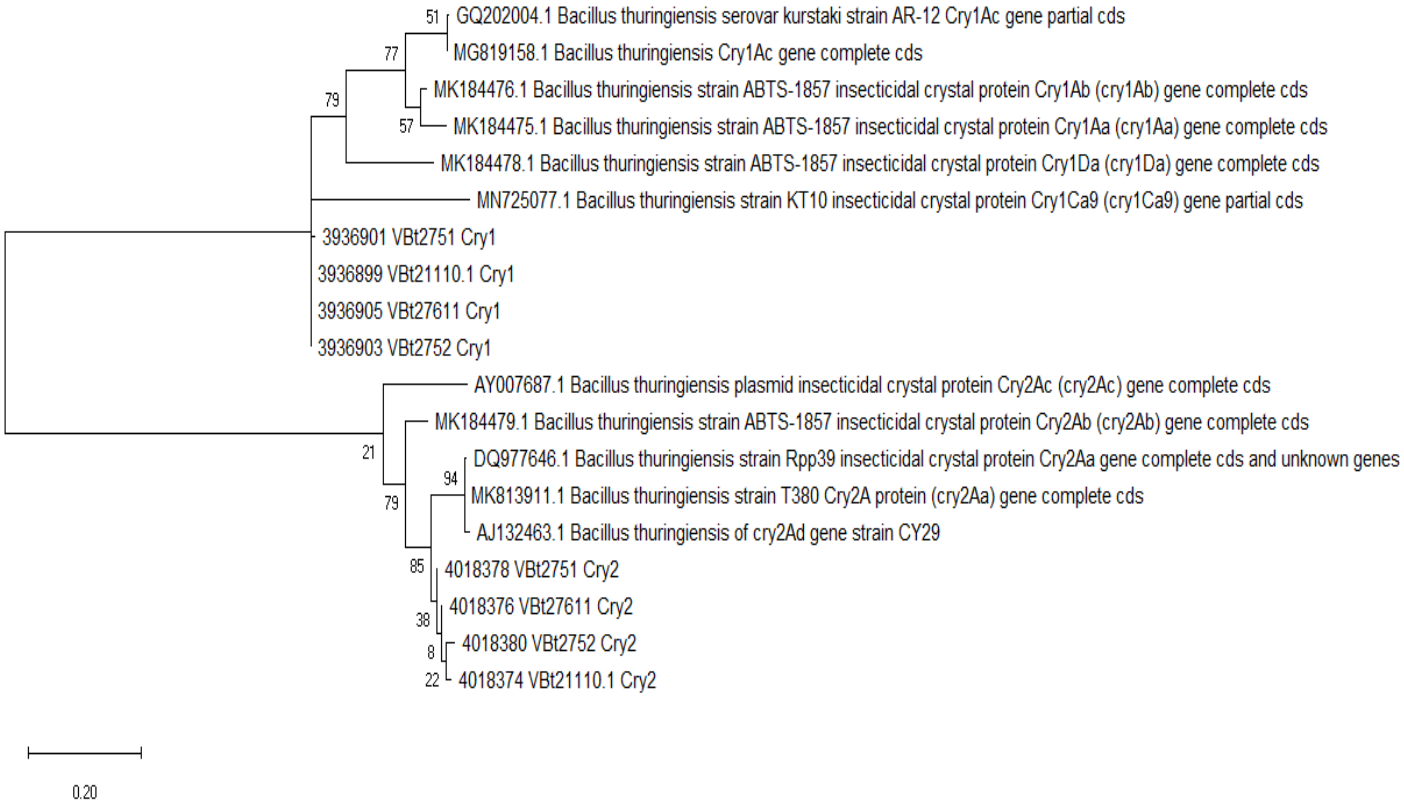
Kết quả phân tích cho thấy sự xuất hiện của nhóm gen *cry1* là nhiều nhất (63,3%), kế tiếp là *cry2* (28,7%), *cry4* (6,9%) và ít nhất là *cry9* (0,1%). Có những chủng vi khuẩn hiện diện cả 4 gen (*cry1, cry2, cry4, cry9)*, 2 đến 3 gen (*cry1* và *cry2; cry1* và *cry4; cry2* và *cry 4; cry1* và *cry9; cry1, cry2 và cry4)* trong cùng một mẫu (Bảng 3.5, Bảng phụ lục).

Theo Khojand (2013) ở các chủng *B. thuringiensis* gen *cry1* hiện diện nhiều nhất (91,7%), *cry2* (87,6%), *cry3* (50%) và *cry4* (42%). Tương tự, Wang (2003) cũng phát hiện ra sự hiện diện của *cry1* là 76,5%, *cry2* là 70% nhiều hơn so với các nhóm gen *cry* khác. Theo Jain (2012) khi nghiên cứu 8 chủng *B. thuringiensis* cho thấy kiểu *cry1* có nhiều nhất (100%) ở các chủng phân lập, tiếp theo là *vip3a*

(87,5%), *cry2* (75%), *cry9* (62%), *cry3* (50%), *cry11* (37,5%), *cry*7-8 (37,5%), *cry5* (25%), *cyt1* (25%), *cry4* (12,5%) và *cyt2* (12,5%).

Bảng 3.5 Số chủng vi khuẩn chứa gen độc tố *cry1, cry2, cry4, cry9*

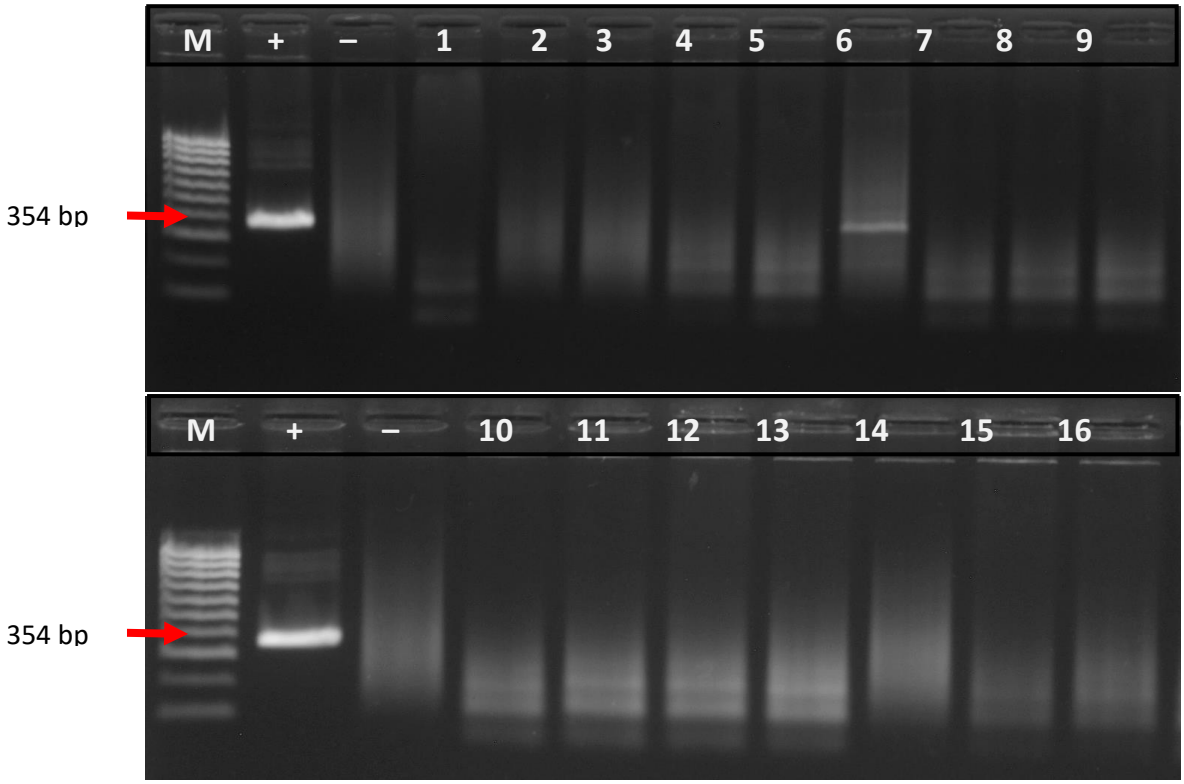
Địa điểm lấy mẫu	**Gen độc tố**							
	cry1	***cry2***	***cry4***	***cry9***	***cry1 + cry2***	***cry1 + cry4***	***cry4 + cry2***	***cry9 + cry1***
Hà Nội	4	2	1	0	1	1	0	0
Vĩnh Phúc	4	2	0	0	2	0	0	0
Thái Bình	3	1	0	0	1	0	0	0
Hải Phòng	2	0	0	0	0	0	0	0
Hải Dương	1	0	0	0	0	0	0	0
Hưng Yên	1	1	0	0	0	0	0	0
Bắc Ninh	1	0	0	0	0	0	0	0
Hà Nam	1	0	0	0	0	0	0	0
Nam Định	2	0	0	0	0	0	0	0
Đà Nẵng	2	0	0	0	0	0	0	0
Quảng Nam	2	0	0	0	0	0	0	0
Bình Thuận	3	2	0	0	2	0	0	0
Lâm Đồng	9	4	2	1	4	1	1	1
Đồng Nai	3	0	0	0	0	0	0	0
TP.HCM	8	5	1	0	4	0	1	0
Tây Ninh	5	4	0	0	4	0	0	0
Tiền Giang	4	4	1	0	2	1	0	0
Bến Tre	6	4	2	0	3	1	1	0
Đồng Tháp	1	0	0	0	0	0	0	0
Kiên Giang	2	0	0	0	0	0	0	0
Tổng	**64**	**29**	**7**	**1**	**23**	**4**	**3**	**1**
%/tổng gen	**63,3**	**28,7**	**6,9**	**0,1**				



Hình 3.10 Phân nhóm quan hệ của trình tự các mẫu phân lập *B. thuringiensis* var. *kurstaki* 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.

Các gen *cry1, cry2* được các tác giả Việt Nam tập trung nghiên cứu nhiều hơn so với các gen khác như *cry4* và *cry9*. Trong khi đó, gen *cry9* được các nhà khoa học ngoài nước nghiên cứu và phát hiện các gen mới (Ben Dov và ctv, 1997; Bravo và ctv, 1998; Patel và ctv, 2011). Theo Shu và ctv (2013), gen *cry9* có khả năng hỗ trợ cho việc gây bệnh các loài sâu hại có tính kháng các dòng *cry1* (Tabashnik và ctv, 2000).



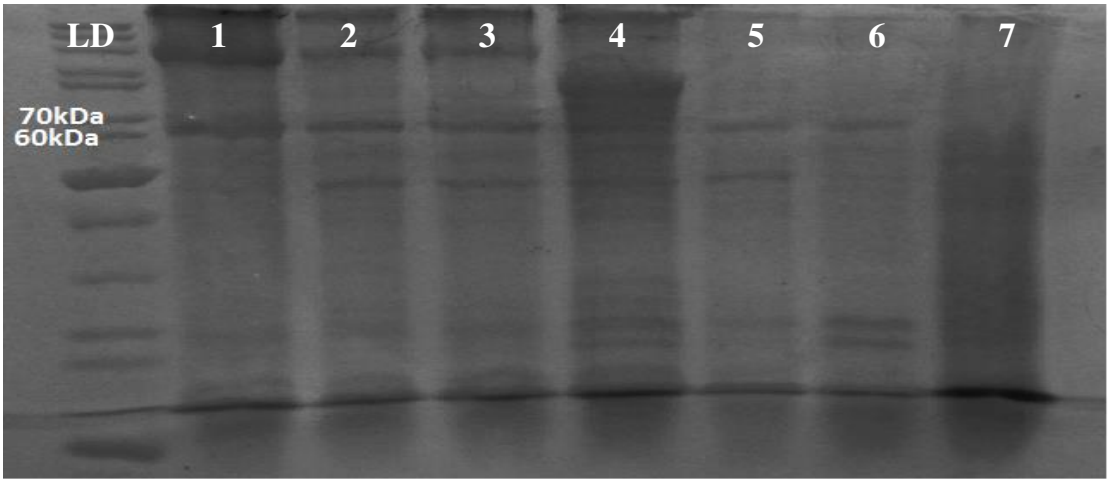
Hình 3.11 Kết quả điện di sản phẩm PCR với cặp primer UN9F – UN9R

M: thang chuẩn 100 bp; (1) dòng VBt26310.3; (2) dòng VBt26311.1; (3) dòng VBt26312.2; (4) dòng VBt26313.2; (5) dòng VBt26314.5; ***(6)*** *dòng VBt26310; (7) dòng VBt26315.4; (8) dòng VBt26316.2; (9) dòng VBt26317.5; (10) dòng VBt26318.2; (11) dòng VBt26321.4; (12) dòng VBt26325.3; (13) dòng VBt26327.1; (14) dòng VBt 26327.2; (15) dòng VBt26322.5; (16) dòng VBt26318.5*

So với các công bố trong và ngoài nước, cho thấy tần suất xuất hiện của gen *cry1, cry2* và *cry4* tương đối cao và thường xuất hiện cùng nhau. Gen *cry9* có tần suất xuất hiện tương đối thấp 0,1%, còn các nghiên cứu của các tác giả ngoài nước có tần xuất từ 2,6% – 15,5% (Ben Dov và ctv, 1997; Bravo và ctv, 1998; Zhang và ctv, 2000; Wang và ctv, 2003;), và ít xuất hiện cùng gen *cry1* và *cry2*. Ben Dov và ctv (1999) đã phát hiện rằng trong số các mẫu có gen *cry9* thì cũng hiện diện một hoặc cả hai gen *cry1* và gen *cry2*.

3.3 Xác định sự hiện diện gen *vip3a* của vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki*

Các dòng vi khuẩn *B. thuringiensis* được nuôi cấy trên môi trường LB trong 72 – 96 giờ, sau đó tiến hành nhuộm bào tử và tinh thể. Kết quả cho thấy, tất cả các dòng đều có sự xuất hiện bào tử, tuy nhiên có 5 trong 10 dòng có khả năng tạo tinh thể (VBt2119.1; VBt21110.1; VBt2735.1; VBt2736.2 và VBt27510.2) và các dòng này đều cho tinh thể dạng hình thoi. Từ các dòng tạo tinh thể hình thoi (VBt2119.1; VBt21110.1; VBt2735.1; VBt2736.2 và VBt27510.2) tiến hành kiểm tra sự biểu hiện của protein Vip3a

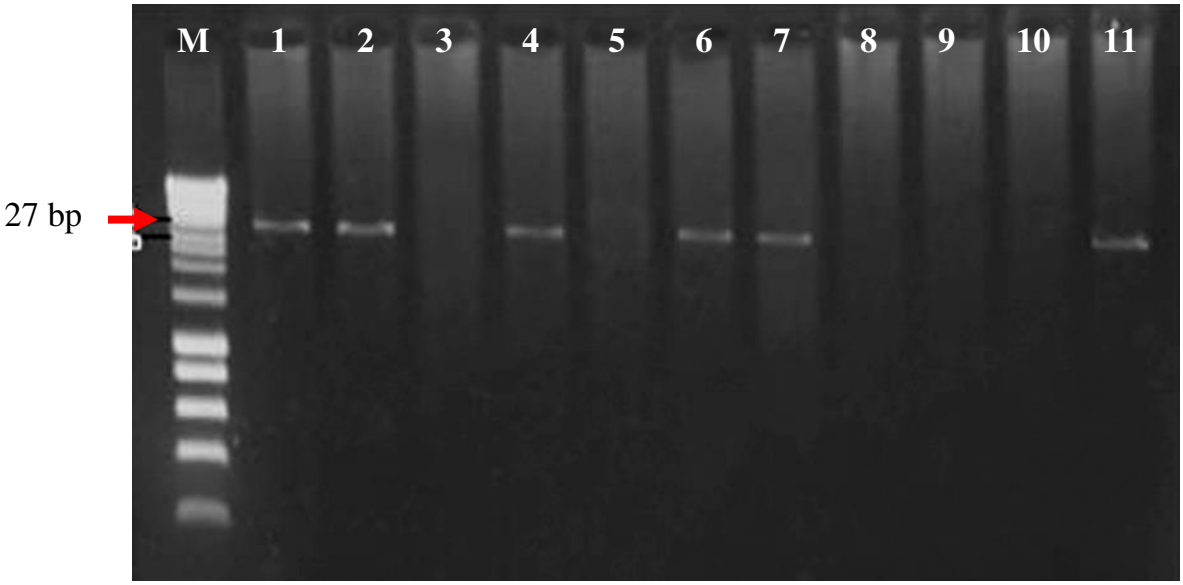


Hình 3.12 Kết quả kiểm tra sự biểu hiện của protein Vip3a trên gel SDS-polyacrylamide 12%.

Ghi chú: (1) Đối chứng dương; (2) dòng VBt2119.1; (3) dòng VBt21110.1; (4) dòng VBt2735.1; (5) dòng VBt2736.2; (6) dòng VBtT10.2; (7) đối chứng âm; LD : thang protein chuẩn 10 – 200 kDa.(Promega)

Kết quả điện di sản phẩm PCR cho thấy có 5 mẫu (VBt2119.1, VBt21110.1, VBt2735.1, VBt2736.2 và VBt27510.2) có sản phẩm khuếch đại với kích thước khoảng 66 kDa (Hình 3.12). Tất cả các chủng đều có sự xuất hiện bào tử, tuy nhiên chỉ có 5 chủng (VBt2119.1, VBt21110.1, VBt2735.1, VBt2736.2 và VBt27510.2) trong 10 chủng (VBt2119.1, VBt21110.1, VBt2751.3, VBt27510.2, VBt2736.2, VBt2735.1, VBt2751, VBt26313.2, VBt26311.1, VBt26323.1) có khả năng tạo tinh thể và các chủng này đều cho tinh thể dạng hình thoi. Các chủng không sinh tinh thể

đều không cho sản phẩm ở phản ứng PCR. Điều này chứng minh khả năng sinh tinh thể độc có liên quan mật thiết với sự hiện diện của các gen gây độc nói chung và gen *vip3a* nói riêng.



Hình 3.13 Kết quả điện di sản phẩm PCR vùng gen *vip3a*

M thang protein chuẩn 10 – 200 kDa.(Promega); ***(1)*** *dòng VBt2119.1;* ***(2)*** *dòng VBt21110.1; (3) dòng VBt2751.3;* ***(4)*** *dòng VBt27510.2****; (5)*** *dòng VBt2736.2****; (6) dòng*** *VBt2735.1; (7) dòng VBt2751.2; (8) dòng VBt26313.2; (9) dòng VBt26311.1; (10) dòng VBt26323.1; (11) đối chứng dương.*

So với các gen gây độc khác như *cry* hay *cyt*, *vip3a* có khả năng diệt nhiều loài côn trùng hơn. Bên cạnh đó, *vip3a* còn có khả năng kiểm soát một số đối tượng côn trùng kháng với các gen *cry1* hoặc *cry2 (*Estruch và ctv, 1996; Lee và ctv, 2003). Yu và ctv (2011) đã phân lập từ 1.789 mẫu đất được 2.134 chủng *B. thuringiensis* mang 3 gen *vip* gồm *vip3* (67,4%), *vip2* (14,6%), *vip1* (8,1%). Gen *vip3a* rất được quan tâm trên thế giới trong việc tạo ra chế phẩm sinh học trong khi tại Việt Nam, gen *vip* ít được nghiên cứu so với các gen *cry* hay *cyt*.

3.4 Khả năng gây chết sâu khoang (*Spodoptera litura*), sâu tơ (*Plutella xylostella*), sâu xanh da láng (*Spodoptera exigua*) của các chủng vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* phân lập

Từ 261 mẫu vi khuẩn sinh tinh thể đã xác định được 20 chủng vi khuẩn

mang gen *cry1, cry2, cry4, cry9* và *vip3a* phân lập ở các tỉnh Vĩnh Phúc, Lâm Đồng, Thành phố Hồ Chí Minh, Tây Ninh, Tiền Giang và Bến Tre. Một ngày sau xử lý, ghi nhận có sâu chết và tăng dần đến ngày thứ 7 sau xử lý.

Bảng 3.6 Hiệu quả gây chết (%) sâu tơ (*Plutella xylostella*) của các chủng vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki*

Số TT	Chủng vi khuẩn	1 NSXL	3 NSXL	5 NSXL	7 NSXL
1	VBt246.1	27,5 abc	45,0 ab	52,5 bc	60,0 cde
2	VBt2413.1	17,5 cbd	25,0 de	40,0 cd	55,0 cd
3	VBt2119.1	25,0 abcd	40,0 abcd	70,0 ab	77,5 ab
4	VBt21110.1	32,5 a	50,0 a	75,0 a	82,5 a
5	VBt25211.1	12,5 de	25,0 de	42,5 cd	57,5 cde
6	VBt281.3	27,5 abc	42,5 abc	70,0 ab	77,5 ab
7	VBt283.2	15,0 cd	32,5 bcde	45,0 cd	62,5 cd
8	VBt2847	22,5 abcd	40,0 abcd	62,5 b	67,5 bc
9	VBt2639.5	17,5 cbd	27,5 cde	35,0 d	50,0 d
10	VBt26317.2	15,0 cd	22,5 e	40,0 cd	50,0 d
11	VBt26310.1	25,0 abcd	45,0 ab	70,0 ab	77,5 ab
12	VBt2736.2	30,0 ab	50,0 a	72,5 a	80,0 a
13	VBt27310	12,5 de	30,0 bcde	50,0 c	55,0 cd
14	VBt2735.1	22,5 abcd	35,0 abcde	67,5 ab	77,5 ab
15	VBt2751	22,5 abcd	42,5 abc	62,5 b	75,0 ab
16	VBt2752.2	20,0 abcd	40,0 abcd	65,0 ab	75,0 ab
17	VBt2762.1	30,0 ab	42,5 abc	70,0 ab	75,0 ab
18	VBt2767.6	32,5 a	50,0 a	70,0 ab	80,0 a
19	VBt27510	20,0 abcd	35,0 abcde	62,5 ab	75,0 ab
20	VBt27611	12,5 de	20,0 e	40,0 cd	52,5 cd
	ĐC	0,0 f	0,0 f	0,0 f	0,0 f
	Mức ý nghĩa	**	**	**	**
	CV (%)	2,9	2,0	1,2	1,2

Bảng 3.7 Hiệu quả gây chết (%) sâu khoang (*Spodoptera litura*) của các chủng vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki*

Số TT	NT	1 NSXL	3 NSXL	5 NSXL	7 NSXL
1	VBt246.1	17,5 d-g	30,0 d-g	45,0 def	55,0 def
2	VBt2413.1	7,5 g	17,5 g	30,0 g	42,5 g
3	VBt2119.1	30,0 a-d	52,5 ab	62,5 ab	72,5 abc
4	VBt21110.1	35,0 ab	47,5 abc	65,0 a	77,5 a
5	VBt25211.1	17,5 d-g	30,0 d-g	50,0 b-e	57,5 def
6	VBt281.3	22,5 b-e	42,5 a-d	60,0 abc	65,0 bcd
7	VBt283.2	7,5 g	22,5 fg	40,0 fg	50,0 fg
8	VBt2847	15,0 efg	27,5 efg	42,5 efg	55,0 def
9	VBt2639.5	10,0 fg	30,0 d-g	40,0 fg	52,5 efg
10	VBt26317.2	17,5 d-g	27,5 efg	42,5 efg	57,5 def
11	VBt26310.1	32,5 abc	55,0 a	67,5 a	80,0 a
12	VBt2736.2	32,5 abc	55,0 a	60,0 abc	72,5 abc
13	VBt27310	22,5 b-e	35,0 c-f	47,5 c-f	52,5 efg
14	VBt2735.1	37,5 a	52,5 ab	67,5 a	77,5 a
15	VBt2751	25,0 a-e	47,5 abc	60,0 abc	75,0 ab
16	VBt2752.2	20,0 c-f	40,0 b-e	55,0 a-d	70,0 abc
17	VBt2762.1	17,5 d-g	42,5 a-d	60,0 abc	77,5 a
18	VBt2767.6	27,5 a-e	50,0 ab	65,0 a	70,0 abc
19	VBt27510	25,0 a-e	47,5 abc	57,5 a-d	70,0 abc
20	VBt27611	27,5 a-e	40,0 b-e	47,5 c-f	62,5 cde
	ĐC	0,0 h	0,0 h	0,0 h	0,0 h
	Mức ý nghĩa	**	**	**	**
	CV (%)	2,3	1,6	1,4	1,3

Bảng 3.8 Hiệu quả gây chết (%) sâu xanh da láng (*Spodoptera exigua*) của các chủng vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki*

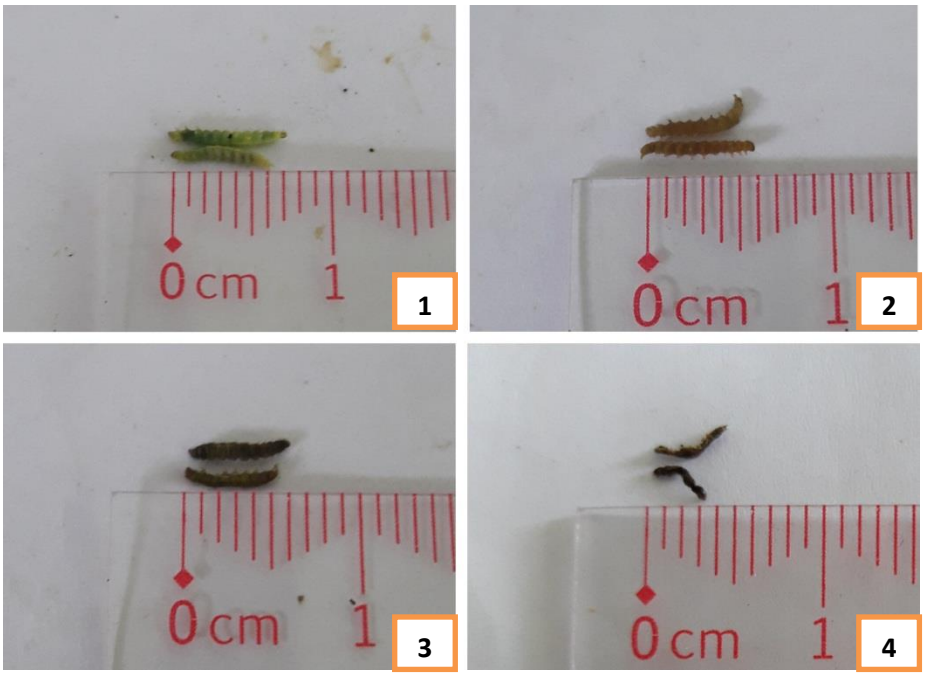
Số TT	NT	1 NSXL	3 NSXL	5 NSXL	7 NSXL
1	VBt246.1	10,0 f	22,5 de	32,5 e	42,5 def
2	VBt2413.1	20,0 b-f	27,5 cde	30,0 e	40,0 ef
3	VBt2119.1	27,5 abc	37,5 abc	67,5 a	70,0 ab
4	VBt21110.1	15,0 def	47,5 a	65,0 ab	72,5 a
5	VBt25211.1	12,5 ef	22,5 de	30,0 e	67,5 ab
6	VBt281.3	22,5 a-e	45,0 ab	65,0 ab	70,0 ab
7	VBt283.2	22,5 a-e	32,5 b-e	47,5 cd	52,5 cd
8	VBt2847	17,5 cde	27,5 cde	40,0 de	50,0 cde
9	VBt2639.5	12,5 ef	27,5 cde	40,0 de	45,0 def
10	VBt26317.2	15,0 def	27,5 cde	35,0 e	50,0 cde
11	VBt26310.1	30,0 ab	35,0 a-d	67,5 a	75,0 a
12	VBt2736.2	25,0 a-d	35,0 a-d	65,0 ab	75,0 a
13	VBt27310	32,5 a	37,5 abc	57,5 abc	60,0 bc
14	VBt2735.1	22,5 a-e	47,5 a	65,0 ab	75,0 a
15	VBt2751	30,0 ab	42,5 ab	60,0 ab	70,0 ab
16	VBt2752.2	17,5 cde	37,5 abc	55,0 bc	70,0 ab
17	VBt2762.1	20,0 b-f	45,0 ab	65,0 ab	65,0 ab
18	VBt2767.6	15,0 def	40,0 abc	60,0 ab	72,5 a
19	VBt27510	15,0 def	32,5 b-e	55,0 bc	65,0 ab
20	VBt27611	12,5 ef	20,0 e	30,0 e	42,5 def
	ĐC	0,0 g	0,0 f	0,0 f	0,0 g
Mức ý nghĩa		**	**	**	**
CV (%)		8,6	2,0	1,2	1,2

Có 11 chủng vi khuẩn gây chết 75 – 80% sâu tơ, cao nhất là các chủng VBt21110.1 (phân lập từ tỉnh Vĩnh Phúc), VBt2736.2 (Tiền Giang), VBt2767.6 (Tây Ninh) và VBt26310.1 (Lâm Đồng) (Bảng 3.6).

Hai mươi chủng vi khuẩn đều có khả năng diệt sâu khoang. Ở ngày thứ 7 sau xử lý, chủng VBt26310.1 có hiệu lực diệt sâu cao nhất là 80,0% (Bảng 3.7).

Đối với sâu xanh da láng, 3 chủng VBt26310.1 (thu thập ở Lâm Đồng) VBt2736.2 và chủng VBt2735.1 (Tiền Giang) đạt hiệu lực diệt sâu 75,0% cao hơn các chủng còn lại (Bảng 3.8).

Hiệu lực diệt sâu tơ, sâu khoang và sâu xanh da láng của các chủng vi khuẩn nghiên cứu đạt từ 72 – 80%. Một số mẫu vi khuẩn *B. thuringiensis* gen *cry1* và *cry2* có khả năng diệt sâu tơ, sâu khoang và sâu xanh da láng như VBt2110.1 (mẫu phân lập từ tỉnh Vĩnh Phúc mang *cry1, cry2 và vip3a*), VBt26317.2 (Lâm Đồng, *cry1 cry2*), VBt2735.1 (Tiền Giang, *cry1, cry2 và vip3a*), VBt2767.6 (Tây Ninh, *cry1* và *cry2*) là các chủng có hiệu lực gây chết sâu cao.



Hình 3.14 Sâu tơ chết do vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki*

(1) Sau 12 giờ; (2) Sau 24 giờ; (3) Sau 48 giờ; (4) Sau 72 giờ.

Grove và ctv (2001) xác định tinh thể protein độc làm giảm thời gian sống của ấu trùng *Heliothis virescens, Spodoptera exigua, Plutella xylostella* có thể được kiểm soát bởi vi khuẩn *B. thuringiensis* (Ranjbari và ctv, 2011; Bùi Thị Hương và ctv, 2011). Kết quả nghiên cứu cho thấy hiệu lực diệt sâu tơ, sâu khoang và sâu xanh da láng của các chủng vi khuẩn *B. thuringiensis* nghiên cứu đạt từ 72 – 80% tương đối cao. Qua quan sát số sâu ở các nghiệm thức và hình thái của sâu chết chuyển dần sang màu nâu vàng qua đen, khô rồi co quắt lại là những biểu hiện chết do vi khuẩn *B. thuringiensis* gây ra (Ngô Đình Bính và ctv, 2010). Với kết quả phân tích PCR, chứng tỏ vi khuẩn *B. thuringiensis* được xác định có mang gen *cry1* và *cry2* có khả năng diệt sâu tơ, sâu khoang và sâu xanh da láng như: VBt21110.1 (mẫu phân lập từ tỉnh Vĩnh Phúc mang gen *cry1*), VBt26317.2 (từ Lâm Đồng mang gen *cry2*), VBt2735.1 (từ Tiền Giang mang gen *cry1*), VBt2767.6 (từ Tây Ninh mang gen *cry1* và *cry2*) là các chủng có hiệu lực gây bệnh sâu cao. Việc xác định gen *cry9* có thể được sử dụng như một sự lựa chọn để quản lý tính kháng của nhiều loài bộ cánh vảy.

Kết quả thử nghiệm sinh học của Ngô Đình Bính và ctv (2005) đã xác định 127 chủng vi khuẩn *B. thuringiensis* diệt được sâu tơ. Từ kết quả nghiên cứu này, cung cấp cơ sở cho khai thác và sử dụng vi khuẩn *B. thuringiensis* vào sản xuất chế phẩm thuốc trừ sâu phục vụ cho chương trình phòng trừ sâu hại bằng tác nhân sinh học.

Từ kết quả đánh giá ban đầu, tiến hành chọn lọc 12 chủng vi khuẩn VBt2119.1, VBt21110.1 (phân lập từ tỉnh Vĩnh Phúc), VBt2631.3, VBt26310.1, VBt26311.1 (Lâm Đồng), VBt2813 (Thành phố Hồ Chí Minh) VBt2735.1, VBt2736.2 (Tiền Giang), VBt2751, VBt2752 (Bến Tre), VBt2762.1, VBt2767.6 (Tây Ninh) là các chủng mang gen độc tố *cry1, cry2, cry4, cry9* và *vip3a* gây chết cho bộ cánh vảy.

3.5 Giá trị LC_{50}, LT_{50} của các chủng vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* đối với sâu tơ, sâu khoang, sâu xanh da láng trong điều kiện phòng thí nghiệm

3.5.1 Giá trị LC_{50}, LT_{50} của các chủng vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* đối với sâu tơ

Thí nghiệm đã xác định giá trị LC_{50} đối với sâu tơ tuổi 2 và tuổi 4 của chủng vi khuẩn VBt2119.1 là 1,6 x 10^5 CFU/mL và 1,5 x 10^6 CFU/mL, ở chủng VBt2736.2 là 6,8 x 10^5 CFU/mL và 5,1 x 10^6 CFU/mL; ở chủng VBt2751 là 1,8 x 10^6 CFU/mL và 1,2 x 10^7 CFU/mL; chủng VBt2767.6 là 3,2 x 10^6 CFU/mL và 6,3 x 10^7 CFU/mL. Kết quả phân tích LC_{50} của các chủng vi khuẩn có độ dốc từ 0,171 đến 0,223 cho thấy sâu tơ có sự mẫn cảm với vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* trong điều kiện phòng thí nghiệm (Bảng 3.9).

Bảng 3.9 LC_{50} của bốn chủng vi khuẩn đối với sâu tơ giai đoạn tuổi 2 và tuổi 4 trong điều kiện phòng thí nghiệm

Tuổi sâu	Trọng lượng (mg ± SE)	Chủng vi khuẩn	Độ dốc	LC_{50} (CFU/mL)	Giới hạn mức 95%	
					Giới hạn trên	Giới hạn dưới
2	1,91 ± 0,25	VBt2119.1	0,223	2,4 x 10^5	5,4 x 10^6	1,1 x 10^2
	1,72 ± 0,06	VBt2736.2	0,186	6,8 x 10^5	1,8 x 10^7	1,6 x 10^2
	1,98 ± 0,32	VBt2751	0,201	1,8 x 10^6	3,0 x 10^7	2,8 x 10^3
	1,63 ± 0,03	VBt2767.6	0,192	3,2 x 10^6	5,2 x 10^7	6,1 x 10^3
4	7,46 ± 0,43	VBt2119.1	0,201	1,5 x 10^6	2,1 x 10^7	3,0 x 10^3
	8,12 ± 0,22	VBt2736.2	0,188	5,1 x 10^6	7,2 x 10^7	2,0 x 10^4
	7,79 ± 0,10	VBt2751	0,165	1,2 x 10^7	2,2 x 10^8	1,7 x 10^4
	7,92 ± 0,03	VBt2767.6	0,171	6,3 x 10^7	9,5 x 10^8	4,8 x 10^5

Số liệu được phân tích bằng phần mềm PoloPlus© do LeOra Software.

Kết quả khảo sát thời gian gây chết trung bình (LT_{50}) đối với sâu tơ của 4 chủng vi khuẩn được trình bày chi tiết trong bảng 3.10. Giá trị LT_{50} của các chủng vi khuẩn dao động từ 103,9 đến 121,2 GSXL tương ứng với 4,33 đến 5,05 NSXL. Trong đó VBt2119.1 có LT_{50} nhanh nhất 103,9 GSXL, tương ứng với 4,33 NSXL,

VBt2767.6 có LT_{50} chậm nhất 121,2 GSXL tương ứng với 5,05 NSXL. Đến giai đoạn sâu tuổi 4 thì thời gian gây chết của các chủng vi khuẩn giảm xuống, trong đó chủng VBt2119.1 có LT_{50} nhanh nhất 103,2 GSXL tương ứng với 4,3 NSXL, chủng VBt2767.6 có LT_{50} chậm nhất 120 GSXL, tương ứng với 5 NSXL. Khi tăng mật số vi khuẩn xử lý, thời gian gây chết trung bình sẽ ngắn hơn, sâu chết nhanh hơn. Giai đoạn sâu tơ tuổi 2 là giai đoạn tối ưu để xử lý vi khuẩn.

Bảng 3.10 LT_{50} của bốn chủng vi khuẩn đối với sâu tơ giai đoạn tuổi 2 và tuổi 4 trong điều kiện phòng thí nghiệm

Tuổi	Mật độ (CFU/mL)	Chủng vi khuẩn	LT_{50} (NSXL) Mean	LT_{50} (GSXL)	Giới hạn mức 95%		SE	LT_{50} (NSXL) Median
					Dưới	Trên		
2	$2,5 \times 10^5$	VBt2119.1	4,33	103,92	3,63	5,02	0,36	4,00
		VBt2736.2	4,60	110,40	3,90	5,30	0,36	5,00
		VBt2751	4,93	118,32	4,21	5,50	0,33	5,00
		VBt2767.6	5,05	121,20	4,31	5,59	0,33	5,00
CV (%)		16,11						
4	$2,5 \times 10^7$	VBt2119.1	4,30	103,20	3,62	4,98	0,79	4,00
		VBt2736.2	4,53	108,72	3,85	5,20	0,57	5,00
		VBt2751	4,88	117,12	4,24	5,52	0,70	5,00
		VBt2767.6	5,00	120,00	4,35	5,65	0,78	6,00
CV (%)		16,43						

Giá trị LT_{50} được phân tích bằng phần mềm SPSS 16 qua ước lượng Kaplan Meier. GSXL: Giờ sau xử lý, NSXL: Ngày sau xử lý ns: khác biệt không có ý nghĩa.

Nguyễn Thị Hoài Hà và Ngô Giang Liên (2003) xác định LC_{50} đối với sâu tơ tuổi 2 ở 4 NSXL là $0,07 \times 10^9 – 0,87 \times 10^9$ CFU/mL. Zhaodong và ctv (2011) đã xác định LC_{50} ở nồng độ 15.414 – 25.782 ng/mL và LT_{50} ở mức 3 – 4 NSXL. Chủng VBt2119.1 có giá trị LC_{50} và LT_{50} thấp nhất trong 4 chủng vi khuẩn thí nghiệm. Như vậy, trong điều kiện phòng thí nghiệm mật độ $10^5 – 10^7$ CFU/mL cho hiệu quả diệt sâu tơ tuổi 2 và tuổi 4 tốt nhất.

3.5.2 Giá trị LC_{50}, LT_{50} của các chủng vi khuẩn đối với sâu khoang

Giá trị LC_{50} đối với sâu khoang ở tuổi 2 và tuổi 4 của chủng VBt26310.1 là 1,7 x 10^6 CFU/mL và 4,7 x 10^7 CFU/mL; ở chủng VBt2735.1 là 4,8 x 10^6 CFU/mL và 1,2 x 10^8 CFU/mL; chủng VBt2762.1 là 8,7 x 10^6 CFU/mL và 1,6 x 10^8 CFU/mL; chủng VBt2110.1 là 2,1 x 10^7 CFU/mL và 2,3 x 10^8 CFU/mL.

Bảng 3.11 LC_{50} của bốn chủng vi khuẩn đối với sâu khoang giai đoạn tuổi 2 và tuổi 4 trong điều kiện phòng thí nghiệm

Tuổi sâu	Trọng lượng (mg ± SE)	Chủng vi khuẩn	Độ dốc	LC_{50} (CFU/mL)	Giới hạn mức 95%	
					Giới hạn trên	Giới hạn dưới
2	2,13 ± 0,12	VBt26310.1	0,246	1,7 x 10^6	1,2 x 10^7	0,9 x 10^5
	2,14 ± 0,05	VBt2735.1	0,224	4,8 x 10^6	3,9 x 10^7	2,9 x 10^5
	2,11 ± 0,10	VBt2762.1	0,217	8,7 x 10^6	7,8 x 10^7	5,6 x 10^5
	2,00 ± 0,14	VBt21110.1	0,211	2,1 x 10^7	2,1 x 10^8	1,5 x 10^6
4	31,11 ± 1,71	VBt26310.1	0,229	4,7 x 10^7	4,6 x 10^8	5,2 x 10^6
	30,25 ± 1,52	VBt2735.1	0,233	1,2 x 10^8	1,3 x 10^9	1,5 x 10^7
	31,27 ± 1,63	VBt2762.1	0,234	1,6 x 10^8	1,9 x 10^9	2,1 x 10^7
	31,58 ± 1,25	VBt21110.1	0,235	2,3 x 10^8	2,8 x 10^9	3,0 x 10^7

Số liệu được phân tích bằng phần mềm PoloPlus© do LeOra Software.

Giá trị LC_{50} của 4 chủng vi khuẩn đối với sâu khoang tuổi 2 dao động từ 120,72 giờ đến 130,32 giờ sau khi xử lý tương ứng với thời gian 5,03 ngày đến 5,43 ngày sau xử lý. Trong đó chủng VBt26310.1 gây chết nhanh nhất là 103,9 GSXL, tương ứng với 4,33 NSXL, VBt21110.1 cho kết quả LT_{50} chậm nhất với giá trị 130 GSXL tương ứng với 5,05 NSXL. Đến giai đoạn sâu tuổi 4 thì thời gian gây chết của các chủng vi khuẩn giảm xuống, trong đó chủng VBt21110.1 có LT_{50} nhanh nhất 103,32 GSXL tương ứng với 5,43 NSXL (Bảng 3.12).

Bảng 3.12 LT_{50} của bốn chủng vi khuẩn đối với sâu khoang giai đoạn tuổi 2 và tuổi 4 trong điều kiện phòng thí nghiệm

Tuổi	Mật độ (CFU/mL)	Chủng vi khuẩn	LT_{50} (NSXL) Mean	LT_{50} (GSXL)	Giới hạn mức 95%		SE	LT_{50} (NSXL) Median
					Dưới	Trên		
2	2,5 x 10^5	VBt26310.1	5,03	120,72	4,40	5,66	0,32	5,00
		VBt2735.1	5,20	124,80	4,57	5,83	0,32	6,00
		VBt2762.1	5,23	125,52	4,62	5,84	0,31	6,00
		VBt21110.1	5,43	130,32	4,82	6,03	0,31	6,00
CV (%)		4,50						
4	2,5 x 10^7	VBt26310.1	4,53	108,72	3,90	5,15	0,32	4,00
		VBt2735.1	4,73	113,52	4,11	5,34	0,31	5,00
		VBt2762.1	4,90	117,60	4,30	5,50	0,31	5,00
		VBt21110.1	5,03	120,72	4,46	5,59	0,29	5,00
CV (%)		5,61						

Giá trị LT_{50} được phân tích bằng phần mềm SPSS 16 qua ước lượng Kaplan Meier. GSXL: Giờ sau xử lý, NSXL: Ngày sau xử lý, ns: khác biệt không có ý nghĩa.

Ở giai đoạn sâu tuổi 4, nồng độ ban đầu 2,5 x 10^7 CFU/mL, thời gian chết trung bình đều giảm xuống và các chủng không có khác biệt ý nghĩa về mặt thống kê với thời gian trung bình trong khoảng 108,72 giờ đến 120,72 giờ, tương ứng với 4,53 ngày đến 5,03 ngày sau khi xử lý. Trong đó, chủng vi khuẩn VBt26310.1 cho thời gian chết 50% cá thể nhanh nhất với 108,72 giờ và chủng VBt21110.1 vẫn cho giá trị LT_{50} chậm nhất với giá trị 120,72 giờ sau xử lý.

Theo Murali và ctv (2018) trên sâu khoang tuổi 3 có giá trị LC_{50} 1,9 x 10^6 CFU/mL và LT_{50} 3 – 4 NSXL, từ các kết quả nghiên cứu thu được, có thể sử dụng vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* để phát triển thuốc trừ sâu sinh học cho việc phòng trị *Spodoptera litura.*

3.5.3 Giá trị LC_{50}, LT_{50} của các chủng vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* đối với sâu xanh da láng

Giá trị LC_{50} đối với sâu xanh da láng ở tuổi 2 và tuổi 4 của chủng VBt2751 là 3,2 x 10^6 CFU/mL và 8,5 x 10^7 CFU/mL; ở chủng VBt26310.1 là 7,5 x 10^6 CFU/mL và 1,3 x 10^8 CFU/mL; chủng VBt26317.2 là 1,9 x 10^7 CFU/mL và 2,0 x 10^8 CFU/mL; chủng VBt2813 là 4,3 x 10^7 CFU/mL và 2,3 x 10^8 CFU/mL (Bảng 3.13).

Bảng 3.13 LC_{50} của các bốn chủng vi khuẩn đối với sâu xanh da láng ở giai đoạn tuổi 2 và tuổi 4 trong điều kiện phòng thí nghiệm

Tuổi sâu	Trọng lượng (mg±SE)	Chủng vi khuẩn	Độ dốc	LC_{50} (CFU/mL)	Giới hạn mức 95%	
					Giới hạn trên	Giới hạn dưới
2	5,25 ± 0,02	VBt2751	0,229	3,2 x 10^6	1,6 x 10^5	2,6 x 10^7
	6,12 ± 0,05	VBt26310.1	0,207	7,5 x 10^6	3,7 x 10^5	7,4 x 10^7
	5,37 ± 0,03	VBt26317.2	0,205	1,9 x 10^7	1,1 x 10^6	2,0 x 10^8
	6,21 ± 0,04	VBt2813	0,229	4,3 x 10^7	4,5 x 10^6	3,9 x 10^8
4	31,41 ± 0,07	VBt2751	0,244	8,5 x 10^7	1,1 x 10^7	7,5 x 10^8
	30,75 ± 0,05	VBt26310.1	0,241	1,3 x 10^8	1,8 x 10^7	1,3 x 10^9
	32,15 ± 0,06	VBt26317.2	0,234	2,0 x 10^8	2,6 x 10^7	2,4 x 10^9
	32,00 ± 0,05	VBt2813	0,231	2,3 x 10^8	2,9 x 10^7	2,9 x 10^9

Số liệu được phân tích bằng phần mềm PoloPlus© do LeOra Software.

Kết quả khảo sát đã xác định được mật độ độc lực cao nhất ứng với giá trị LC_{50} thấp nhất ở mỗi độ tuổi của sâu. Từ bảng 3.13 cho thấy ở tuổi 2 chủng vi khuẩn VBt2751 cho độc lực cao nhất (LC_{50} = 3,2 x 10^6 CFU/mL) và chủng VBt2813 có độc lực thấp nhất (4,3 x 10^7 CFU/mL). Khi thực hiện thí nghiệm ở tuổi 4 thì cần nồng độ cao hơn để sâu chết và kết quả cho thấy chủng VBt2751 vẫn có độc lực cao nhất (LC_{50}= 8,5 x 10^7 CFU/mL), ngược lại chủng VBt2813 cho độc lực thấp nhất (LC_{50} = 2,3 x 10^8 CFU/mL).

Từ kết quả bảng 3.14 cho thấy ở giai đoạn tuổi 2 các giá trị LT_{50} trung bình không có sự khác biệt giữa các chủng vi khuẩn, dao động từ 4 đến 5 ngày sau khi

phun. Ở giai đoạn tuổi 4, cùng nồng độ ban đầu thì thời gian chết trung bình đều tăng lên và đạt tương đương nhau với thời gian trung bình 4 ngày sau khi phun. Dựa kết quả phân tích, ta thấy rằng, khi tuổi sâu càng tăng thì thời gian để gây chết sâu càng giảm.

Bảng 3.14 LT_{50} của bốn chủng vi khuẩn đối với sâu xanh da láng giai đoạn tuổi 2 và tuổi 4 trong điều kiện phòng thí nghiệm

Tuổi	Mật độ (CFU/mL)	Chủng vi khuẩn	LT_{50} (NSXL) Mean	LT_{50} (GSXL)	Giới hạn mức 95%		SE	LT_{50} (NSXL) Median
					Dưới	Trên		
2	2,5 x 10^5	VBt2751	4,93	118,20	4,29	5,56	0,33	5,00
		VBt26310.1	5,18	124,80	4,57	5,80	0,31	5,00
		VBt26317.2	5,43	130,20	4,85	6,00	0,29	6,00
		VBt2813	5,50	132,00	4,92	6,08	0,30	6,00
CV (%)		6,24						
4	2,5 x 10^7	VBt2751	4,43	106,30	3,77	5,08	0,33	4,00
		VBt26310.1	4,45	106,80	3,81	5,09	0,33	4,00
		VBt26317.2	4,65	111,60	4,00	5,30	0,33	5,00
		VBt2813	4,73	113,40	4,06	5,39	0,34	5,00
CV (%)		6,04						

Giá trị LT_{50} được phân tích bằng phần mềm SPSS 16 qua ước lượng Kaplan Meier. GSXL: Giờ sau xử lý, NSXL: Ngày sau xử lý ns: khác biệt không có ý nghĩa.

Kết quả thử hoạt tính LC_{50} trên sâu tơ, sâu khoang, sâu xanh da láng trong điều kiện phòng thí nghiệm của các chủng vi khuẩn cho thấy hiệu lực diệt sâu ở mật độ bào tử 10^7 CFU/mL đạt hiệu lực diệt sâu tốt nhất, còn ở mật độ thấp hơn là 10^5 CFU/mL và 10^3 CFU/mL cho hiệu lực thấp nhất. Qua thí nghiệm cho thấy, giá trị LC_{50} của các chủng *B. thuringiensis* var. *kurstaki* trong khoảng 2,5 x 10^5 – 4,5 x 10^7 CFU/mL và LT_{50} từ 4 – 5 ngày sau xử lý ở giai đoạn sâu tuổi 2. Còn ở giai đoạn sâu tuổi 4 LC_{50} của 4 chủng *B. thuringiensis* var. *kurstaki* trong khoảng 1,5 x 10^6 – 2,5 x 10^8 CFU/mL và LT_{50} từ 4 – 5 ngày sau xử lý.

Theo sau đó, từ các mẫu sâu chết được thu thập, vi khuẩn từ hệ tiêu hóa được tái phân lập và thử lại bằng các phản ứng sinh hóa. Kết quả này, đã xác định vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* tồn tại trong ruột sâu chết. Cho nên, có thể khẳng định sâu chết là do vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki*. Trong suốt quá trình theo dõi số sâu còn sống ở các nghiệm thức xử lý, vi khuẩn có triệu chứng biếng ăn, giảm khả năng gây hại và chết từ 7 đến 14 ngày sau xử lý. Vậy, mật độ bào tử tốt nhất gây bệnh cho sâu hại là 10^7 CFU/mL, điều này mang lại thuận lợi cho việc sản xuất và sử dụng. Bên cạnh đó, hiệu lực diệt sâu thay đổi còn phụ thuộc vào độ tuổi sâu, đạt hiệu quả cao nhất khi sâu ở tuổi 2.

Vi khuẩn nói chung và vi khuẩn *B. thuringiensis* nói riêng rất dễ bị ảnh hưởng bởi bức xạ mặt trời và với tia cực tím ở bước sóng 254 nm (UV-C), nên khả năng sinh bào tử và tinh thể độc của chủng vi khuẩn trong chế phẩm Bt giảm nhanh ở điều kiện đồng ruộng. Tuy nhiên, vi khuẩn *B. thuringiensis* còn được phát hiện có khả năng chống chịu tia UV do sự biến đổi DNA, nồng độ SASP (small acid-soluble proteins) và DPA (dipiccolinic acid), plasmid, bề mặt độc tố gen *cry* (Saxena, 2002). Mặt khác, các chủng vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* đã được tiến hành khảo sát đánh giá khả năng chống chịu tia UV ở hai bước sóng 254 nm (UV-C) và 365 nm (UV-A) thì khả năng phát triển và độc tính của vi khuẩn giảm đáng kể, gây ảnh hưởng đến khả năng diệt sâu (Setlow, 1994; Sansinenea và ctv, 2015).

Từ 12 chủng vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* qua khảo sát ở nghiên cứu trên, sẽ được tiến hành khảo sát để phân tích, đánh giá khả năng chống chịu tia UV ở hai bước sóng 254 nm và 365 nm.

3.6 Chọn chủng *B. thuringiensis* var. *kusrtaki* chống chịu tia UV

3.6.1 Khả năng chống chịu UV của các chủng vi *B. thuringiensis* var. *kurstaki* ở bước sóng 254 nm và 365 nm

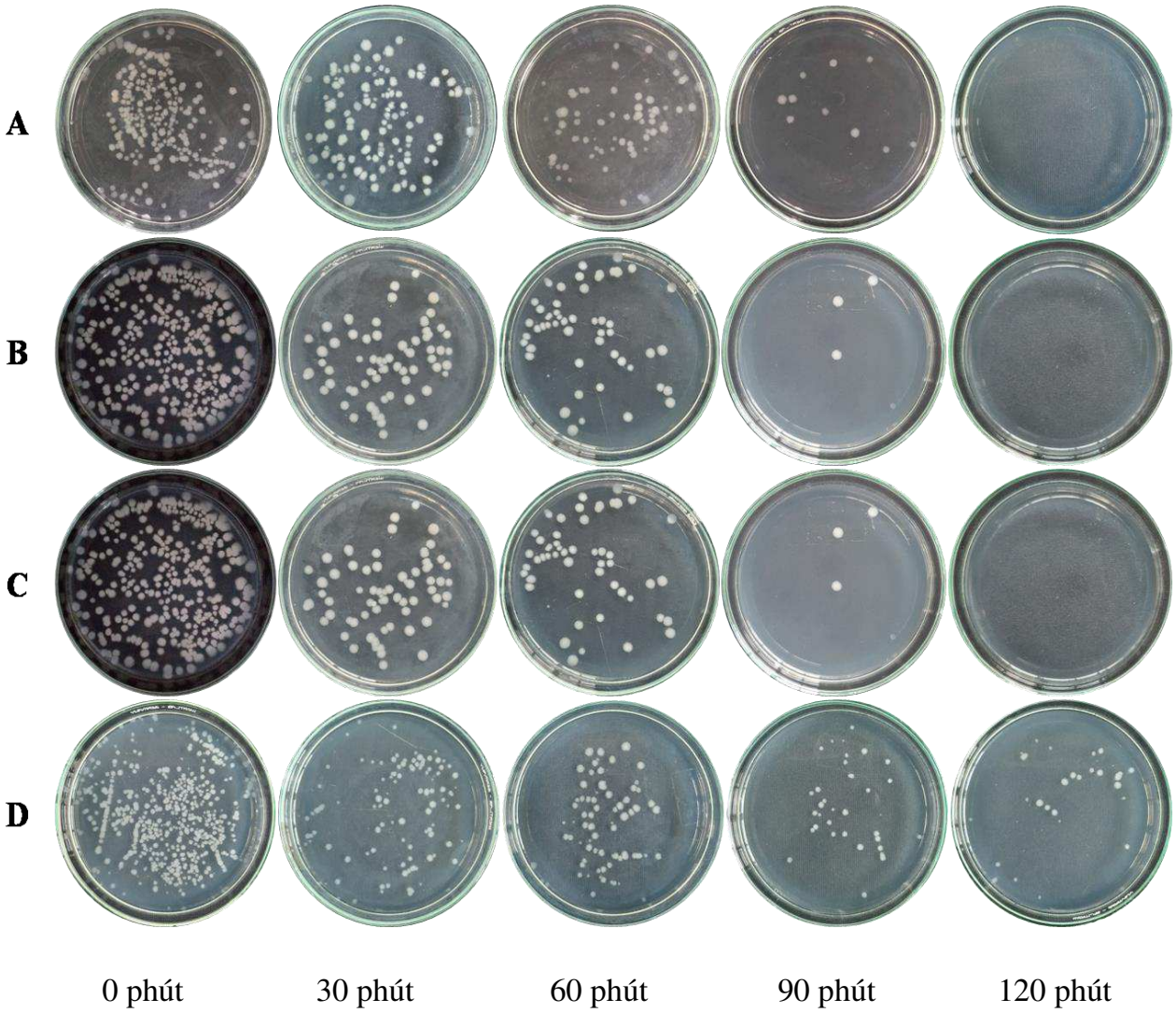
Ở bước sóng 254 nm, sau 30 phút, mật độ bào tử các chủng vi khuẩn giảm, trong đó chủng VBt2119.1 (3,00 x 10^2 CFU/mL) và VBt2735.1 (2,75 x 10^5 CFU/mL) giảm mạnh so với các chủng vi khuẩn khác. Khi tăng thời gian chiếu 60 phút, 90 phút và 120 phút, mật độ tất cả các chủng vi khuẩn càng giảm rõ rệt.

Với mức thời gian 60 phút, mật độ bào tử cao nhất ở chủng VBt2762.1 (2,7 x 10^6 CFU/mL) và thấp nhất ở chủng VBt2119.1 (0,0 CFU/mL). Ở 90 phút, có 4 chủng vi khuẩn không có khả năng chống chịu tia UV. Ở 120 phút, chỉ còn 3 chủng VBt21110.1 (5,4 x 10^3 CFU/mL), VBt26310.1 (2,8 x 10^2 CFU/mL) và VBt2751 (4,0 x 10^3 CFU/mL) tồn tại. Khi tăng thời gian chiếu tia UV lên 150 phút, thì tất cả các chủng vi khuẩn đều chết (Bảng 3.15).

Bảng 3.15 Mật độ bào tử (CFU/mL) của 12 chủng vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* sau khi chiếu UV ở bước sóng 254 nm

Chủng vi khuẩn	**Mật độ bào tử (CFU/mL)**				
	0 phút	**30 phút**	**60 phút**	**90 phút**	**120 phút**
VBt2119.1	2,0 x 10^8	3,0 x 10^2 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a
VBt21110.1	2,0 x 10^8	7,0 x 10^6 c	1,4 x 10^6 c	1,3 x 10^5 c	5,4 x 10^3 c
VBt26310.1	2,0 x 10^8	6,9 x 10^6c	1,7 x 10^4 b	7,5x 10^3 bc	2,8 x 10^2 b
VBt26311.1	2,0 x 10^8	2,4 x 10^6 c	4,6 x 10^3 b	1,1 x 10^3 b	0,0 a
VBt26317.3	2,0 x 10^8	4,0 x 10^6c	3,5 x 10^6 c	2,1 x 10^4 c	0,0 a
VBt2813	2,0 x10^8	5,4 x 10^6 c	2,7 x 10^4 b	1,2 x 10^3 b	0,0 a
VBt2735.1	2,0 x10^8	2,3 x 10^5 b	6,8 x 10^2 a	0,0a	0,0 a
VBt2736.2	2,0 x 10^8	3,0 x 10^6 c	6,3 x 10^4 b	0,0 a	0,0 a
VBt2751	2,0 x 10^8	4,7 x 10^6 c	1,1 x 10^6 c	1,3 x 10^5 c	4,0 x 10^3 c
VBt27510	2,0 x 10^8	4,5 x 10^6 c	2,1 x 10^6 c	3,4 x 10^4 c	0,0 a
VBt2762.1	2,0 x10^8	6,0 x 10^6 c	2,6 x 10^4 b	0,0 a	0,0 a
VBt2767.6	2,0 x 10^8	3,0 x 10^6 c	2,7 x 10^6 c	3,7 x 10^3 bc	0,0 a
Mức ý nghĩa	ns	**	**	**	**
CV (%)	-	15,6	11,0	12,6	4,7

*Trong cùng 1 cột, các giá trị có chữ cái theo sau giống nhau thì sự khác biệt không có ý nghĩa; ns: không khác biệt; **: khác biệt ở mức rất có ý nghĩa.*



Hình 3.14 Khuẩn lạc của các chủng vi khuẩn hình thành qua các mức thời gian chiếu tia UV ở bước sóng 254 nm. *(A) VBt27510; (B) VBt2762.1; (C) VBt2119.1; (D) VBt26310.1*

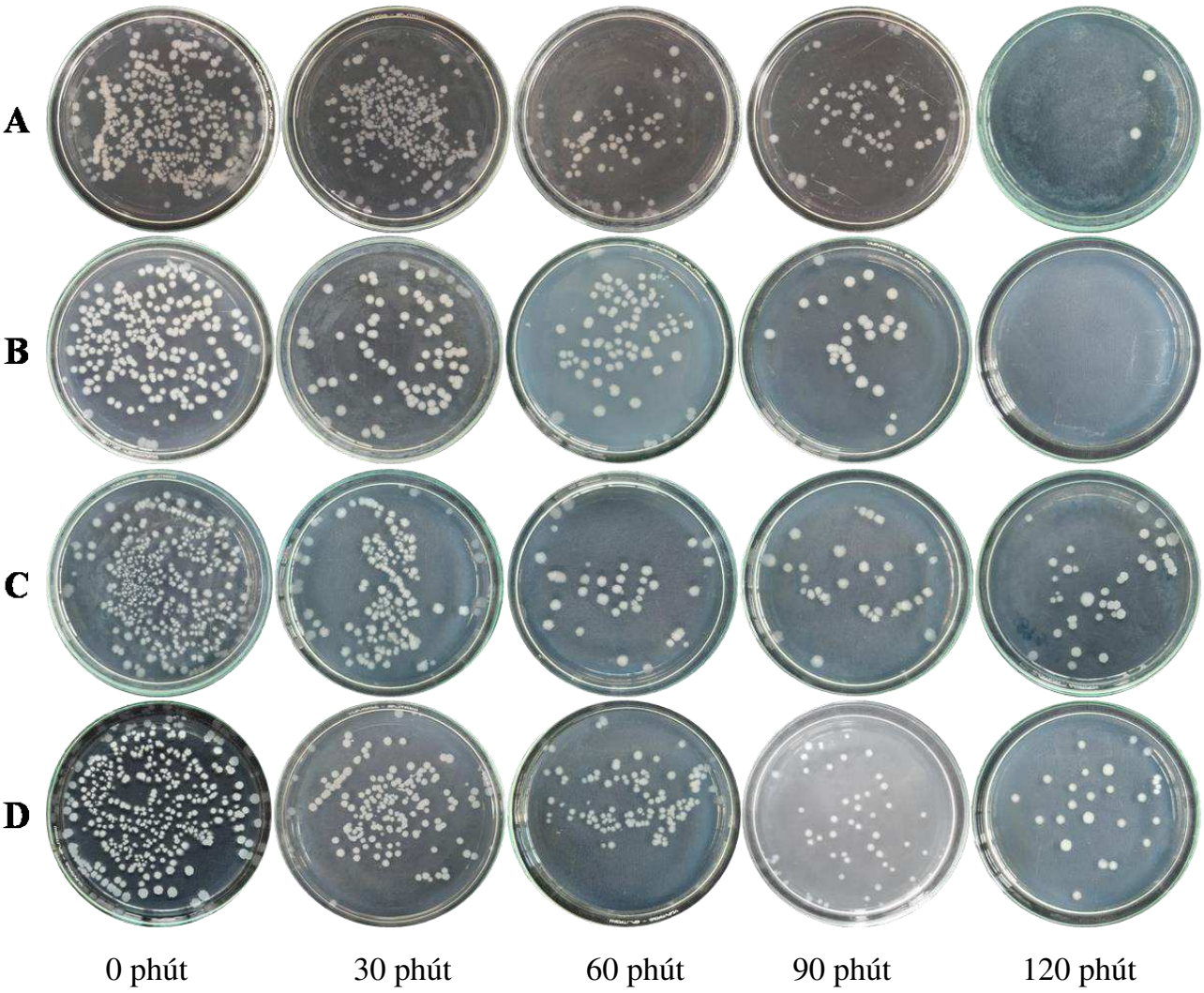
Với bước sóng 365 nm, khi chiếu tia UV trong 120 phút, hai chủng VBt2736.2 và VBt2767.6 (0,0 CFU/mL) không có khả năng chống chịu. Các chủng vi khuẩn còn lại có khả năng chống chịu được tia UV, trong đó, chủng VBt21110.1 (6,23 x 10^4 CFU/mL), VBt26310.1 (3,1 x 10^5 CFU/mL), VBt2762.1 (3,8 x 10^5 CFU/mL) và chủng vi khuẩn VBt2751 (6,2 x 10^4 CFU/mL) có mật độ cao hơn so với các chủng còn lại (Bảng 3.16).

Bảng 3.16 Mật độ bào tử (CFU/mL) của 12 chủng vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* sau khi chiếu UV ở bước sóng 365 nm

Chủng vi khuẩn	Mật độ bào tử (CFU/mL)				
	0 phút	30 phút	60 phút	90 phút	120 phút
VBt2119.1	$2,0 \times 10^8$	$4,6 \times 10^5$ a	$3,7 \times 10^5$ b	$3,3 \times 10^4$ ab	$2,8 \times 10^2$ a
VBt21110.1	$2,0 \times 10^8$	$2,0 \times 10^7$ b	$5,6 \times 10^6$ cd	$2,0 \times 10^5$ bc	$6,2 \times 10^4$ c
VBt26310.1	$2,0 \times 10^8$	$1,0 \times 10^8$ c	$1,5 \times 10^7$ d	$3,2 \times 10^6$ c	$3,1 \times 10^5$ c
VBt26311.1	$2,0 \times 10^8$	$4,9 \times 10^5$ a	$1,3 \times 10^5$ a	$2,2 \times 10^4$ ab	$2,8 \times 10^2$ a
VBt26317.3	$2,0 \times 10^8$	$1,0 \times 10^7$ b	$1,2 \times 10^6$ bc	$2,2 \times 10^5$ bc	$4,1 \times 10^3$ b
VBt2813	$2,0 \times 10^8$	$3,6 \times 10^7$ bc	$5,1 \times 10^6$ cd	$1,6 \times 10^6$ b	$2,7 \times 10^4$ bc
VBt2735.1	$2,0 \times 10^8$	$3,3 \times 10^7$ bc	$1,9 \times 10^7$ d	$1,7 \times 10^6$ c	$3,4 \times 10^4$ bc
VBt2736.2	$2,0 \times 10^8$	$1,9 \times 10^7$ a	$4,4 \times 10^5$ a	$3,9 \times 10^3$a	0,0 a
VBt2751	$2,0 \times 10^8$	$1,6 \times 10^7$ b	$5,6 \times 10^6$ cd	$2,0 \times 10^5$ bc	$6,2 \times 10^4$ bc
VBt27510	$2,0 \times 10^8$	$8,4 \times 10^6$ b	$1,3 \times 10^6$ bc	$2,2 \times 10^5$ bc	$8,7 \times 10^3$ b
VBt2762.1	$2,0 \times 10^8$	$3,9 \times 10^7$ bc	$2,9 \times 10^7$ b	$4,0 \times 10^6$ c	$3,8 \times 10^5$ c
VBt2767.6	$2,0 \times 10^8$	$2,5 \times 10^7$ bc	$5,6 \times 10^6$ cd	$5,9 \times 10^3$ ab	0,0 a
Mức ý nghĩa	ns	**	**	**	**
CV %	-	12,3	15,0	16,9	5,2

*Trong cùng 1 cột, các giá trị có chữ cái theo sau giống nhau thì sự khác biệt không có ý nghĩa; ns: không khác biệt; **: khác biệt ở mức rất có ý nghĩa.*

Kết quả thực nghiệm ghi nhận, ba chủng VBt21110.1, VBt26310.1, VBt2751 có khả năng chống chịu tia UV cao và được chọn để đánh giá hiệu quả gây chết sâu tơ, sâu khoang và sâu xanh da láng.



Hình 3.15 Khuẩn lạc của các chủng vi khuẩn hình thành qua các mức thời gian chiếu tia UV ở bước sóng 365 nm. *(A) VBt2736.2; (B) VBt2767.6; (C) VBt2119.1; (D) VBt26310.1*

3.6.2 Hiệu quả gây chết sâu của các chủng vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kusrtaki* có khả năng chống chịu tia UV trong điều kiện phòng thí nghiệm

Qua kết quả ở bảng 3.17, khả năng gây chết sâu non, sâu tơ của các chủng vi khuẩn *B. thuringiensis var. kurstaki* đã được chiếu tia UV thấp hơn so với cùng chủng vi khuẩn không bị chiếu tia UV. Cụ thể, ở thời điểm 1 NSXL hiệu quả gây chết sâu tơ của chủng VBt21110.1ΔUV chỉ đạt 15,0% so với chủng VBt21110.1 đạt 30% và các chủng còn lại cũng cho kết quả tương tự. Đến 7 NSXL, hiệu quả gây chết sâu tơ đạt cao nhất 65,0% (VBt21110.1ΔUV) và thấp nhất là chủng

VBt26310.1ΔUV (đạt 45,0%), trong khi đó, các chủng vi khuẩn không chiếu tia UV lần lượt là 80,5% (VBt21110.1) và 70% (VBt26310.1).

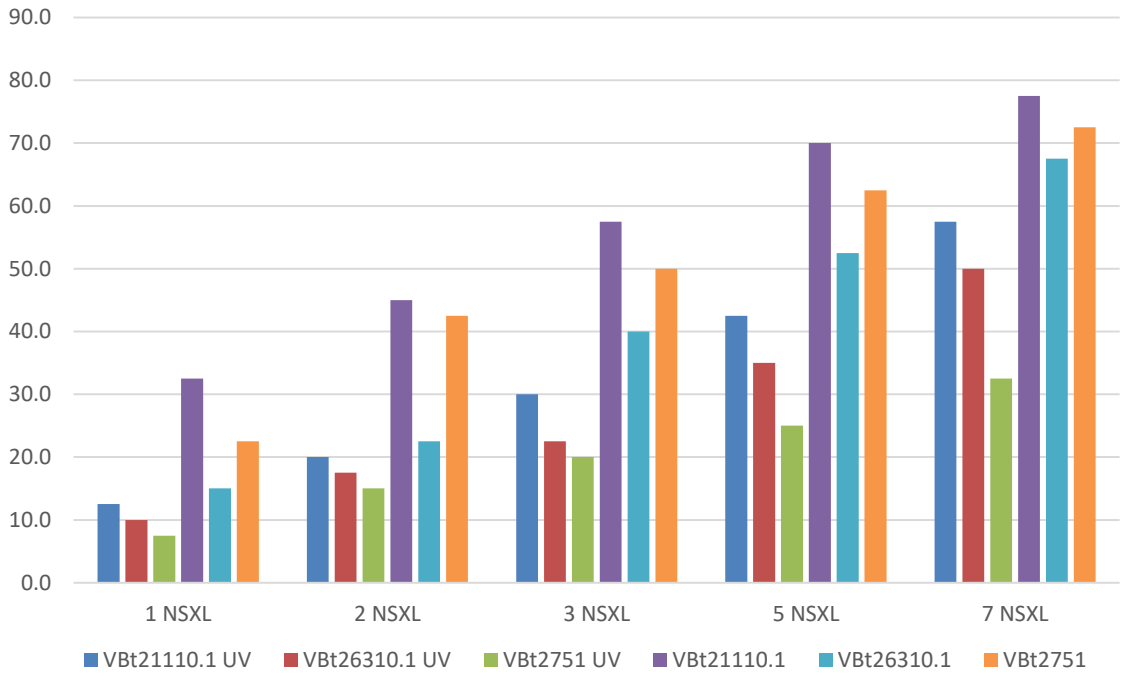
Bảng 3.17. Diễn biến mật độ sâu tơ sống sót sau xử lý vi khuẩn

Chủng vi khuẩn	Mật độ sâu tơ (con/công thức)					
	TKXL	1 NSXL	2 NSXL	3 NSXL	5 NSXL	7 NSXL
VBt21110.1ΔUV	10,0	8,8 bcd	7,3 b	6,8 ab	6,3 b	4,8 b
VBt26310.1ΔUV	10,0	9,5 cd	8,3 c	7,5 c	6,5 b	5,3 c
VBt2751ΔUV	10,0	10,0 d	8,5 c	7,8 d	7,0 d	6,3 c
VBt21110.1	10,0	6,5 a	5,3 a	4,5 a	3,5 a	2,3 a
VBt26310.1	10,0	8,0 ab	7,3 b	6,5 b	5,0 b	3,3 b
VBt2751	10,0	7,3 abc	6,3 b	5,3 b	4,0 b	3,0 a
ĐC	10,0	10,0 d	10,0 d	10,0 e	10,0 e	10,0 d
Mức ý nghĩa	ns	**	**	**	**	**
CV (%)		5,4	4,7	8,0	7,8	8,2

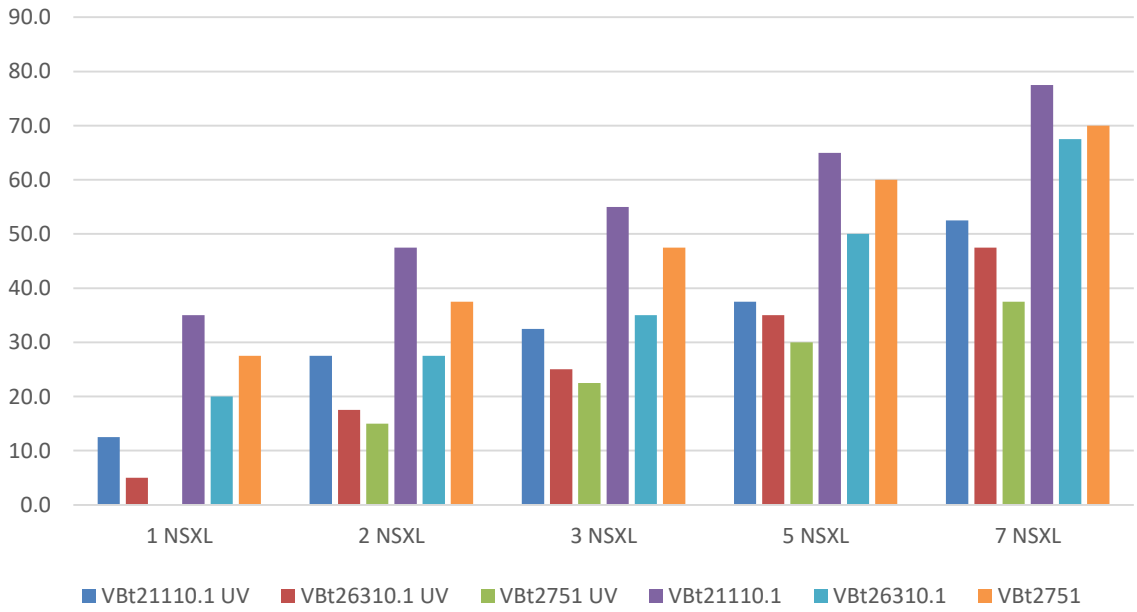
*Trong cùng 1 cột, các giá trị có chữ cái đi kèm giống nhau thì sự khác biệt không có ý nghĩa; ns: không có sự khác biệt; **: khác biệt ở mức rất có ý nghĩa; TKXL: trước khi xử lý, NSXL: Ngày sau xử lý; Mật độ vi khuẩn 10^8 CFU/mL, Đối chứng phun nước cất liều lượng 100 mL; VBt21110.1ΔUV, VBt26310.1ΔUV, VBt2751ΔUV là những chủng chống chịu tia UV; VBt21110.1, VBt26310.1, VBt2751 là những chủng không chiếu tia UV.*

Bảng 3.18 Hiệu quả gây chết (%) sâu tơ của các chủng vi khuẩn

Chủng vi khuẩn	Hiệu quả gây chết (%) sâu tơ				
	1 NSXL	2 NSXL	3 NSXL	5 NSXL	7 NSXL
VBt21110.1ΔUV	15,0	40,0	52,5	60,0	65,0
VBt26310.1ΔUV	7,5	15,0	17,5	35,0	45,0
VBt2751ΔUV	10,0	17,5	30,0	45,0	50,0
VBt21110.1	30,0	50,0	62,5	72,5	80,0
VBt26310.1	20,0	35,0	45,0	55,0	70,0
VBt2751	22,5	32,5	47,5	62,5	77,5



Hình 3.16 Hiệu quả gây chết (%) sâu khoang của các chủng vi khuẩn *B. thuringiensis var. kurstaki* đã được chiếu tia UV



Hình 3.17 Hiệu quả gây chết (%) sâu xanh da láng của các chủng vi khuẩn *B. thuringiensis var. kurstaki* đã được chiếu tia UV

Kết quả thử nghiệm ở hình 3.16 và 3.17, cho thấy hiệu quả gây chết sâu khoang và sâu xanh da láng của các chủng vi khuẩn đã được chiếu tia UV ở 7

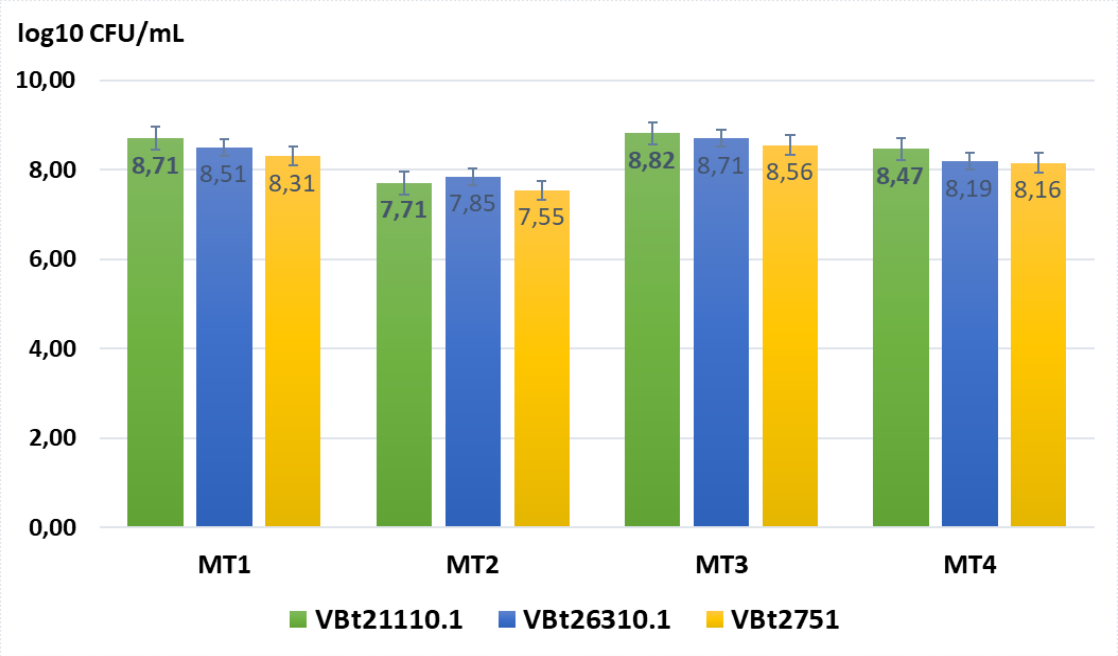
NSXL khá thấp, chủng vi khuẩn VBt21110.1ΔUV đạt 57,5% đối với sâu khoang, 52,5% đối với sâu xanh da láng, và 65,0% đối với sâu tơ; trong khi chủng VBt2751ΔUV chỉ đạt lần lượt là 32,5% và 37,5% đối với sâu khoang và sâu xanh da láng.

Như vậy, khả năng phát triển và độc tính của vi khuẩn giảm đáng kể, ảnh hưởng đến khả năng diệt sâu sau khi chiếu xạ tia UV ở bước sóng từ 250 đến 380 nm (Setlow, 1994; Mark và ctv, 2000). Trong nghiên cứu này, tia UV ảnh hưởng rõ rệt đến sức sống của vi khuẩn, khả năng hình thành bào tử và tinh thể các chủng vi khuẩn, khiến chúng đều bị ảnh hưởng nghiêm trọng. Khi chiếu tia UV ở bước sóng 254 nm, số khuẩn lạc hình thành và mật độ bào tử vi khuẩn ít hơn so với chiếu tia UV ở bước sóng 365 nm.

3.7 Tối ưu điều kiện lên men của vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki*

3.7.1 Ảnh hưởng của môi trường dinh dưỡng đến sinh khối vi khuẩn

Ba chủng vi khuẩn VBt21110.1 (mẫu phân lập từ tỉnh Vĩnh Phúc), VBt26310.1 (Lâm Đồng), VBt2751 (Bến Tre) mang gen *cry1, cry2, cry9* và là những gen độc gây chết cho bộ cánh vảy được thử nghiệm nhân sinh khối với bốn loại môi trường ở điều kiện nhiệt độ 30^0C, pH 7 và 1% dịch tăng sinh (10^5 CFU/mL).

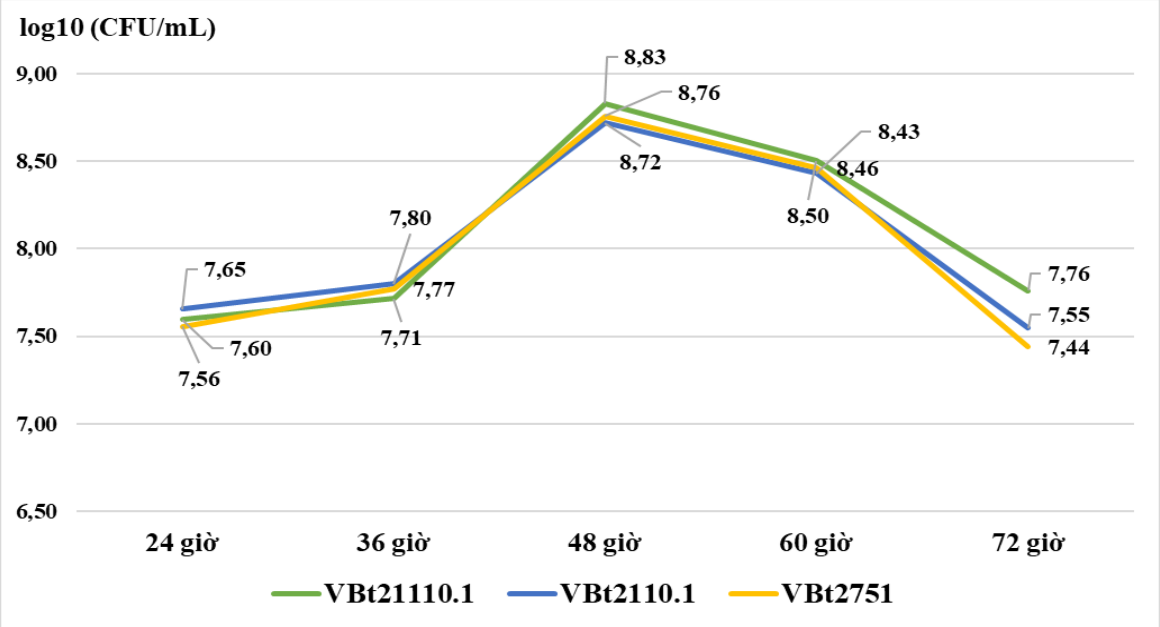


Hình 3.18 Mật độ vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* ở các môi trường dinh dưỡng

Sau 48 giờ, mật độ trung bình của ba chủng vi khuẩn trong môi trường (MT) 3 (dịch chiết nấm men và các khoáng) đạt cao nhất (8,56÷8,82 log10 CFU/mL, ở môi trường 2 đạt thấp nhất (7,55÷7,71 log10 CFU/mL) (Hình 3.18).

3.7.1.1 Ảnh hưởng của thời gian lên men đến sinh khối vi khuẩn

Mật độ của 3 chủng vi khuẩn đạt cao nhất sau 48 giờ nuôi cấy và khác biệt có ý nghĩa đối với các mốc thời gian còn lại (p<0,05), trong đó, chủng VBt21110.1 đạt 8,83 log CFU/mL, VBt26310.1 đạt 8,76 log CFU/mL và VBt2751 đạt 8,72 log CFU/mL (Hình 3.19).



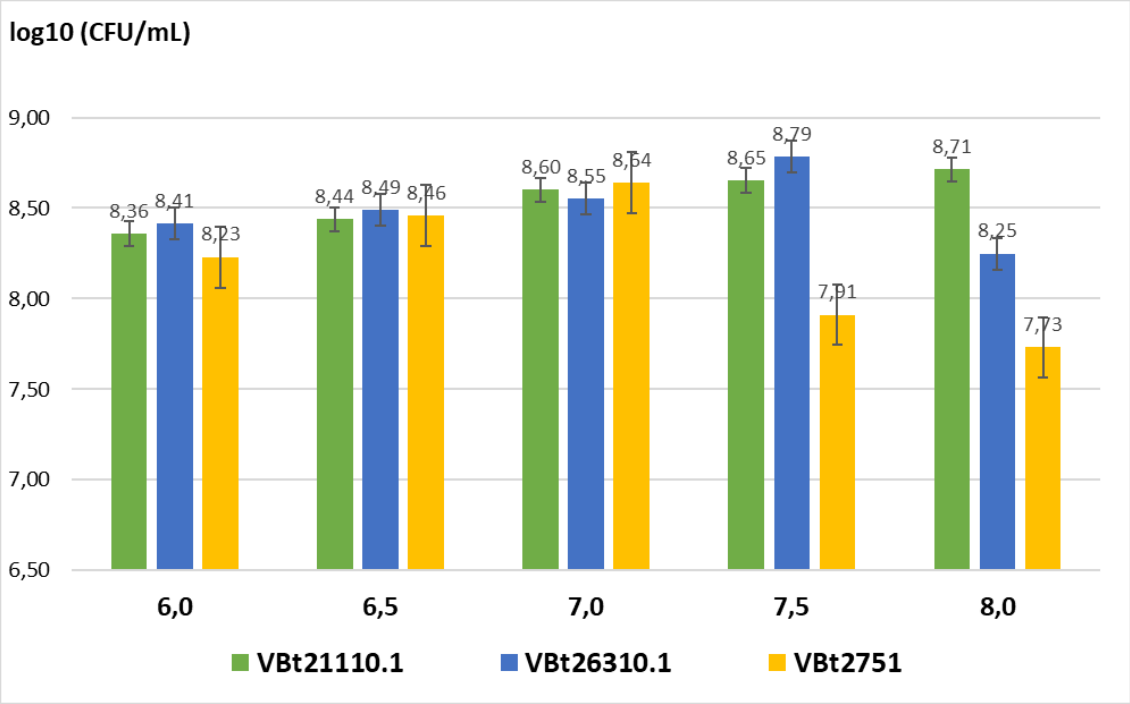
Hình 3.19 Mật độ vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* ở các thời gian lên men

Theo Nguyễn Thị Hoài Hà và Ngô Giang Liên (2003), thời gian sinh trưởng của vi khuẩn *B. thuringiensis* rất ngắn, thời gian càng dài thì sinh khối vi khuẩn nhân lên càng giảm. Kết quả thí nghiệm cho thấy, các chủng vi khuẩn đều sinh trưởng, phát triển tốt và đạt mật độ tối ưu ở thời gian 48 giờ, sau 48 giờ sinh khối bắt đầu giảm nhanh. Thời gian tối ưu nhân sinh khối các chủng *B. thuringiensis* là 48 giờ, và được sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

3.7.1.2 Ảnh hưởng của pH môi trường đến sinh khối vi khuẩn

Mật độ vi khuẩn chủng VBt21110.1 đạt giá trị cao nhất là 8,71 log CFU/mL ở pH 8, nhưng không khác biệt ở pH 7 và 7,5. Mật độ vi khuẩn chủng VBt26310.1 ở

pH 7,5 đạt cao nhất là 8,79 log10 CFU/mL, tuy nhiên cũng không khác biệt so với pH 7. Chủng vi khuẩn VBt2751 đạt mật độ cao nhất là đạt 8,64 log10 CFU/mL khi nuôi cấy trong môi trường có pH 7 (Hình 3.20).

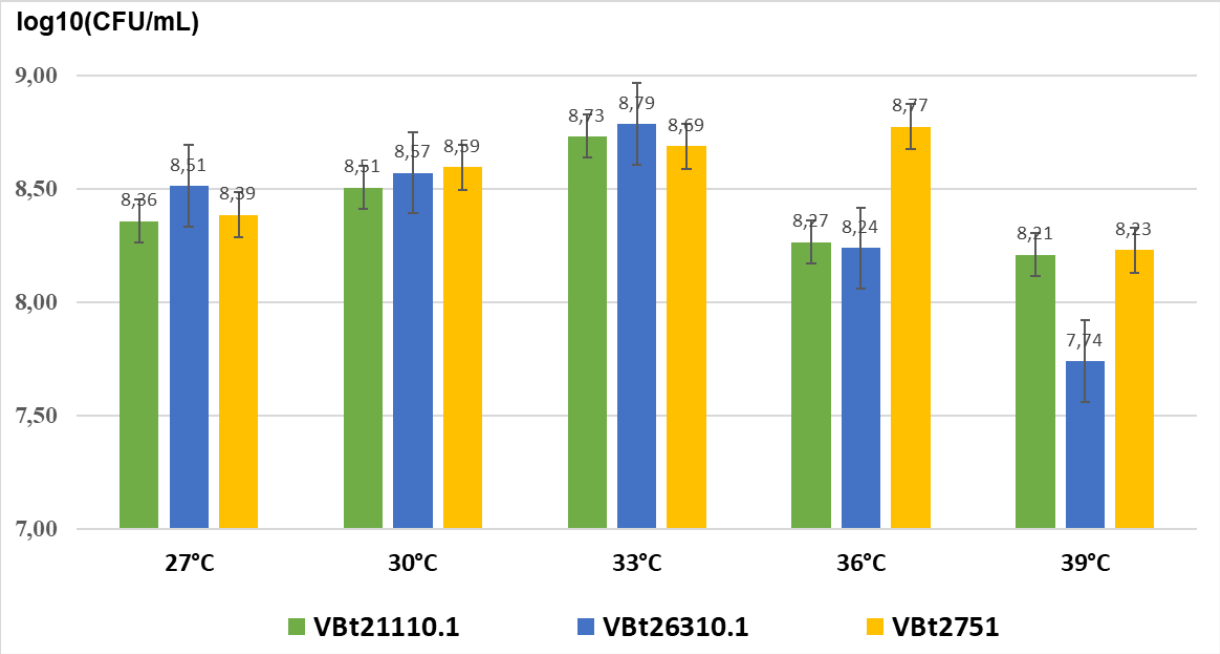


Hình 3.20 Mật độ vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* ở các mức pH

3.7.1.3 Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sinh khối của vi khuẩn

Mật độ vi khuẩn chủng VBt21110.1 đạt cao nhất ở 33ºC là 8,73 log CFU/mL. Chủng vi khuẩn VBt2751 ở 36ºC có mật độ đạt cao nhất 8,77 log CFU/mL, khác biệt với mức nhiệt độ 27 và 33ºC. Chủng VBt26310.1 đạt cao nhất 8,79 log CFU/mL ở nhiệt độ 33ºC (Hình 3.21). Do đó, nhiệt độ từ 30 – 36ºC là nhiệt độ thích hợp nhân sinh khối các chủng vi khuẩn.

Vi khuẩn *B. thuringiensis* sinh trưởng ở nhiệt độ từ 15ºC đến 45ºC, nhiệt độ tối ưu 30 – 35^{0}C, nhiệt độ thấp sinh trưởng chậm, nhiệt độ cao từ 35ºC đến 40ºC sinh trưởng nhanh nhưng chóng lão hóa. Từ đó có thể thấy, nhiệt độ khác nhau thì khả năng nhân sinh khối của các chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. khác nhau (Ngô Đình Bính và ctv, 2010; Stanford và ctv, 2015).



Hình 3.21 Mật độ vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* ở các mức nhiệt độ

3.7.2 Tối ưu hóa các yếu tố ảnh hưởng đến sinh khối vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* bằng phương pháp quy hoạch thực nghiệm

Từ kết quả thí nghiệm đạt được trên 3 chủng vi khuẩn, các thí nghiệm nhân sinh khối được thực hiện trên chủng VBt21110.1 với 3 yếu tố: thời gian (X_1), pH (X_2), nhiệt độ (X_3) ở ba mức gồm 17 nghiệm thức, làm tiền đề cho các chủng vi khuẩn tiềm năng còn lại. Mật độ vi khuẩn thu được trình bày ở Bảng 3.19.

Kết quả phân tích phương sai (ANOVA) được trình bày trong bảng 3.21, với p-value của mô hình nhỏ hơn 0,0001 và p-value của kiểm định sự không phù hợp là 0,0959 (không có ý nghĩa thống kê) ở mức ý nghĩa 5%, cho thấy mô hình có độ phù hợp tốt. Hệ số hồi quy (R^2) tính được là 0,99 cho thấy số liệu thực nghiệm tương quan chặt chẽ với số liệu dự đoán theo mô hình. Giá trị R^2 dự đoán (0,86) phù hợp với R^2 điều chỉnh (0,98) với độ lệch 0,1061 (nhỏ hơn 0,2). Trong thí nghiệm này, giá trị CV (%) là 1,3 cho thấy thí nghiệm có độ tin cậy cao (Bảng 3.20 và 3.21).

Bảng 3.19 Mật độ vi khuẩn thu được trong thực nghiệm

STT	Biến mã hóa	Thời gian (X_1)	pH (X_2)	Nhiệt độ (X_3)	Mật độ vi khuẩn log10.CFU/mL
1	+1	24	7	30	7,55
2	+1	72	7	30	7,49
3	+1	24	8	30	7,14
4	+1	72	8	30	7,37
5	+1	24	7,5	27	7,67
6	-1	72	7,5	27	7,67
7	-1	24	7,5	33	7,65
8	-1	72	7,5	33	7,43
9	-1	48	7	27	8,79
10	-1	48	8	27	8,79
11	0	48	7	33	8,55
12	0	48	8	33	8,55
13	0	48	7,5	30	8,93
14	0	48	7,5	30	8,88
15	0	48	7,5	30	8,82
16	0	48	7,5	30	8,75
17	0	48	7,5	30	8,87

Bảng 3.20 Kết quả phân tích sự phù hợp của mô hình với thực nghiệm

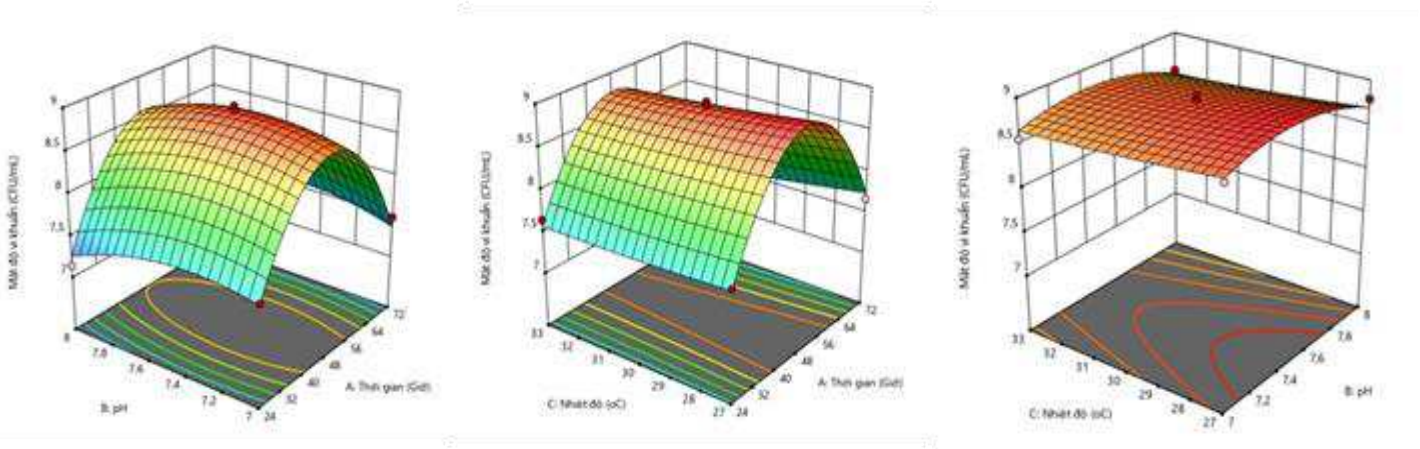
Thông số	Giá trị	Thông số	Giá trị
Độ lệch chuẩn	0,1061	R^2	0,9891
Giá trị trung bình	8,17	R^2 điều chỉnh	0,9752
Hệ số biến thiên (CV%)	1,30	R^2 dự đoán	0,8633

Bảng 3.21 Kết quả phân tích ANOVA

Yếu tố	Tổng bình phương	Bậc tự do	Trung bình bình phương	Giá trị F	Giá trị p Prob>F	
Mô hình	7,18	9	0,7972	70,84	<0,0001	Tin cậy
X_1- Thời gian	0,0003	1	0,0003	0,0278	0,8724	
X_2 – pH	0,0351	1	0,0351	3,12	0,1207	
X_3 – Nhiệt độ	0,0684	1	0,0684	6,08	0,0431	
X_1X_2	0,0210	1	0,0210	1,87	0,2139	
X_1X_3	0,0121	1	0,0121	1,08	0,3343	
X_2X_3	8,882E-16	1	8,882E-16	7,892E-14	1,0000	
X_1^2	6,72	1	6,72	597,54	<0,0001	
X_2^2	0,1663	1	0,1663	14,78	0,0063	
X_3^2	0,0015	1	0,0015	0,1315	0,7275	
Phần dư	0,0788	7	0,0113			
Sự không tương thích	0,0602	3	0,0201	4,31	0,0959	Không tin cậy
Sai số thuần	0,0186	4	0,0047			
Tổng tương quan	7,25	16				

Từ các giá trị thực nghiệm, phương trình hồi quy nhận được như sau: $Y = 8,85 - 0,0062X_1 – 0,0662X_2 - 0,0925X_3 + 0,0725X_1X_2 – 0,0550X_1X_3 + X_2X_3 - 1,26X_1^2 - 0,1988X_2^2 + 0,0188X_3^2$.

Từ phương trình hồi quy, có thể nhận thấy ba yếu tố: thời gian, pH, nhiệt độ môi trường, đã ảnh hưởng đến sinh khối của vi khuẩn. Để xác định mức độ tối ưu của mỗi biến cho sự tăng sinh vi khuẩn, đồ thị bề mặt ba chiều tương tác được xây dựng với trục Z là mật độ vi khuẩn (CFU/mL) và hai biến độc lập bất kỳ, trong khi duy trì biến còn lại ở mức tối ưu của chúng (Hình 3.22).



a. pH – Thời gian b. Nhiệt độ - Thời gian c. Nhiệt độ - pH

Hình 3.22 Bề mặt đáp ứng của từng cặp yếu tố ảnh hưởng đến lên men thu sinh khối ở vi khuẩn VBt21110.1

Ngoài ra, các giải pháp tối ưu với hàm ba biến gồm: thời gian, pH, nhiệt độ từ sử dụng thuật toán hàm mong đợi bằng phương pháp đáp ứng bề mặt, kết hợp với phương trình hàm mong đợi, đã tìm ra mật độ vi khuẩn tính được tương ứng với 3 biến xác định được trình bày ở bảng 3.22.

Bảng 3.22 Các giải pháp tối ưu với hàm ba biến xác định và giá trị tối ưu mong đợi.

STT	Thời gian (giờ)	pH	Nhiệt độ (^{0}C)	Mật độ vi khuẩn (log 10.CFU/mL)
1	48,074	7,481	27,603	8,938
2	49,539	7,477	27,003	8,961
3	45,426	7,311	27,084	8,938
4	46,895	7,403	27,694	8,934
5	48,315	7,295	27,530	8,933
6	45,744	7,308	27,125	8,939
7	47,235	7,327	27,007	8,958
8	47,164	7,341	27,133	8,954
9	48,666	7,465	27,683	8,936
10	45,610	7,495	27,090	8,941

Phương pháp đáp ứng bề mặt – cấu trúc tại tâm đã xác định điều kiện tối ưu cho sự lên men của vi khuẩn cao nhất với thời gian là 49,5 giờ, pH 7,5 và nhiệt độ ở 27^0C.

Các kết quả này, làm tiền đề cho nghiên cứu lên men vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* bằng hệ thống lên men tự động BioFlo 120, Eppendorf – Đức với quy mô 2 lít để ứng dụng vào sản xuất chế phẩm VBt phục vụ cho phòng trừ sâu hại.

3.7.3 Hiệu quả gây chết sâu khi kết hợp hai chủng vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki*

Từ kết quả khảo sát khả năng gây chết đối với sâu hại, kháng tia UV, các yếu tố về môi trường, nhiệt độ, pH, độ ẩm và thời gian nuôi cấy, hai chủng vi khuẩn VBt2110.1, VBt26310.1 được phối hợp thử nghiệm gây chết sâu hại. Tiến hành nhân sinh khối hai chủng vi khuẩn trên trong môi trường dịch chiết nấm men ở các nồng độ 10^7 CFU/mL, 10^8 CFU/mL, 10^9 CFU/mL đều thể hiện qua hiệu lực gây chết sâu của các chủng vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki.*

Bảng 3.23 Hiệu quả gây chết (%) sâu tơ của hai chủng vi khuẩn VBt2110.1 và VBt26310.1 trong điều kiện phòng thí nghiệm

Nghiệm thức	Hiệu quả gây chết sâu (%)				
	1 NSXL	2 NSXL	3 NSXL	5 NSXL	7 NSXL
10^7 CFU/mL	32,5 c	55,0 a	70,0 a	77,5 a	85,0 b
10^8 CFU/mL	45,0 b	60,0 a	72,5 a	80,0 a	92,5 a
10^9 CFU/mL	52,5 a	67,5 a	75,0 a	82,5 a	97,5 a
Đối chứng	0,0 d	0,0 b	0,0 b	0,0 b	0,0 c
Mức ý nghĩa	**	**	**	**	**
CV (%)	7,2	5,4	4,6	4,2	3,6

*Trong cùng 1 cột, các giá trị có chữ cái theo sau giống nhau thì sự khác biệt không có ý nghĩa; **: khác biệt ở mức rất có ý nghĩa; NSXL: Ngày sau xử lý.*

Vào thời điểm 2 ngày sau xử lý, hiệu quả diệt sâu đạt trên 55,0% và giữa các nghiệm thức có sự khác biệt đáng kể. Từ ngày thứ 3 đến ngày thứ 7 sau xử lý, hiệu lực diệt sâu tiếp tục tăng, và cao nhất ở mật độ 10^9 CFU/mL đạt 97,5%.

Bảng 3.24 Hiệu quả gây chết (%) sâu khoang của hai chủng vi khuẩn VBt2110.1 và VBt26310.1 trong điều kiện phòng thí nghiệm

Nghiệm thức	Hiệu lực gây chết sâu khoang (%)				
	1 NSXL	2 NSXL	3 NSXL	5 NSXL	7 NSXL
10^7 CFU/mL	32,5 b	55,0 b	67,5 b	75,0 b	77,5 b
10^8 CFU/mL	45,0 ab	60,0 b	70,0 ab	80,0 ab	85,0 a
10^9 CFU/mL	52,5 a	65,0 a	72,5 a	82,5 a	87,5 a
Đối chứng	0,0 c	0,0 c	0,0 c	0,0 c	0,0 c
Mức ý nghĩa	**	**	**	**	**
CV (%)	10,2	5,9	4,8	4,3	3,9

*Trong cùng 1 cột, các giá trị có chữ cái theo sau giống nhau thì sự khác biệt không có ý nghĩa; **: khác biệt ở mức rất có ý nghĩa; NSXL: Ngày sau xử lý.*

Kết quả thí nghiệm cho thấy hiệu lực diệt sâu khoang ở 10^9 CFU/mL là cao nhất 52,5 % sau 1 NSXL, tăng dần và đạt hiệu lực cao nhất là 87,5% tại thời điểm 7 NSXL (Bảng 3.24).

Bảng 3.25 Hiệu quả gây chết sâu xanh da láng (%) của hai chủng vi khuẩn VBt2110.1 và VBt26310.1 trong điều kiện phòng thí nghiệm

Nghiệm thức	Hiệu lực gây chết sâu xanh da láng (%)				
	1 NSXL	2 NSXL	3 NSXL	5 NSXL	7 NSXL
10^7 CFU/mL	22,5 b	42,5 b	52,5 b	62,5 b	77,5 a
10^8 CFU/mL	37,5 a	57,5 a	65,0 a	72,5 a	82,5 ab
10^9 CFU/mL	45,0 a	62,5 a	70,0 a	75,0 a	85,0 b
Đối chứng	0,0 c	0,0 c	0,0 c	0,0 c	0,0 c
Mức ý nghĩa	**	**	**	**	**
CV (%)	8,4	5,9	5,2	4,7	4,1

*Trong cùng 1 cột, các giá trị có chữ cái theo sau giống nhau thì sự khác biệt không có ý nghĩa; **: khác biệt ở mức rất có ý nghĩa; NSXL: Ngày sau xử lý.*

Trong điều kiện thí nghiệm, hiệu lực diệt sâu xanh da láng sau 7 ngày là 77,5% ở mật độ 10^7 CFU/mL và đạt 85,0% ở mật độ vi khuẩn 10^9 CFU/mL, kết quả được thể hiện ở Bảng 3.25.

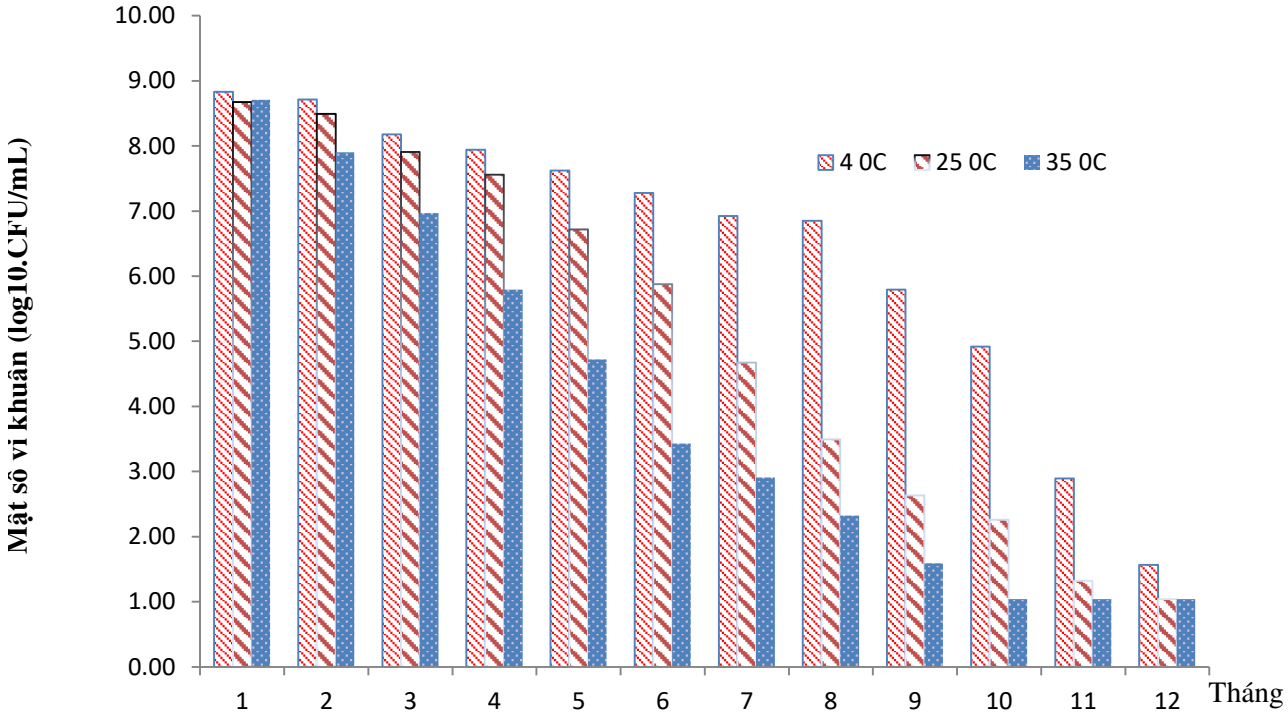
Kết quả cho thấy hiệu lực của các chủng vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* phối hợp tăng dần theo thời gian lây nhiễm và cao hơn hiệu lực diệt sâu của một chủng vi khuẩn đơn lẻ. Grove và ctv (2001) xác định tinh thể protein độc làm giảm thời gian sống của trưởng thành *Heliothis virescens* và *Spodoptera exigua* khi sử dụng *B. thuringiensis* ở 500 µg/mL và ấu trùng của *Plutella xylostella* có thể được kiểm soát bởi *B. thuringiensis* (Ranjbari và ctv, 2011).

Hai chủng vi khuẩn VBt21110.1, VBt26310.1 mang gen *vip3a* (VBt21110.1), gen *cry1* (VBt21110.1, VBt26310.1) và gen *cry9* (VBt26310.1) có thể hỗ trợ với nhau để phòng trừ sâu hại. Nghiên cứu của các tác giả ngoài nước đã minh chứng *vip3a* còn có khả năng kiểm soát một số đối tượng côn trùng ít mẫn cảm với các gen *cry* như *cry1* hoặc *cry2, cry9,* có khả năng hỗ trợ cho việc gây chết các sâu hại có tính kháng gen *cry1* (Tabashnik và ctv, 2000; Jain, 2012; Shu và ctv, 2013).

3.7.4 Ảnh hưởng của điều kiện nhiệt độ bảo quản đến chế phẩm VBt

Hai chủng vi khuẩn VBt21110.1, VBt26310.1 được tăng sinh trong môi trường lỏng để tạo chế phẩm VBt có khả năng diệt được sâu tơ, sâu khoang, sâu xanh da láng. Mật độ vi khuẩn của chế phẩm VBt khi vừa sản xuất là 7,7 x 10^8 CFU/mL. Mật độ vi khuẩn được kiểm tra theo từng tháng bảo quản ở 3 mức nhiệt độ là 4°C, 25°C và 35°C trong thời gian một năm (Hình 3.23).

Mật độ vi khuẩn trong chế phẩm VBt khi bảo quản ở các nhiệt độ 4°C, 25°C và 35°C trong khoảng thời gian từ 1 – 3 tháng giảm ít. Sau 6 tháng, mật số vi khuẩn ở nhiệt độ 4°C giảm xuống 1,9 x 10^7 CFU/mL, nhưng cao hơn so với bảo quản ở 25°C và 35°C. Sau 9 tháng, ở nhiệt độ 35°C, mật số vi khuẩn chỉ còn 38 CFU/mL thấp hơn so với bảo quản ở nhiệt độ 4°C và 25°C. Sau 12 tháng ở nhiệt độ bảo quản 25°C và 35°C thì không thấy xuất hiện vi khuẩn, còn ở 4°C mật số chỉ còn 36 CFU/mL.



Hình 3.23 Mật độ vi khuẩn (log CFU/mL) trong chế phẩm VBt qua các thời gian bảo quản ở các nhiệt độ khác nhau.

Kết quả thí nghiệm cho thấy ở nhiệt độ 4ºC, 25ºC trong thời gian 1 – 6 tháng, và 3 tháng ở nhiệt độ 35ºC, mật số vi khuẩn giảm không đáng kể. Sau 6 tháng thì vi khuẩn giảm nhiều và mất khả năng diệt sâu. Kết quả nghiên cứu của Moustafa1 và ctv (2018), cho thấy sự giảm 60% độc tính của thuốc Dipel 2 × 6.4% WP sau khi bảo quản ở 35 ± 2^0C trong 12 tuần và khoảng 70% sau khi lưu trữ dưới ánh sáng mặt trời trong 2 ngày. Như vậy, vi khuẩn chịu ảnh hưởng nhiều vào điều kiện và độ ổn định của nhiệt độ bảo quản, thời gian lưu trữ, cách thức bảo quản khi chúng được lưu trữ trong kho nóng, kệ và cả khi lưu trữ ngoài trời.

3.8 Tăng sinh vi khuẩn bằng hệ thống lên men tự động 2 lít BioFlo 120

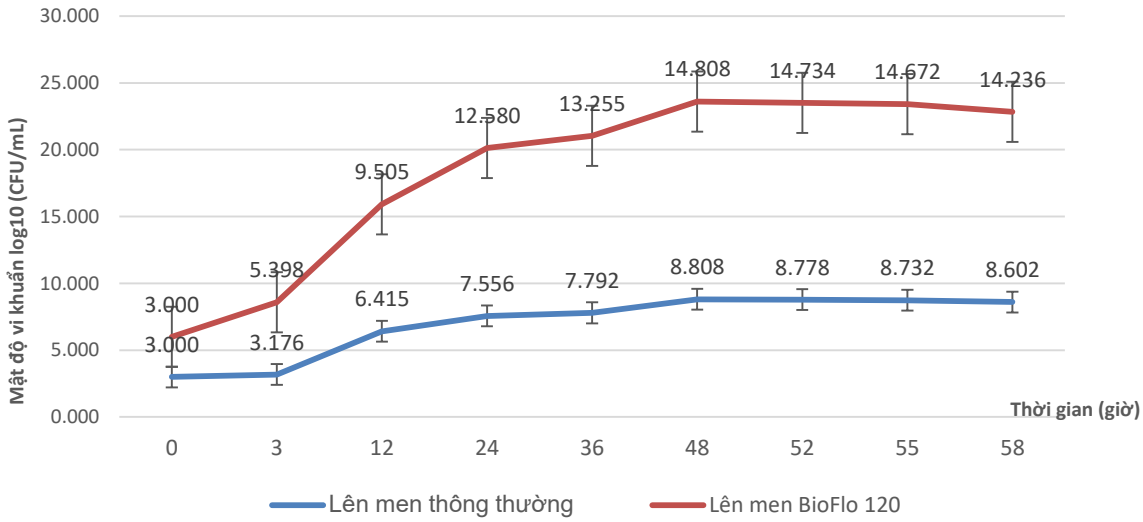
Qua bảng 3.26 cho thấy, khi tăng sinh vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kusrtaki* bằng hệ thống lên men tự động 2 lít BioFlo 120 (Eppendorf – Đức) mật độ vi khuẩn đạt từ 1,8 x 10^{14} CFU/mL đến 6,2 x 10^{14} CFU/mL vào thời điểm 48 giờ sau lên men, cao hơn nhiều lần so với lên men thông thường trong cùng thời gian. Lượng dung dịch vi khuẩn thu được với khối lượng lớn, thuận lợi cho nghiên cứu và tạo chế phẩm phòng trừ sâu hại.

Bảng 3.26 Mật số vi khuẩn (CFU/mL) sau khi lên men bằng hệ thống lên men tự động 2 lít BioFlo 120

Nghiệm thức	Mật số vi khuẩn (CFU/mL)	
	24 giờ	**48 giờ**
Lên men tự động, dịch tăng sinh 0,1%	3,5 x 10^{12} a	1,8 x 10^{14} a
Lên men tự động, dịch tăng sinh 0,5%	1,8 x 10^{13} a	4,7 x 10^{14} a
Lên men tự động, dịch tăng sinh 1,0%	1,6 x 10^{13} a	6,2 x 10^{14} a
Lên men thông thường, dịch tăng sinh 1,0%	2,0 x 10^{8} b	4,3 x 10^{8} b
Mức ý nghĩa	**	**
CV (%)	0,24	0,26

***: khác biệt ở mức rất có ý nghĩa;*

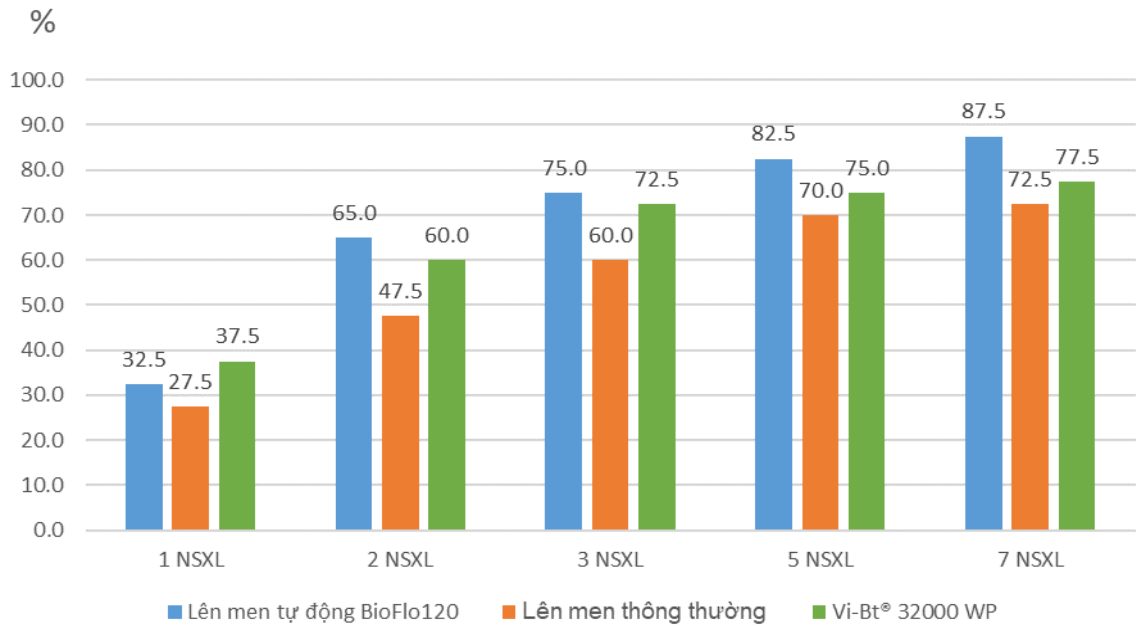
Tiến hành xác định sự sinh trưởng và phát triển của chủng vi khuẩn VBt21110.1 ở nhiệt độ 33^{0}C trong hệ thống lên men tự động và lên men thông thường trong môi trường T3, dịch tăng sinh ban đầu 10^3 (CFU/mL). Kết quả thể hiện ở hình 3.24 cho thấy, giai đoạn tiền phát (Lag phase) ở thời gian 6 giờ, từ 6 đến 36 giờ vi khuẩn ở pha chỉ số hay giai đoạn logarit (Log phase), từ 36 đến 48 giờ giai đoạn ổn định (Stationary phase) và sau 50 giờ vi khuẩn giảm dần (Declining phase).



Hình 3.24. Đường cong sinh trưởng của vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kusrtaki* ở nhiệt độ 33°C trong môi trường T3.

3.9 Hiệu quả của chế phẩm VBt trên sâu tơ, sâu khoang và sâu xanh da láng trong điều kiện nhà lưới

Kết quả thử nghiệm chế phẩm VBt cho thấy, mật số sâu ở nghiệm thức đối chứng không thay đổi trong 7 ngày theo dõi, qua đó có thể xác định được sâu chết ở các nghiệm thức không phải do các yếu tố bên ngoài tác động mà là do vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki.* Tại thời điểm 1 ngày sau phun, mật số sâu ở chế phẩm VBt có giảm nhưng không đáng kể, hiệu quả gây chết sâu tơ trong khoảng 27,5 - 32,5%.



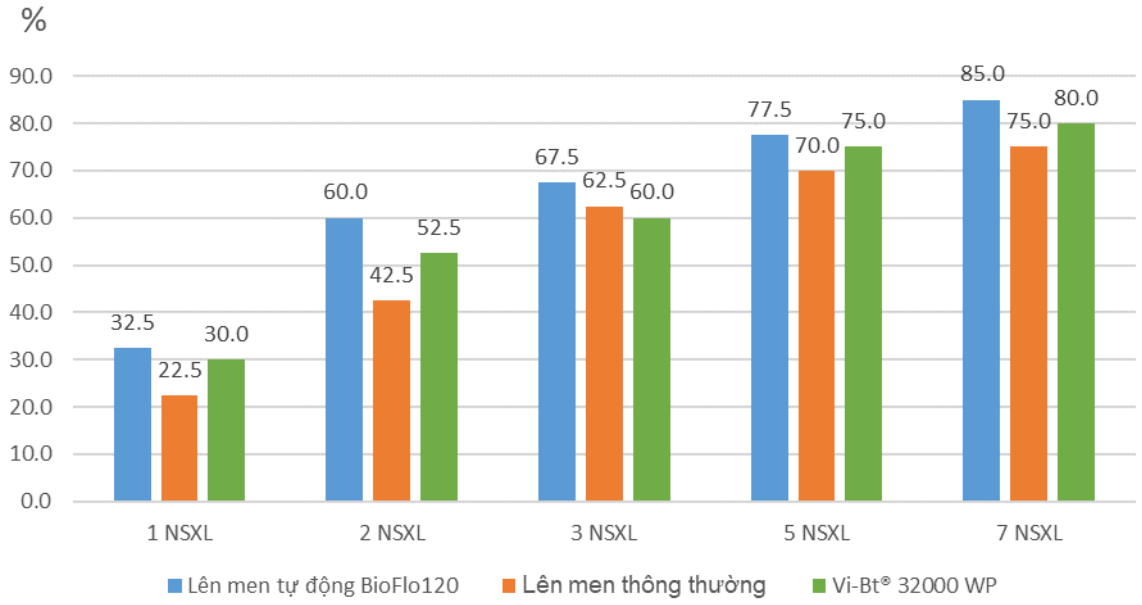
Hình 3.24 Hiệu quả (%) của chế phẩm VBt gây chết sâu tơ trong điều kiện nhà lưới.

Từ 2 đến 7 ngày sau phun, mật số sâu ở các nghiệm thức đều giảm và khác biệt với đối chứng ở mức rất có ý nghĩa. Mật số sâu thấp nhất trong các nghiệm thức được xử lý là nghiệm thức sử dụng chế phẩm VBt lên men thông thường và cao nhất là chế phẩm VBt lên men tự động BioFlo 120. Qua đó, nhận thấy sự tấn công của vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* lên sâu tơ.

Dựa vào hình 3.24, hiệu lực diệt sâu ở các chế phẩm VBt thử nghiệm đều tăng nhanh từ 1 đến 3 ngày sau phun, sau đó thì bắt đầu tăng chậm lại. Và hiệu lực diệt

sâu tơ cao nhất là sử dụng chế phẩm VBt lên men tự động BioFlo 120 (87,5%), thấp nhất là chế phẩm VBt lên men thông thường (72,5%).

Còn đối với sâu khoang, hiệu lực diệt sâu cao nhất ở nghiệm thức VBt lên men tự động BioFlo 120 (85,0%), chế phẩm Vi-Bt® 32000WP (80,0%) và thấp nhất là VBt lên men thông thường (75,0%). Giữa các nghiệm thức không có sự khác biệt nhưng có sự khác biệt so với đối chứng (Hình 3.25)

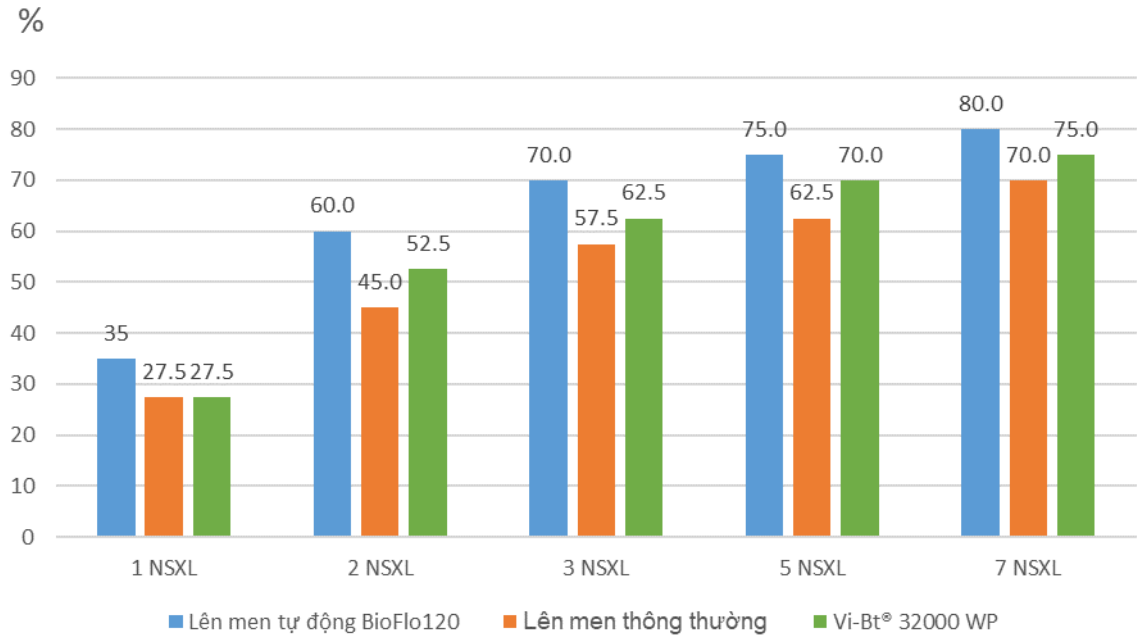


Hình 3.25 Hiệu quả (%) của chế phẩm VBt gây chết sâu khoang trong điều kiện nhà lưới.

Đối với sâu xanh da láng, ngày thứ 1 sau phun, vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* đã bắt đầu có biểu hiện gây bệnh trên sâu, sau đó sâu chết tỷ lệ thuận theo thời gian thử nghiệm. Kết quả hình 3.26 cho thấy, ở nghiệm thức, VBt lên men tự động BioFlo 120 hiệu lực diệt sâu cao nhất là 75,0% ~~sau~~ 5 ngày sau phun, không có sự khác biệt so với nghiệm thức 3. Ở giai đoạn 7 ngày sau phun, giữa nghiệm thức 1 và 3 không nhận thấy sự khác biệt nhưng lại có sự khác biệt với nghiệm thức 2 và đối chứng. Hiệu quả của chế phẩm VBt đạt 80,0% cao hơn so với chế phẩm VBt lên men thông thường (70,0%).

Từ kết quả sử dụng các chế phẩm VBt gây chết đối với sâu tơ (*Plutella xylostella*), sâu khoang (*Spodoptera litura*) và sâu xanh da láng (*Spodoptera exigua*) trong điều kiện nhà lưới, cho thấy hiệu quả gây chết sâu xanh da láng của các chế

phẩm VBt khá tương đồng với hiệu quả gây bệnh sâu khoang và yếu hơn hiệu quả gây bệnh sâu tơ (Hình 3.24 – 3.26).



Hình 3.26 Hiệu quả (%) của chế phẩm VBt gây chết sâu xanh da láng trong điều kiện nhà lưới.

Hiệu quả phòng trị của các chế phẩm VBt bắt đầu có hiệu lực từ 3 ngày sau phun và tăng cao nhất vào lúc 7 ngày sau phun (hiệu lực dao động khoảng 70,0 – 87,5%). Kết quả nghiên cứu của nhiều tác giả cũng cho thấy vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* làm cho sâu bộ cánh vảy thường chết trong vòng 12 giờ đến 120 giờ tùy thuộc vào lượng *B. thuringiensis* var. *kurstaki* sâu ăn vào (Chilcott và ctv, 1993; Liliana, 2013; Leopoldo Palma, 2014). Do đó, trong khoảng thời gian từ 12 giờ đến 72 giờ là khoảng thời gian vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* có sự tích lũy dần mật số và từ 120 giờ sau khi xử lý thì bắt đầu phát huy hiệu quả gây chết sâu.

Các mẫu sâu chết ở các nghiệm thức được tiến hành mổ lấy hệ tiêu hóa đem nuôi cấy lại trong môi trường T3, đã xác định được vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* tồn tại trong ruột sâu chết. Từ kết quả trên, có thể khẳng định nguyên nhân sâu chết là do ăn phần lá có vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, dưới tác động của *B. thuringiensis* var. *kurstaki* làm cho sâu biếng ăn và chết. Trong suốt quá trình

theo dõi, số lượng sâu còn sống ở các nghiệm thức có xử lý chế phẩm, biểu hiện triệu chứng biếng ăn rõ rệt và khả năng gây hại giảm đi đáng kể. Do đó, xét về mặt hiệu lực tuy không đạt tuyệt đối 100%, nhưng xét về mặt hiệu quả thì vẫn được đảm bảo.

Từ kết quả đánh giá chế phẩm VBt gây chết đối với sâu hại trong điều kiện nhà lưới, đạt được hiệu quả tương đối cao (70 – 87,5%), luận án tiếp tục tiến hành thử nghiệm ngoài đồng đối với sâu tơ gây hại cho cây trồng tại Thành phố Hồ Chí Minh.

3.10 Hiệu quả của chế phẩm VBt đối với sâu tơ ngoài đồng ruộng

Thí nghiệm về hiệu quả của chế phẩm VBt đối với sâu tơ (*Plutella xylostella*) ngoài đồng ruộng được thực hiện tại Trung tâm Giống cây trồng, vật nuôi và thủy sản, xã Phạm Văn Hai, huyện Bình Chánh, Thành phố Hồ Chí Minh. Đối tượng: Trên cây cải xanh ở giai đoạn 20 ngày sau trồng. Thời gian thực hiện từ tháng 11 – 12/2020, ở nhiệt độ trung bình là 27,5^{0}C, trong đó nhiệt độ cao nhất là 32^{0}C vào tháng 11 và thấp nhất là 21^{0}C vào tháng 12, ẩm độ cao nhất là 77%, lượng mưa cao nhất là 50 mm.

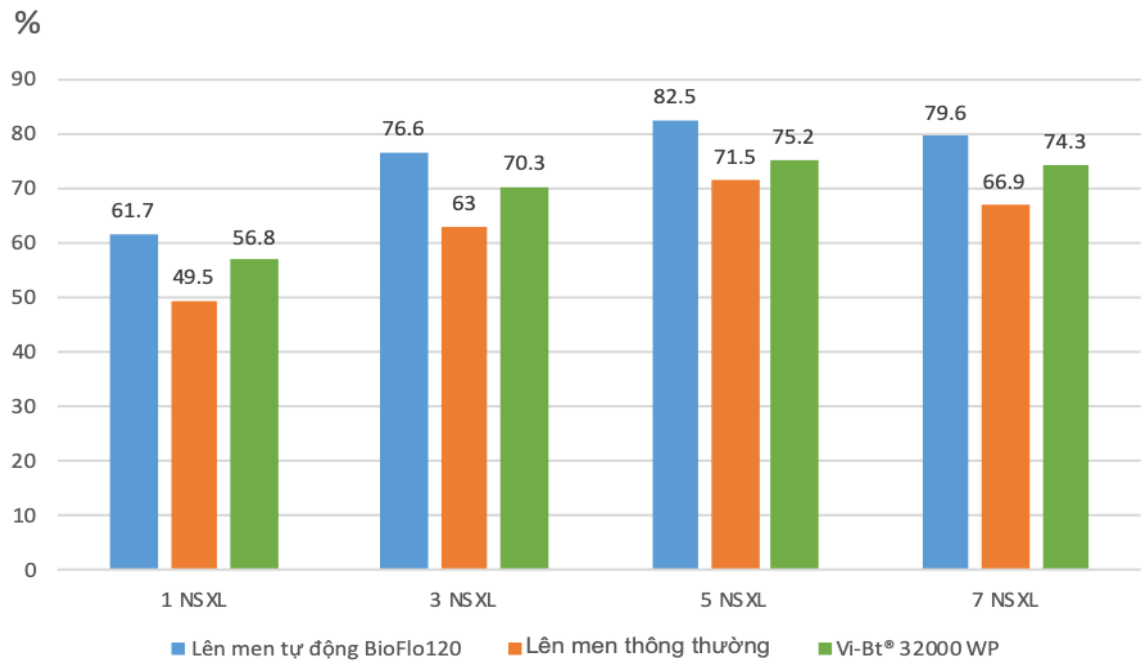
Bảng 3.27 Mật số sâu tơ (*Plutella xylostella*) ở các nghiệm thức thí nghiệm

Nghiệm thức	Liều lượng (mL, g/ha)	Mật số sâu tơ (con/cây)				
		TP	1 NSP	3 NSP	5 NSP	7 NSP
NT 1	**1.000**	14,3	6,0 a	4,0 a	3,3 a	3,3 a
NT 2	**1.000**	13,5	7,5 a	6,0 b	5,0 b	5,0 b
NT 3	**1.000**	14,8	7,0 a	5,3 ab	4,8 b	4,3 ab
NT 4	**1.000**	12,5	13,8 b	15,0 c	16,3 c	14,0 c
Mức ý nghĩa		ns	**	**	**	**
CV (%)			2,1	5,6	8,9	7,9

*Trắc nghiệm phân hạng theo phép thử DUNCAN ở mức 5 %; **: khác biệt ở mức rất có ý nghĩa; NSP: Ngày sau phun; NT 1 (Lên men tự động BioFlo 120), NT 2 (Lên men thông thường), NT3 (*Vi-Bt® 32000 WP) *NT 4 (Phun nước cất).*

Từ kết quả thể hiện ở bảng 3.27, ghi nhận mật số trung bình sâu tơ tại các nghiệm thức từ 12 đến 15 con/cây và sâu đang sống ở giai đoạn tuổi 2 vào thời điểm trước khi phun thuốc. Tại thời điểm 3 và 7 ngày sau phun, mật số sâu ở đối chứng giảm xuống 3 – 5 con/cây, còn mật số sâu ở nghiệm thức chế phẩm VBt và Vi-Bt® 32000WP lại tiếp tục giảm nhanh, khác biệt này ở mức rất có ý nghĩa so với đối chứng. Mặt khác, giữa các nghiệm thức phun chế phẩm VBt không có sự khác biệt, trong đó mật số sâu tơ thấp nhất là VBt lên men tự động BioFlo 120 (3,3 con/cây), chế phẩm Vi-Bt® 32000WP (4,3 con/cây) và cao nhất là VBt lên men thông thường (5,0 con/cây).

Khi so sánh giữa các nghiệm thức phun chế phẩm (VBt và Vi-Bt® 32000WP) với nghiệm thức đối chứng không phun thuốc (NT4) ta nhận thấy sự khác biệt rõ rệt về mật số sâu hại. Các nghiệm thức phun chế phẩm VBt có mật số sâu hại thấp hơn so với nghiệm thức đối chứng không phun thuốc. Điều đó có thể kết luận được rằng, chế phẩm VBt có hiệu lực trong việc phòng trừ sâu tơ gây hại trên cây cải xanh. Kết quả hiệu lực của các chế phẩm được thể hiện hình 3.27



Hình 3.27 Hiệu quả (%) của chế phẩm VBt đối với sâu tơ (*Plutella xylostella*) gây hại trên cây cải bẹ xanh.

Bảng 3.28 Ảnh hưởng của chế phẩm VBt đối với cây cải bẹ xanh (cấp)

Nghiệm thức	Liều lượng (ml, g/ha)	Cấp			
		1 NSP	3 NSP	5 NSP	7 NSP
NT 1	**1.000**	1	1	1	1
NT 2	**1.000**	1	1	1	1
NT 3	**1.000**	1	1	1	1
NT 4	**1.000**	1	1	1	1

*NSP: Ngày sau phun; NT 1 (Lên men tự động BioFlo 120), NT 2 (Lên men thông thường), NT3 (*Vi-Bt® 32000 WP) *NT 4 (Phun nước cất).*

Do đây là sản phẩm sinh học, hiệu lực của thuốc cần có thời gian để phát huy tác dụng, các vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* cần phải được sâu hại ăn vào thông qua đường tiêu hóa, và trong cơ thể sâu hại vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* mới phát huy tác dụng. Vấn đề thời gian là lưu ý chung khi sử dụng chế phẩm sinh học so với thuốc hóa học. Mặt khác, do mỗi chế phẩm sinh học có thời gian tồn tại ngoài môi trường khác nhau, cho nên hiệu lực của chế phẩm sinh học sẽ giảm nếu như ở ngoài môi trường quá lâu, hiệu lực thuốc sẽ giảm một cách đáng kể. Từ kết quả ghi nhận hiệu lực của các chế phẩm, cho thấy chế phẩm VBt lên men tự động BioFlo 120 có hiệu quả gây chết sâu tơ cao hơn so với chế phẩm VBt lên men thông thường và Vi-Bt® 32000WP. Ngoài ra, việc sử dụng chế phẩm VBt không ảnh hưởng đến sự phát triển của cây cải và chất lượng sản phẩm khi thu hoạch (Bảng 3.28).

Qua thí nghiệm, hiệu quả gây chết sâu hại trong nhà lưới và ngoài đồng, chế phẩm VBt dễ sử dụng, nhưng thời gian bảo quản không được lâu. Do VBt dạng lỏng có môi trường thuận lợi để bào tử hoạt động và hình thành các protein tinh thể độc, để tác động lên ruột sâu, thời gian tác động lên sâu càng lâu thì khả năng gây chết sâu càng giảm.

Thảo luận chung

Ở Việt Nam, trong những năm gần đây, việc nghiên cứu vi khuẩn *B. thuringiensis* và tạo chế phẩm sinh học của vi khuẩn *B. thuringiensis* rất ít. Ngoài những đòi hỏi phải đạt yêu cầu về mặt kỹ thuật, còn phải đầy đủ từ chọn chủng vi khuẩn có tính độc cao đến việc tạo ra chế phẩm có hiệu lực diệt sâu cao và nhanh chóng. Kết quả nghiên cứu của luận án đã góp phần trong việc ứng dụng khoa học vào thực tiễn từ việc thu thập các chủng vi khuẩn *B thuringiensis* trên các vùng đất khác nhau ở các tỉnh, thành của Việt Nam để chọn ra những chủng vi khuẩn có độc tính cao. Từ đó tiếp tục tiến hành các bước phân lập cho đến thử nghiệm hiệu lực diệt sâu hại nhằm tạo ra sản phẩm sinh học.

Việc phân lập *B. thuringiensis* có thể sử dụng nhiều phương pháp như: Sử dụng sốc nhiệt, kháng sinh và chọn lọc sodium acetate kết hợp với xử lý nhiệt. Trong đó, chọn lọc sodium acetate kết hợp xử lý nhiệt được ưu tiên sử dụng. Do sodium acetate 0,25M sẽ ức chế sự nảy mầm của *B. thuringiensis* và một số loài trong môi trường tăng sinh. Xử lý nhiệt sẽ loại bỏ những vi khuẩn không có khả năng chịu nhiệt, các tế bào không sinh bào tử. Bên cạnh đó, việc sử dụng môi trường nuôi cấy cũng không kém phần quan trọng. Môi trường T3 là môi trường giàu dinh dưỡng, có chất $MnCl_2$ (có tác dụng làm ổn định cấu trúc của protein tinh thể và kích thích tạo bào tử, đặc biệt là vi khuẩn *B. thuringiensis*.).

Kết quả nghiên cứu đã xác định 261 chủng vi khuẩn với nhiều hình dạng tinh thể protein độc rất đa dạng (hình thoi, hình cầu, hình ovan, hình quả trám), trong đó, tinh thể hình thoi chiếm tỷ lệ cao nhất (48,3 %). Sự đa dạng về hình dạng tinh thể là cơ sở tạo nên khả năng diệt côn trùng ở nhiều bộ khác nhau (bộ cánh vảy, bộ cánh cứng, và bộ hai cánh).

Việc định danh bằng kỹ thuật sinh học phân tử (PCR) đã xác định chính xác được chủng vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* mang các gen *cry* với sự xuất hiện của gen *cry1* là nhiều nhất (63,3%), nhóm *cry2* (28,7%), *cry4* (6,9%) và ít nhất là *cry9* (0,1%). Từ kết quả kiểm tra mức độ tương đồng của sản phẩm PCR bằng công cụ BLAST- NCBI cho thấy sự tương đồng cao giữa trình tự sản phẩm PCR

với các trình tự gen *cry1, cry2, cry4 và cry9* của vi khuẩn trên GenBank. Kết quả cho thấy, các mẫu giải trình tự đều là vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* và mức độ tương đồng (Max ident) của các mẫu là 95 – 100%, điều này có thể thấy sự tương đồng giữa các trình tự là rất có ý nghĩa. Theo hệ thống phân loại gen *cry* thì sự xuất hiện gen *cry1* chủ yếu tập trung vào vi khuẩn *B. thuringiensis* mang tinh thể hình thoi. Theo nghiên cứu của Salama (2015) gen *cry1* là nhóm gen lớn nhất (83,33%) trong số các gen *cry* đã được kiểm tra, tiếp theo là các phân họ gen *cry1 (cry1B và cry1C)* với tỷ lệ tương ứng là 38,9% và 77,8%.

Ngoài ra, khi phối hợp những chủng vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* có mang gen *cry* khác nhau để tạo chế phẩm sinh học sẽ làm tăng khả năng diệt sâu so với sử dụng môt chủng đơn lẻ. Kết quả nghiên cứu của Shah và ctv (2017), khi phối hợp gen *cry1Ac - cry9Aa* được sử dụng để kiểm soát sâu xanh (*Helicoverpa armigera*) độc tính của độc tố tái tổ hợp *cry1Ac* và *cry9Aa* cao gấp 5 lần so với *cry1Ac*.

Kết quả nghiên cứu của luận án, cho thấy mức độ quan hệ mật thiết về khả năng sinh tinh thể độc hình thoi và sự hiện diện của gen độc tố *vip3a*. Khả năng tồn tại gen *vip3a* trong vi khuẩn *B. thuringiensis* là khoảng 65%. So với các gen gây độc khác như *cry* hay *cyt*, *vip3a* có phổ diệt sâu và côn trùng rộng hơn. Bên cạnh đó, *vip3a* còn có khả năng kiểm soát một số đối tượng sâu bệnh và côn trùng ít nhạy cảm với các gen *cry* như *cry1* hoặc *cry2*. Vì vậy, kết quả nghiên cứu đã có ý nghĩa trong việc ứng dụng chế phẩm sinh học phòng trừ sinh vật hại cây trồng.

Mặt khác, vi khuẩn rất dễ bị ảnh hưởng bởi bức xạ UV do kích thước nhỏ, thời gian phát triển ngắn và không có sắc tố chống tia UV hiệu quả. Vi khuẩn *B. thuringiensis* dễ bị ảnh hưởng bởi bức xạ mặt trời và với tia cực tím ở bước sóng 254 nm (UV-C), khả năng sinh bào tử và tinh thể độc của chủng vi khuẩn trong chế phẩm Bt giảm nhanh ở điều kiện đồng ruộng. Trong nghiên cứu này, tia UV ảnh hưởng rõ rệt đến sức sống của vi khuẩn, khả năng hình thành bào tử và tinh thể các chủng vi khuẩn đều bị ảnh hưởng nghiêm trọng. Khi chiếu tia UV ở bước sóng 254 nm, số khuẩn lạc hình thành và mật độ bào tử vi khuẩn ít hơn so với chiếu tia UV ở bước sóng 365 nm. Từ kết quả phòng trừ sâu tơ trong phòng thí nghiệm và ngoài

đồng ruộng tại Lâm Đồng, ta thấy được 03 chủng vi khuẩn đều có hiệu lực diệt sâu tơ, tuy khả năng gây độc khác nhau giữa các chủng vi khuẩn nhưng đều có hiệu lực tương đương với chế phẩm thương mại đối chứng. Kết quả này còn cho thấy tiềm năng của các chủng Bt đột biến trong phòng trừ sâu hại trên rau ăn lá. Vì vậy, các nghiên cứu đánh giá hiệu lực phòng trừ sâu hại và tạo chế phẩm sinh học từ các chủng vi khuẩn này cần tiếp tục được thực hiện.

Vi khuẩn *B. thuringiensis* ít bị ảnh hưởng khi pH trong môi trường từ 5,5 đến 8,5 và điều kiện trung tính hoặc kiềm nhẹ thích hợp cho tạo bào tử. Do đó, pH 7 là điều kiện tối ưu để nhân sinh khối đối với các chủng vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki*. Vi khuẩn *B. thuringiensis* sinh trưởng ở nhiệt độ từ 15°C đến 45°C, nhiệt độ tối ưu 27 – 33°C, nhiệt độ thấp sinh trưởng chậm, nhiệt độ cao từ 35°C đến 40°C sinh trưởng nhanh nhưng chóng lão hóa. Từ đó, có thể thấy, nhiệt độ khác nhau thì khả năng nhân sinh khối của các chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. khác nhau (Ngô Đình Bính và ctv, 2010; Stanford và ctv, 2015). Kết quả thực nghiệm cho thấy nhiệt độ từ 27 đến 33^{0}C là nhiệt độ thích hợp nhân sinh khối ba chủng vi khuẩn.

Phương pháp đáp ứng bề mặt – cấu trúc tại tâm đã xác định điều kiện tối ưu cho sự lên men của vi khuẩn là cao nhất. Kết quả đáp ứng được mục tiêu xác định yếu tố và ngưỡng thích hợp cho lên men vi khuẩn. Các yếu tố ảnh hưởng tới quá trình sinh trưởng và phát triển của Bt như nhiệt độ, pH, oxy, môi trường lên men đều ảnh hưởng đến quá trình sinh độc tố (Liu và ctv, 1998; Lachhab và ctv, 2001; BenFarhat và ctv, 2013). Cho nên, để tạo chế phẩm Bt đạt hiệu quả cao nhất trong phòng trừ sâu hại thì việc nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng đến sự hình thành bào tử và tinh thể độc cần tiếp tục được thực hiện.

Qua sự đánh giá hiệu lực diệt sâu của vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* ở nghiên cứu của luận án có thể rút ra một số khó khăn khi sử dụng chế phẩm sinh học được sản xuất từ *B. thuringiensis.* Thứ nhất, do vi khuẩn *B. thuringiensis* tác động qua đường ruột sâu làm cho sâu không chết đồng thời và ngay lập tức sau khi phun, mật độ và thời gian sâu chết phụ thuộc rất lớn vào tuổi sâu, lượng và loại tinh thể độc sâu ăn. Thứ hai, do vi sinh vật sống nên khi gặp điều kiện bất lợi như tia

UV, nhiệt độ, mưa đã làm giảm độc lực của vi khuẩn *B. thuringiensis*, điều này có thể nhìn thấy khi sử dụng để diệt sâu ở ngoài đồng ruộng, cho hiệu quả giảm hơn nhiều so với trong nhà lưới. Một điều cần lưu ý nữa là thời gian bảo quản của chế phẩm sinh học từ vi khuẩn *B. thuringiensis*, đó là khi chúng đến tay người tiêu dùng có còn đảm bảo độc lực như ban đầu của nhà sản xuất hay không.

Vì thế, nếu muốn phát triển thuốc bảo vệ thực vật sinh học cần phải giải quyết các vấn đề cơ bản nêu trên. Đề ra kế hoạch để hướng dẫn và tập huấn cho người nông dân biết được cách thức, hiểu được tác dụng cũng như lợi ích do chế phẩm sinh học mang lại, để họ có thể an tâm sử dụng.

KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

1. Kết luận

Thông qua kết quả phân tích 616 mẫu đất ở 22 tỉnh, thành đã xác định sự phân bố của vi khuẩn *B. thuringiensis* có 261 chủng sinh tinh thể với các hình dạng tinh thể protein độc như: hình thoi (48,3%), hình ovan (19,2%), hình cầu (19,9%) và hình quả trám (12,6%). Đồng thời cũng đã xác định sự hiện diện gen độc tính của các dòng vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* như: gen *cry1* nhiều nhất (63,4%), gen *cry2* (28,7%), *cry4* (6,9%) và ít nhất là *cry9* (1,0%) và có 5 dòng xuất hiện *vip3a*.

Đã xác định 20 chủng vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* ở 8 tỉnh, thành có độc tính cao là nguồn vật liệu sản xuất chế phẩm sinh học an toàn, thân thiện với môi trường, phù hợp với nông nghiệp hữu cơ. Với giá trị LC_{50} trên 3 đối tượng sâu thí nghiệm của các chủng vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* trong khoảng $2,5 \times 10^5$ – $4,5 \times 10^7$ CFU/mL và LT_{50} từ 4 đến 5 ngày sau xử lý ở giai đoạn sâu tuổi 2. Ở giai đoạn sâu tuổi 4 LC_{50} trong khoảng $1,5 \times 10^6$ – $2,5 \times 10^8$ CFU/mL và LT_{50} từ 4 đến 5 ngày sau xử lý.

Bên cạnh đó, đã xác định được ba chủng vi khuẩn VBt2110.1ΔUV, VBt26310.1ΔUV và VBt2751ΔUV có khả năng chống chịu tia UV tốt nhất ở bước sóng 254 nm và 365 nm với thời gian ở mức 120 phút. Hiệu quả phòng trừ sâu hại của ba chủng vi khuẩn đạt từ 52,0% đến 65,0%, có tiềm năng ứng dụng trong phòng trừ sinh học sâu hại lá trên cây rau.

Điều kiện tối ưu để tăng sinh vi khuẩn *B. thuringiensis var. kurstaki* là trong môi trường dịch chiết nấm men và khoáng với điều kiện nhiệt độ 28°C, pH 7,5, sau 48 giờ nuôi cấy. Hiệu quả diệt sâu tơ ngoài đồng ruộng trên cây cải tại Thành phố Hồ Chí Minh của chế phẩm VBt đạt 79,6% vào thời điểm 7 ngày sau phun. Kết quả làm tiền đề cho nghiên cứu lên men vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* với quy mô lớn để ứng dụng sản xuất chế phẩm sinh học phục vụ cho phòng trừ sâu hại.

2. Đề nghị

Có thể áp dụng điều kiện tăng sinh vi khuẩn *B. thuringiensis var. kurstaki* ở quy mô lớn hơn để ứng dụng sản xuất chế phẩm sinh học phục vụ cho phòng trừ sâu hại.

Tiếp tục đánh giá hiệu quả của chế phẩm VBt trên các loài sâu bộ cánh vảy và hai cánh gây hại rau ở các vùng rồng rau của Thành phố Hồ Chí Minh và các tỉnh. Mở rộng đối tượng đánh giá hiệu quả của chế phẩm VBt trên các đối tượng sâu hại và các loại cây trồng khác.

DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Abad A.R., Duck N.B., Feng X., Flannagan R.D., Kahn T.W., Sims L.E., 2002. Genes encoding novel protein with pesticidal activity against coleopterans. WO 02/34774 A2. 02 May 2002. E.I. DuPont de Nemours and company (US)
2. Abbas, M.S.T, 2018. Genetically engineered (modified) crops (*Bacillus thuringiensis* crops) and the world controversy on their safety. *Egytian Journal of biologcal pest control* 28: 52.
3. Abbot, W.S., 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal* of *Economic Entomology* 18, 265 – 267.
4. Abdelkefi-Mesrati, L., Tounsi S., Jaoua S., 2005. Characterization of a novel vip3-type gene from *Bacillus thuringiensis* and evidence of its presence on a large plasmid. *FEMS Microbiol*, 353 – 358.
5. Abdelkefi-Mesrati L., Boukedi H., Chakroun M., Kamoun F., Azzouz H., Tounsi S., 2011. Investigation of the steps involved in the difference of susceptibility of *Ephestia kuehniella* and *Spodoptera littoralis* to the *Bacillus thuringiensis vip3Aa16* toxin. *Journal of invertebrrate pathology,* 107, 198 – 201.
6. Abdelmalek N., Sellami S., Ben Kridis A., Tounsi S., Rouis S., 2016. Molecular characterisation of *Bacillus thuringiensis* strain MEB4 highly toxic to the Mediterranean flour moth *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). *Pest Management Science 72, 913 – 921.*
7. Abhishek, S., Patel, P.R., 2011. Biology, Food Utilization and Seasonal Incidence of *Spodoptera litura* (Fab.) on Banana cv. Grand Naine. *Navsari Agricultural University*, 49 – 51.
8. Akhurst, R., James, W., Bird, L., Beard, C., 2003. Resistance to the Cry1Ac—endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in the cotton bollworm, *Helicoverpa*

armigera (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology, 96, 1290 – 1299.*

9. Akira K., 2000. *Fungus diseases handbook for vegetables*. Japan Plant Protection Association, 28 page.
10. Ali, G., Van der W.W., Vlak, J.M., 2018. Biological and genetic characterization of a Pakistani isolate of *Spodoptera litura* nucleopolyhedro virus. *Biocontrol Science and Technology* 28, 20 – 33.
11. Ammouneh H., Harba M., Idris E., Makee H., 2011. Isolation and characterization of native *Bacillus thuringiensis* isolates from Syrian soil and testing of their insecticidal activities against some insect pests. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 35: 421 – 431.
12. Aramideh S., Saferalizadeh M.H., Pourmirza A.A., Bari M.R., Keshavarzi M., Mohseniazar M., 2010. Characterization and pathogenic evaluation of *Bacillus thuringiensis* isolates from West Azerbaijan province-Iran. *African Journal of Microbiology Research* 4, 1224 - 1229.
13. Aramideh, S., Saferalizadeh, M. H., Pourmirza, A. A., Bari, M. R., Keshavarzi, M., and Mohseniazar, M., 2010. Isolation and identification native *Bacillus thuringiensis* in different habitat from West Azerbaijan and evaluate effects on Indian moth *Plodia interpunctella* (Hubner) (Lepidoptera: *Pyralidae*). *Munis Entomol Zool* 5, 1034-1039.
14. Aronson, A., Geng, C., Wu, L., 1999. Aggregation of *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins upon binding to target in-sect larval midgut vesicles. *Applied and Environmental Microbiology* 65 (6): 2503 – 2507.
15. Baig D.N, Mehnaz S., 2010. Determination and distribution of cry-type genes in halophile Bacillus thuringiensis isolates of Arabian Sea sedimentary rocks. *Microbiological Research* 165, 376 – 383
16. Barjac, H., Frachon, E., 1990. Classification of *Bacillus thuringiensis* strains. *BioControl 35,* 233-240.

17. Ben-Dov E.Q., Zaritsky A., Dahan E., Barak Z., Sina R., Manasherob R., 1997. Extended screening by PCR for seven cry group genes from field collected strains of *Bacillus thuringiensis*. *Applied of environmental microbiolology,* 63, 4883 – 4890.

18. Bergay, 1957. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (7th ed.). Baltimore the Williams & Wilkins company, 1130 page.

19. Bland, J. M., Altman, D. G., 1998. Survival probabilities (The Kaplan – Meier method). *Bristis Medical Journal*, 317 (7172): 1572 – 1580.

20. 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 of environmental microbiolology, 64*.

21. Bravo, A., Likitvivatanavong, S., Gill, S. S., Soberón, M. 2011. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. *Insect biochemistry and Molecular Biology,* 41, 423-431.

22. Bùi Chí Bửu, 2002. *Cơ sở di truyền tính kháng sâu bệnh hại cây trồng*. Nhà xuất bản Nông Nghiệp Thành phố Hồ Chí Minh.

23. Bùi Thị Hương, Đỗ Thị Ngọc Huyền, Nguyễn Tuấn, Nguyễn Thùy Châu, Đinh Duy Kháng, 2003. *Phân lập các chủng Btk ở Việt Nam*. Tạp chí di truyền học và ứng dụng*, số 3/2003.*

24. Bùi Thị Hương, Đỗ Thị Ngọc Huyền, Nguyễn Tuấn, Nguyễn Thùy Châu, Đinh Duy Kháng (2003), *Tạo dòng và xác định trình tự DNA đặc điệu của gen cry1Ab từ các chủng Btk phân lập ở Việt Nam*. Tạp chí di truyền học và ứng dụng*, số 4/2003.*

25. CAPS., 2007. *Small grains commodity – based survey reference*. Cooperative agricultural pest survey. P.93.

24. Capalbo, D.M.F., Valicente, F.H., Oliveira, I.M., 2001. Solid-State fermentation of *Bacillus thuringiensis tolworthi* to control Fall Armyworm in Maize. *Journal of Biotechnology*, 4, 9 – 10.

26. Carlton. B.C., Gonzalez J.M.Jr., 1985. The genetics and molecular biology of *Bacillus thuringiensis*. In "The Molecular Biology of the Bacilli" *Academic Press* 2, 211 – 249.

27. Carlson, C.R., Kolsto, A.B., 1993. A complete physical map of a *Bacillus thuringiensis* chromosome. *Journal of Bacteriology* 175, 1053-1060.

28. Carrozi, N.B., Kramer, V.C., Warren, G.W., Evola, S., Koziel, M.G., 1991. Predection of insecticidal activity of *Baillus thuringiensis* strains by polymerase chain reaction product profiles. *Applied of environmental microbiolology* 57, 3057 – 3061.

29. Chandi, C., Mandal, G.S., Basu, A., Ghosh, K.S., Gupta, S.D., Maiti M.K., Sen, S. K., 2007. Prediction-based protein engineering of domain I of Cry2A entomocidal toxin of *Bacillus thuringiensis* for the enhancement of toxicity against lepidopteran insects. *Protein Engineering, Design and Selection* 20, 599 – 606.

30. Chattopadhyay, P., Banerjee, G., 2018. Recent advancement on chemical arsenal of Bt toxin and its application in pest management system in agricultural field. *3. Biotech*, 8, 201 – 213.

31. Chilcott C.N., Wigley P.J., 1993. Isolation and toxicity of *Bacillus thuringiensis* from soil and insect habitats in New Zealand. *Journal of Invertebrate Pathology* 61, 244 – 247.

32. Chilcott, C.N., Wigley, P.J., Broadwell, A.H., Park, D.J., Ellar, D.J., 1998. Activities of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins cyt1Aa and cyt2Aa against Three species of sheep blowfly. *Applied of environmental microbiology*, 64, 4060 – 4061.

33. Cohen, S., Dym, O., Albeck, S., Ben-Dov, E., Cahan, R., Firer, M., Zaritsky, A., 2008. High-resolution crystal structure of activated Cyt2Ba monomer from *Bacillus thuringiensis* subsp. *Israelensis*. *Journal of Molecular Biology,* 380 : 820 – 827.

34. Collett, D., 2015. *Modelling survival data in medical research. CRC press,* 548 page.

35. Crickmore, N., Zeigler, D. R., Feitelson, J., Schnepf, E., Van R.J., Lereclus, D., Baum, J., Dean, D.H., 1998. Revision of the Nomenclature for the Bacillus thuringiensis Pesticidal Crystal Proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62, 807 – 813.

36. Crickmore N., 2017. *Bacillus thuringiensis* Toxin Classification. In L. M. Fiuza, R. A. Polanczyk & N. Crickmore (Eds.), *Bacillus thuringiensis and Lysinibacillus sphaericus: Characterization and use in the field of biocontrol,* 41 – 52.

37. Dagga, 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.

38. Deepak, S., Eitan Ben-Dov, Robert, M., Ze'ev, B., Sammy, B., Arieh, Z., 2002. A UV Tolerant mutant of *Bacillus thuringienis* subsp. Kurstaki producing Melanin. *Current Microbiology* 44, 25 – 30.

39. DeLucca II A.J., Simonson J.G., Larson A.D., 1981. *Bacillus thuringiensis* distribution in soils of the United States. *Canadian Journal of Microbiology* 27, 865-870.

40. Dean, H. D., 1984. Biochemical Genetics of the Bacterial Insect-Control Agent *Bacillus thuringiensis*: Basic Principles and Prospects for Genetic Engineering. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 2, 341-363.

41. De Maagd, R.A., Bravo, A., Crickmore, N., 2001. How Bacillus thuringiensis has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends in Genetics* 17, 193 – 199.

42. Diego H. Sauka, Graciela B. Benintende, 2017. Diversity and distribution of lepidopteran-specific toxin genes in *Bacillus thuringienis* strains from Argentina. *Revista Argentina de Microbiologia*, 49 (3), 273-281.

43. Đỗ Lý Thanh, 2009. *Phân lập các dòng vi khuẩn Bacillus Thuringiensis có đặc tính diệt sâu khoang (Spdoptera Litura)*. Đại học Cần Thơ.

44. Dubovskii, I.M., Olifirenko, O.A., Glupov, V.V, 2005. Level and activities of antioxidants in intestine of larvae *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera, Pyralidae) at peroral infestation by bacteria *Bacillus thuringiensis* ssp. galleriae. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, 41, 20–25.

45. El-kersh T.A., Al-sheikh Y.A., Al-akeel R.A., and Alsayed A.A. 2014. Isolation and characterization of native *Bacillus thuringiensis* isolates from Saudi Arabia. *African Journal of Biotechnology* 11, 1924 – 1938.

46. Ennouri, K., Ben Ayed, R., Triki, M.A., Ottaviani, E., Mazzarello, M., Hertelli, F., Zouari, N., 2017. Multiple linear regression and artificial neural networks for delta-endotoxin and protease yields modelling of *Bacillus thuringiensis*. *3. Biotech,* 7, 187 – 200.

47. Estruch, J.J., Warren, G.W., Mullins, M.A., Nye, G.J., Craig, J.A., Koziel, M.G., 1996. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA* 93, 5389 – 5394.

48. Erban, T., Nesvorna, M., Erbanova M., Hubert, J., 2009. *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* control of synanthropic mites (Acari: Acaridida). *Experimental and Applied Acarology*, 49: 339 – 346.

49. Frankenhuyzen, V.K., Gringorten, L., Gauthier, D., 1997. *Cry9Ca1* toxin, a *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein with high activity against the spruce budworm (*Choristoneura fumiferana*). *Applied and Environmental Microbiology* 63, 4132 – 4134.

50. Frankenhuyzen, V.K., 2009. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1 – 16.

51. Fatemeh T., Sadaf T., Hedyeh F. T., Fahimeh S. T., Anosh N., Seyed R. S., Ali N., Mostafa J., 2013. Isolation and molecular identification of cry gene in

Bacillus thuringiensis isolated from soils by semi-conserve PCR. *European Journal of Experimental Biology* 3, 452-456.

52. Gahan, L.J., Gould, F., Heckel, D.G., 2001. Identification of a gene associated with Bt resistance in Heliothis virescens. *Science* 293, 857 –860.
53. Georghiou, G.P., 1990, Overview of insecticide resistance, in M.B. Green, H.M. LeBaron and W.K. Moberg (eds.), *Managing Resistance to Agrochemicals: From Fundamental Research to Practical Strategies*, American Chemical Society, Washington, D.C., pp. 18 – 41.
54. Glare, T. R., O'Callaghan, M., 1998. Environmental and Health Impacts of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *Report for the Ministry of Health, Biocontrol & Biodiversity, Grasslands Division, AgResearch, Lincoln*.
55. Glen, A., Espinoza, A.M., 2006. Characterization of a *Bacillus thuringiensis* strain collection isolated from diverse Costa Rican natural ecosystems. *Revista de biologia tropical*, 54 (1) : 13 – 27.
56. Goldberg, L.H., Margalit, J. 1977. A bacterial spore demonstratingrapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii, Uranotaenia unguiculata, Culex nuivitatus, Aedes aegypti* and *Culex pipiens. Mosquito.* 37, 355-358.
57. Grochulski P., Masson L., Borisova S., Pusztai-Carey M., Schwartz J.L., Brousseau R., M. Cygler, 1995. *Bacillus thuringiensis CrylA(a)* Insecticidal Toxin: Crystal Structure and Channel Formation. *Journal of Molecular Biology* 254, 447-464.
58. Hall I.M. and Arakawa K.Y, 1959. The susceptibility of the house fly, *Musca domestica L.* to *Bacillus thuringiensis* var *thuringiensis Berliner*. *Journal Insect Pathology* 1, 351-355.
59. Hassan, A., Muhanad, H., Emad, I., Hayat, M., 2010. Isolation and characterization of native *Bacillus thuringiensis* isolates from Syrian soil and testing of their insecticidal activities against some insect pests. Turkish *Journal of Agriculture* and Forestry 35, 421 – 431.

60. Henderson, C.F., Tilton, E.W., 1955. Tests with acaricides against the brow wheat mite. *Journal Economy Entomology* 48, 157 – 161.

61. Heimpel, A. M., Angus, T. A., 1958. The taxonomy of insect pathogens related to *Bacillus cereus* Frankland and Frankland. *Canadian Journal of microbiology 4,* 531 – 541.

62.Hendriks, M., S. Dukiandjiev, Maagd, R.A., 2001. *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin *cry1* hybrid proteins with increased activity against the Colorado potato beetle. *Applied and Environmental Microbiology*. 67 **:** 5328 – 5330.

63. Hernández, C. S., Ferré, J. 2005. Common receptor for *Bacillus thuringiensis* toxins *Cry1Ac, Cry1Fa,* and *Cry1Ja* in *Helicoverpa armigera*, *Helicoverpa* zea, and *Spodoptera exigua*. *Applied and Environmental Microbiology 71*, 5627 – 5629.

64. Herrero, S., Gonzalez, C.J., Ferrer, J., Bakker, P.L., de Maagd, R.A., 2004. Matations in the *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca toxin demonstrate the role of domains II and III in specificity towards *Spodoptera exigua* larvae. *Journal Biochemical* 384, 507 – 513.

65. Höfte, H., Whiteley, H. R. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis. Microbiological reviews 53,* 242-255.

66. Hoffmann, M.P, Frodshan, A.C, 1993. Natural enemies of vegetable insect pest. *Cooperative Extension, Cornell University, Ithaca*, NY, 63 pp.

67. Huffaker C. B., Messenger P. S., 1976. *Theory and practice of Biological Control*. Academic Press, Inc. (LONDON) LTD., 788 pp.

68. Iizuka, T., Ishikawa, S., Asano, S., Bando, H., Zheng, Z., and Murai, N., 1994. Insecticidal activity of the CrylA(a) and CryiB deltaendotoxin of *Bacillus thuringiensis* was related after the coding region of the gene was truncated and expressed in Escherichia coli. *Journal of Sericulture Science Japan* 63, 303 – 309.

69. Iriarte J, Bel Y, Ferrandis MD, Andrew R, Murillo J, Caballero P., 1998. Environmental distribution and diversity of Bacillus thuringiensis in Spain. *Applied of environmental microbiolology* 21, 97 – 106.

70. 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 Diamond-back Moth (*Plutella xylostella*). *Journal of Biological Sciences 13, 463-473.*

71. Joelma, S.S., Valéria, C.S.P, Eleilza, L.A., Ricardo, A.P., Wanderli, P.T., 2015. Isolation of *Bacillus thuringiensis* from the state of Amazonas, in Brazil and screening against *Aedes aegypti* (Diptera, Culcidae). *Revista Brasileria de Entomologia* 59, 1 – 6.

72. Jones, D.J., Karunakaran, V., Burges, H.D., Hacking, A.J., 1991. Ultraviolet resistant mutation of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Applied Bacteriology* 70 : 460 – 463.

73. Jurat-Fuentes J.L., M. J. Adang, 2004. Characterization of a Cry1Ac-receptor alkaline phosphatase in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. *European Journal of Biochemistry* 27,: 3127 – 3135.

74. Kati, H., Sezen, K., Nalcacioglu, R., Demirbag, Z., 2007. A highly pathogenic strain of *Bacillus thuringiensis* serovar *kurstaki* in lepidopteran pests. *Journal of Microbiology* 45: 553 – 557.

75. 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.

76. Kaelin, P., Morel, P., Gadani, F., 1994. Isolation of *Bacillus thuringiensis* from Stored Tobacco and *Lasioderma serricorne* (F.). Applied and Environmental Microbiology, 60 (1), 19 – 25.

77. Khedher, S.B., Jaoua, S., N. Zouari, 2013. Application of statistical experimental design for optimisation of bioinsecticides production by sporeless Bacillus thuringiensisstrain on cheap medium. *Brazilian Journal of Microbiology* 44, 927 - 933.

78. Khojand, S., Keshavarzi, M., Zagargi, K., Abdolahi, H., Rouzbeh, F. 2013. Presence of Multiple *cry* Genes in *Bacillus thuringiensis* Isolated from Dead Cotton Bollworm *Heliothis armigera. Journal Agriculture Scientic Technology*. 15, 1285 – 1292.

79. Kleinbaum, D.G., Klein, M., 2010. A Models Approach to Analyzing and Forecasting Oil and Piracy in the Gulf of Guinea. *Open Journal of Social Sciences*. 5.3.463 – 468.

80. Klier Andre, 2006. The use of *Bacillus thuringiensis* as an insecticide. Exloitation of Microfganisms, 19 – 49.

81. Knowles, B.H, 1994. Mechanism of action of *Bacillus thurigienesis* insecticidal delta-endotoxins. *Academic Press, London* 24, 275 - 308.

82. Koichi, Y., Ngo Dinh Binh, Kumiko, K., Akiko, U., Akira, O., Minoru M., Eiichi, M., Yong, M.Y., Michio, O., 2006. Occurrence of parasporin-producing *Bacillus thuringiensis* in Vietnam. *Canadian Journal of Microbiology*, 52 : 365 – 372.

83. Kris Firth, Perry Klassen, 1993. Bio control 93, Beating bugs with Bts. *America Vegetable growcer.*

84. Kunimi, Y., Yara, K., Iwahana, H., 1997. Comparative studies of growth characteristic and competitive ability in *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* in soil. *Applied Entomology and Zoology,* 32 : 625- 634.

85. Kunimi Yasuhisa, 2007. Current status and prospects on microbial control in Japan. *Journal of Invertebrate pathology*, 95 : 181 – 186.

86. Lambert, B., Buysse, L., Decock, C., Jansens, S., Piens, C., Saey B., and Peferoen, M., 1996. A *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein

with a high activity against members of the family Noctuidae. *Applied and Environmental Microbiology*, 62 : 80 – 86.

87. Le Thi Minh Thanh, Nguyen Thi Hue, Tran Duy Quy, Ngo Dinh Binh, 2012. Expression And Purification Of Cry8DA Recombinant Protein Against Colepteran Insects Of *Bacillus thuringiensis* In *E.coli, Tạp chí Khoa học và Công nghệ 50*, 309 – 317.
88. Lee D.W., Akao T., Yamashita S., Katayama H., Maeda M., Saitoh H., 2000. Noninsecticidal parasporal proteins of a *Bacillus thuringiensis* serovar shandongiensis isolate exhibit a preferential cytotoxicity against human leukemic T cells. *Biochem Biophys Res Commun* 272:218–223.
89. Lee, H.L., Seleena, P., 1991. Fermentation of a Malaysian *Bacillus thuringiensis* serotype H-14 isolate, a mosquito microbial control agent utilizing local wastes. *Southeast Asian Journal tropical medicine Public Health,* 22, 108 – 112.
90. Lee M.K., Walters F.S., Hart H., Palekar N., Chen, J.S., 2003. The mode of action of the *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A differs from that of *Cry1Ab* delta-endotoxin. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 46 – 57.
91. Leopoldo, P., Delia, M., Colin, B., Jesús, M., Primitivo, C., 2014. *Bacillus thuringiensis* Toxins: An Overview of Their Biocidal Activity. *Journal Toxin*, 6 : 3296 – 3325.
92. Lereclus, D., A. Delecluse, M. M. Lecadet. 1993. Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes. In: Entwistle, P. F., J. S. Cory, M. J. Bailey and S. Higgs, (Eds.), *Bacillus thuringiensis*, An Environmental Biopesticide: Theory and Practice, John Wiley and Sons Ltd., U. K., 37-69.
93. Liliana P.L., Mario, S., Alejandra, B., *2013. Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. *FEMS Microbiology Reviews*, 3–22.
94. Li E., Yousten A.A., 1975. Metalloprotease from *Bacillus thuringiensis. Journal* of *Applied Microbiology,* 30 : 354 – 361.

95. Li, G., Liu, X.Z., 2010. Sporulation of several biocontrol fungi as affected by carbon and nitrogen sources in a two-stage cultivation system. *The Journal of Microbiology* 48, 767 – 770.

96. Li, J., Carroll, J., Ellar, D.J., 1991. Crystal structure of insecticidal δ-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature* 353, 815 – 821.

97. Li, M., Shu, C., Ke, W., Li., X., Yu, Y., Guan, Xi., Huang, T., 2015. Plant polysaccharides modulate biofilm formation and insecticidal activities of *Bacillus thuringiensis* strains. *Frontiers in Microbiology*, 12 : 676146.

98. Li, Q., Xu, Z.L., Zou, T., Ai, P., Huang, H.G., Li, P., Zheng, P.A., 2021. Complete genome sequence of *Bacillus thuringiensis* strain HD521. *Standards in Genomic Sciences*, 10 : 62.

99. 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 Soilisolated of Sichuan Basin, China. *Brazilian Journal of Microbiology 42*, 140-146.

100. Lima-Perez, J., Lopez-Perez, M., Viniegra-Gonzalez, G., Loera, O., 2019. Solid-state fermentation of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD-73 maintains higher biomass and spore yields as compared to submerged fermentation using the same media. *Bioprocess and Biosystem engineering,* 42 (9), 1527 – 1535.

101. Liu, J., Yan, G., Shu, C., Zhao, C., Liu, C., Song, F., Zhou, L., Ma, J., Zhang, J. and Huang, D., 2010. Construction of a *Bacillus thuringiensis* engineered strain with high toxicity and broad pesticidal spectrum against coleopteran insects. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 87, 243 – 249.

102. 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* 27– 32.

103. Lord, J.C., 2005. From Metchnikoff to Monsanto and beyond: the path of microbial control nematophila. *Journal Invertebrate Patholology*, 89, 19 – 29.

104. Marenco, R.J., Foster, R.E. and Sanchez, C.A., 1992. Sweet Corn Response to Fall Armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) Damage during Vegetative Growth. *Journal of Economic Entomology* 85, 1285 – 1292.

105. Mark, M., Robert, M., Eitan Ben-Dov, Arieh, Z., Yoel, M., Ze'ev, B., 2001. Comparative sensitivity to UV-B radiation of two *B.thuringiensis s*ubspecies and Other *Bacillus* sp.. *Current Microbiology* 43, 140 – 143.

106. Martin, P., Travers, R.S., 1989. Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. *Applied of environmental microbiolology* 55, 2437 – 2442.

107. Mazid, S., Kalita, J.C., 2011. A review on the use of biopesticides in insect pest management. *International Journal of Science and Advanced Technology* 1, 169 – 178.

108. 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.

109. Mizuki E, Ohba M, Akao T, Yamashita S, Saitoh H, Park YS. 1999. Unique activity associated with non-insecticidal *Bacillus thuringiensis* parasporal inclusions: in vitro cell-killing action on human cancer cells. *Journal Applied Microbiology* 86 : 477 – 486.

110. Moataz A. M. Moustafa1, Mohammed A. Saleh2, Izat R. Ateya2 and Mohamed A. Kandil1, 2018. Influence of some environmental conditions on stability and activity of *Bacillus thuringiensis* formulations against the cotton leaf worm, *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae). *Egyptian Journal of Biological Pest Control* 28:61

111. Mohammad O., Mohammad S., Zaidi, K.A., 2013. Biosorption of heavy metals by *Bacillus thuringiensis* strain OSM29 originating from industrial

effluent contaminated north Indian soil. *Journal of Biological Sciences*, 121 – 129.

112. Nair, K., Roda, Al-Thani, Dhabia Al-Thani, Fatima Al-Yafei, Ahmed, T., Samir, J., 2018. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Qatar as shown by crystal morphology, δ-Endotoxins and Cry Gene Content. *Front Microbiol* 9, 1 – 10.

113. Navon, A., 2000. *Bacillus thuringiensis* insecticides in crop protection—reality and prospects. *Crop protection*, 19 (8-10), 669 – 676.

114. Nester, E.W., Thomashow, L.S., Metz, M., Gordon, M., 2002. 100 Years of *Bacillus thuringiensis*: a critical scientific assessment. *American Society for Microbiology* (ASM), Washington, USA.

115. 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*, 1940 – 1945.

116. Nguyễn Lân Dũng, Nguyễn Đình Quyến, Phạm Văn Ty. 2000. *Vi sinh vật học*. Nhà xuất bản Giáo dục Việt Nam.

117. Nguyễn Thị Hoài Hà, Ngô Giang Liên, 2003. *Tuyển chọn các chủng Bacillus thuringiensis có khả năng diệt sâu tơ và sâu xanh*. Tạp chí KHKT Nông nghiệp 4, 260 – 263.

118. Nguyễn Thiện Phú, Trần Thành Thủy, 2013. *Phân lập tuyển chọn chủng Bacillus thuringiensis từ rừng ngập mặn Cần Giờ có hoạt tính diệt sâu*. Tạp chí Khoa học Đại học Sư phạm TP.HCM 51, 49 – 58.

119. Nguyễn Xuân Cảnh, Nguyễn Ánh Nguyệt, Nguyễn Thanh Hạnh, Nguyễn Quỳnh Châu, Ngô Đình Bính. 2004. " Nghiên cứu sự đa dạng sinh học của vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* ở Việt Nam". Nhà xuất bản Khoa học kỹ thuật, 59 – 62.

120. Ngô Đình Bính 2005. *Giáo trình thuốc trừ sâu sinh học.* Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Hà Nội.

121. Ngô Đình Bính, 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 Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam

122. Ngô Giang Liên, Nguyên Thị Hoài Hà, 2003. *Tuyển chọn các chủng Bacillus thuringiensis có khả năng diệt sâu tơ và sâu xanh*. Tạp chí Khoa học Kĩ thuật Nông nghiệp, Tập 1, số 4/2003.

123. Oberemok, V.V., Laikova, K.V., Gninenko, Y.I., Zaitsev, A.S., Nyadar, P.M., Adeyemi, T. A., 2015. A short history of insecticides. *Journal of Plant Protection Research*, 55, 221 – 226.

124. Ofte, H.H., Whiteley, H.R., 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiological Reviews* 53, 242 – 255.

125. Oves, S., Shethna, Y.I., 2013. Spore and crystal formation in *Bacillus thuringiensis* during growth in cystine and cysteine. *Journal Bioscience*. 2, 321– 328.

126. Pan, X., Huang, T., Fang, Y., Rao, W., Guo, X., Nie, D., Zhang, D., Cao, F., Guan, X., Chen, Z., 2021. Effect of *Bacillus thuringiensis* biomass and insecticidal activity by cultivation with vegetable wastes. *Royal Society open science* 8 : 201564.

127. Patel K.D., Bhanshali F.C., Ingle, S.S., 2011. Diversity and characterization of *Bacillus thuringiensis* isolates from alluvial soil of Mahi River Basin, India. *Journal of Advances in Developmental Research* 2, 14 – 20.

128. Pardo L.L., Garay, M.C., Porta, H., Rodrıguez, A.C., Soberon, M., Bravo, A., 2009. Strategies to improve the insecticidal activity of Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. *Peptides*, 30, 589 – 595.

129. Phạm Thị Thuỳ, 2002. *Báo cáo hiệu quả diệt sâu hại cây trồng của bào tử nấm Beauveria bassiana*. Hội nghị sinh học quốc tế, Hà Nội.

130. Phạm Thị Thùy, 2008. *Nghiên cứu công nghệ sản xuất và sử dụng thuốc sâu sinh học (Bt, NPV, nấm Bb, Ma) thế hệ mới trừ sâu trong sản xuất rau an toàn*. Nhà xuất bản Nông nghiệp, 201 – 211.

131. Phạm Văn Ty và Vũ Nguyên Thành, 2007. *Công nghệ sinh học tập 5 Công nghệ vi sinh và môi trường*. Nhà xuất bản giáo dục.

132. Plackett, R.L., Burman, J.P., 1946. The design of optimum multifactorial experiments. *Biometrika*, 33 (4), 305 – 325.

133. Porcar, M., Grenier, A. M., Federici, B., Rahbe, Y., 2009. *Effects of Bacillus thuringiensis* δ-endotoxins on the pea aphid (*Acyrthosiphon pisum*). *Applied and Environmental Microbiology*, 75 : 4897 – 4900.

134. Pusztai, M., Fast, P., Gringorten, H., Kaplan, H., Lessard, T., Carey P.R., 1991. The mechanism of sunlight-mediated inactivation of *Bacillus thuringiensis* crystals. *Journal Biochemical* 273 : 43 - 47.

135. Rajalakshmi, S., Shethna, Y.I., 1980. Spore and crystal formation in *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* during growth in cystine and cysteine. *J. Biosci.* 2, 321 – 328.

136. Ramalakshmi A., Udayasuriyan V., 2010. Diversity of *Bacillus thuringiensis* isolated from western ghats of Tamil Nadu state, India. *Current microbiology* 61, 13-18.

137. Rampersad J., Ammons D., 2005. A *Bacillus thuringiensis* isolation method utilizing a novel stain, low selection and high throughput produced atypical results. *BMC Microbiology* 5: 1.

138. Rodriguea, G.A.P., Martinez, M.G., Barrera-Cortes, J., Ibarra, J.E., Bustos, F.M., 2015. Bio-insecticide *Bacillus thuringiensis* spores encapsulated with amaranth derivatized starches: studies on the propagation ‘‘*in vitro*”. *Bioprocess and Biosystem Engineering*, 38 (2), 329 – 339.

139. Roh, J.Y., Choi, J.Y., Li, M.S., Jin, B.R., Je, Y.H., 2007. “*Bacillus thuringiensis* as a specific, safe, and effective tool for insect pest control”. *Journal of microbiology and biotechnology* 17, 547 – 549.

140. Rouis, S., Chakroun, M., Saadaoui, I., Jaoua, S., 2007. Proteolysis, histopathological effects, and immunohistopathological localization of δ-endotoxins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in the midgut of lepidopteran olive tree pathogenic insect *Prays oleae*. *Molecular Biotechnology,* 35: 141–148.

141. Ruiu, L., Floris, I., Satta, A., Ellar, D.J., 2007. Toxicity of a *Brevibacillus laterosporus* Strain lacking parasporal crystals against *Musca domestica* and *Aedes aegypti. Biological Control*, 43, 136 – 143.

142. Saalma, H.S., Foda, M.S., Dulmage, H.T., Sharaby, E.L., 1983. Novel fermentation medium for production of delta endotoxin from *Bacillus thuringiensis*. *Journal Invertebrate Patholology,* 41, 8 – 19.

143. Salaman, H.S., Abd El-Ghany N.M., Saker M.M., 2015. Diversity of *Bacillus thuringiensis* isolates from Egyptian soils as shown by molecular characterization. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 13, 101–109.

144. Sanahuja, G., Raviraj B., Richard M. T., Teresa C.l, Paul C., 2011. *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. *Plant Biotechnology Journal* 9, 283 – 300.

145. Sara Olson, 2015. An analysis of the Biopesticde market now and where is it giong. *Outlooks on Pest Management*, 203 – 206.

146. Saxena, D., Ben-Dov, E., Manasherob, R., Barak, Z. E., Boussiba, S., Zaritsky, A., 2002. A UV tolerant mutant of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* producing melanin. *Current microbiology*, 44, 25-30.

147. 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, 423 - 430.

148. Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Dean, D. H., 1998. *Bacillus thuringiensis* and Its Pesticidal Crystal Proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews, 62*(3), 775-806.

149. Seifinejad, A., Salehi J.G.R., Hosseinzadeh A., Abdmishani C., 2008. Characterization of Lepidoptera-active *cry* and *vip* genes in Iranian *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Biological Control* 44, 216-226.

150. Setlow P., 1994. Mechanisms which contribute to the long-term survival of spores of *Bacillus* species. *Journal Applied Bacteriology,* 76:49–60

151. Shah, J.V., Yadav, R. and, Ingle, S.S., 2017. Engineered Cry1Ac-Cry9Aa hybrid *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin with improved insecticidal activity against *Helicoverpa armigera* . *Arch Microbiol* 199, 1069–1075.

152. Shahram, A., Mohammad, H. S., Ali A. P., Mahmuod, R. B., Mansureh, K., Mahdi, M., 2010. "Isolation and identification native *Bacillus thuringiensis* in different habitat from west Azerbaijan and evaluate effects on Indian moth plodia interpunctella (hubner) (Lepidoptera: pyralidae)", *Munis entomology and zoology* 5, 1034 – 1039.

153. Sharif, F.A., Alaeddinoĝlu, N.G., 1988. A rapid and simple method for staining of the crystal protein of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of industrial microbiology* 3, 227 – 229.

154. Siegh, S., Nikhil, R.K., Mairaj, R., Lakshmikanth, R., Rao, K.Y.S., Muralimohan, N., Arulprakash, T., Karthik, K., Shashibhushan, N.B., Vinutha, T., Debasis, P., Prasanta, K.D., Ananada, K.P., Rohini, S., 2018. Expression of *Cry2Aa*, a *Bacillus thuringiensis* insecticidal protein in transgenic pigeon pea confers reristance to gram pod boree, *Helicoverpa armigera*. *Scientific Reports* 8 : 8820, 1 – 12.

155. 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*, 583 – 599.

156. Smith, R.A., Coache, G.A. (1991) The phylloplane as a source of *Bacillus thuringiensis* variants. *Applied Environmental Microbiology,* 57, 311 – 331.

157. Saoussen, B. K,, Samir, J., Nabil, Z., 2013. Application of statistical experimental design for optimisation of bioinsecticides production by sporeless *Bacillus thuringiensis* strain on cheap medium. *Brazilian Journal of Microbiology* 44 (3) : 927 – 933.

158. Sousa, M.E.C, Santos, F.A.B., Teixeira, W.V., 2010. Histopathology and ultrastructure of midgut of *Alabama argillacea* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) fed Bt-cotton. *Journal of Insect Physiology* 56, 1913 – 1919.

159. Stanford, K., Harvey, A., Barbieri, R., Xu, S., Reuter, T., Amoaka, K.K., Selinger, L.B. and McAllister, T.A., 2015. Heat and desiccation are the predominant factor affecting inactivation of *Bacillus licheninformis and Bacillus thuringiensis* spores during simulated composting. *Jounal of Applied Microbiology* 120: 90 – 98.

160. Sun, H., Xiang, X., Li, Q., Lin, H., Wang, X., Sun, J., Luo, L., Zheng, A., 2021. Comparative genome analysis of *Bacillus thuringiensis* strain HD521 and HS18-1. *Scientific Reports* 11 : 16590.

161. Sun, Y., Park, H.W., 2010. Proteomic analysis of the crystal and spore mixture from *Bacillus thuringiensis* strains to search for novel mosquitocidal proteins. *Journal Plant Biotechnology*, 1 – 9.

162. Swamy, Khedher, S.B., Jaoua, S.N., 2011. Application of statistical experimental design for optimisation of bioinsecticides production by sporeless *Bacillus thuringiensis* strain on cheap medium. *Brazilian Journal of Microbiology* 44, 927 – 933.

163. Tabashnik, B.E., Dennehy, T.J., Sims, M.A., Larkin, K., Head, G.P., Moar, W.J., Carrière, Y., 2002. Control of resistant pink bollworm (*Pectinophora gossypiella*) by transgenic cotton that produces *Bacillus thuringiensis* toxin *Cry2Ab*. *Applied and environmental microbiology 68,* 3790 – 3794.

164. Tanada, Y., and Kaya, H.H, 1993. *Insect Pathology*. Academic Press.

165. Tinatin, D., Andreas, L,, Saykal, B., Christina, S., 2018. Biodiversity of Bacillus thuringiensis Strains and Their Cry Genes in Ecosystems of Kyrgyrstan. *Advances in Bioscience and Biotechnology* 9, 107– 126.

166. Tigue, N. J., Jacoby, J., Ellar, D. J., 2001. The α-Helix 4 Residue, Asn135, Is Involved in the Oligomerization of Cry1Ac1 and Cry1Ab5 *Bacillus thuringiensis* Toxins. *Applied and Environmental Microbiology*, 67 : 5715-5720.

167. Toumanoff, C., Vago, C., 1953. Etude histopathologique des vers a soie atteints de *Bacillus cereus* var. *alesti* for silkworm. *Annales de I'Institute Pasteur Paris*, 376 – 388.

168. Travers R.S., Martin P.A., Reichelderfer C.F. 1987. Selective process for efficient isolation of soil *Bacillus* spp.. *Applied and Environmental Microbiology* 53, 1263 – 1266.

169. Trần Văn Mão, 2008. *Sử dụng côn trùng và vi sinh vật tập 2*. Nhà xuất bản Nông nghiệp.

170. Uribe D, Martinez W, Ceron J., 2003. Distribution and diversity of cry genes in native strains of *Bacillus thuringiensis* obtained from different ecosystems from Colombia. *Journal of Invertebrate Pathology* 82, 119 – 127

171. Vasquez, M., Parra, C., Hubert, E., Espinoza, P., Theoduloz, C., Meza-Basso, L., 1995. Specificity and insecticidal activity of Chilean strains of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Invertebrate Pathology* 66, 143–148.

172. Vecht-Lifshitz, S.E., Braun, S., 1989. Fermentation broth of *Bacillus thuringiensis* as a source of precursors for production of nikkomycins. *Journal of Applied Microbiology*, 9 (2), 79.

173. Võ Thị Thứ, Nguyễn Kim Thoa, 2000. Đặc điểm phân loại của các chủng *Bacillus thuringiensis israelensis* phân lập ở Việt Nam. *Tạp chí Sinh học 22, 53 – 58.*

174. Xu, H., Wang, X., Chi, G., Tan, B., Wang, J., 2019. Effects of *Bacillus thuringiensis* genetic engineering on incluced voltile organic compounds emission in maize and the attractiveness to a parasitic wasp. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 7 : 160, 1 – 9.

175. Xue, Y., Nicholson, W.L., 1996. The two major spore DNA repair pathways, nucleotide excision repair and spore photoproduct lyase, are sufficient for the resistance of *Bacillus subtilis* spores to arti- ficial UV-C and UV-B but not to solar radiation. *Applied of environmental microbiolology* 62 : 2221 – 2227.

176. Yu X., Zheng A., Zhu J., Wang S., Wang L., Deng Q., & Li P., 2011. Characterization of vegetative insecticidal protein *vip* genes of *Bacillus thuringiensis* from Sichuan Basin in China. *Current Microbiology* 62, 752-757.

177. Zaidi, M.A., Mohammadi, M., Pstel, S., Masson, L., Altosaar, I., 2005. The Bt gene *cry2Aa2* driven by a tissue specific ST-LS1 promoter from potato effectively controls *Heliothis virescens. Associated with the International Society for Transgenic Technologies*, 289 – 298.

178. Zhang J.T., J.-P. Yan, D.-S. Zheng, Y.-J. Sun, Z.-M. Yuan, 2007. Expression of mel gene improves the UV resistance of Bacillus thuringiensis. *The Society for Applied Microbiology, Journal of Applied Microbiology* 105, 151 – 157.

179. Zhang J., Pan Z. Z., Xu L., Liu B., Chen Z., Li J., 2017. Proteolytic ac tivation of *Bacillus thuringiensis* Vip3Aa protein by *Spodoptera exigua* midgut protease. Int. *Journal Biology*. Macromol. 107, 1220–1226.

180. Zhaodong Liang, Hao Zhong, Yan Zhou, Youzhi Li, 2011. Identification of *Bacillus thuringiensis* Isolates Highly Toxic to *Plutella xylostella. Bt Research*, 1 – 8.

181. Zothansanga, L., Kumar N.S., Gurusubramanian, G. 2011. PCR pathotyping of native *Bacillus thuringiensis* from Mizoram, India. *Sciense Vision* 11:171-176

182. Zouari, N., Dhouib, A., Ellouz, R., Jaoua, S., 1998. Nutritional requirements of a strain of *Bacillus thuringiensis* subsp *kurstaki* and use of gruel hydrolysate, for the formulation of a new medium for delta-endotoxin production. *Applied Biochemical Biotechnology* 69, 41-52.

183. Zouari N, Achour O, Jaoua S., 2002. Production of delta-endo-toxin by *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and over-come of catabolite repression, by using highly concentrated gruel and fish meal media in 2 and 20 l fermenters. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 77, 877-82.

184. Wang, J., Boets, A., Van Rie, J., Ren, G., 2003. Characterization of *cry1, cry2,* and *cry9* genes in *Bacillus thuringiensis* isolates from China. *Journal of Invertebrate Pathology 82,* 63 – 71.

185. Wellman-Desbiens, E., Cote, J.C., 2005. Development of a *Bacillus thuringiensis*-based assay on *Lygus hesperus. Journal of Economic Entomology* 98, 1469 – 1479.

186. Wojciechowska, J.A., Lewitin, E., Revina, L.P., Zalunin, I.A., Chestukhina, G.G., 1999. Two novel delta-endotoxin gene families *cry26* and *cry28* from *Bacillus thuringiensis* ssp. *finitimus*. FEBS Lett 453: 46–48.

187. < www.atcc.org/~/media/70BDA34940D548198A83655E2CF69BC5.ashx>

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ

Các bài báo khoa học

Dương Kim Hà, Trương Phước Thiên Hoàng, Châu Thanh Phong, Trần Thị Mộng Xinh, Trần Thị Anh Thương, Phạm Nhật Quỳnh, Trần Thị Hồng Nhung, Đoàn Thị Thùy Linh và Lê Đình Đôn, 2017. Phân Lập và đánh giá độc tính đối với côn trùng gây hại của *Bacillus thuringiensis* phân lập từ mẫu đất. *Tạp chí Bảo vệ thực vật.* 6: 23 – 27, (ISSN 2354 – 0710).

Trương Phước Thiên Hoàng, **Dương Kim Hà**, Tôn Bảo Linh, Lê Đình Đôn Trần Thị Hồng Nhung, Đặng Thị Thủy và Huỳnh Nguyễn Chí Linh, 2019. Xác định gen cry2 trong mẫu vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* phân lập tại các tỉnh thành khu vực miền nam Việt Nam. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển, 1*8(1): 106 – 116. (pISSN 2615 – 9503, eISSN 2615 – 949X)

Dương Kim Hà, Trương Phước Thiên Hoàng, Trần Thị Kim Oanh, Trần Thị Hồng Nhung và Lê Đình Đôn, 2019. Xác định gen Vip3A trong vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* bằng kỹ thuật sinh học phân tử và độc tính gây bệnh đối với côn trùng gây hại. *Tạp chí Bảo vệ thực vật,* 4 : 33 – 38. (ISSN 2354 – 0710)

Dương Kim Hà, Trương Phước Thiên Hoàng, Lê Hoàng Phúc, Nguyễn Khoa Thảo, Nguyễn Vũ Phong và Lê Đình Đôn, 2021. Chọn dòng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* kháng UV có khả năng diệt sâu tơ. *Tạp chí Bảo vệ thực vật,* (ISSN 2354 – 0710).

Dương Kim Hà, Trương Phước Thiên Hoàng, Đổng Hắc Thanh Thi, Nguyễn Thị Lệ Thương, Võ Thí Thúy Huệ, Nguyễn Vũ Phong, Lê Đình Đôn. 2021. Tối ưu hóa điều kiện lên men tăng sinh vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* phân lập ở Việt Nam bằng phương pháp đáp ứng bề mặt. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ.*

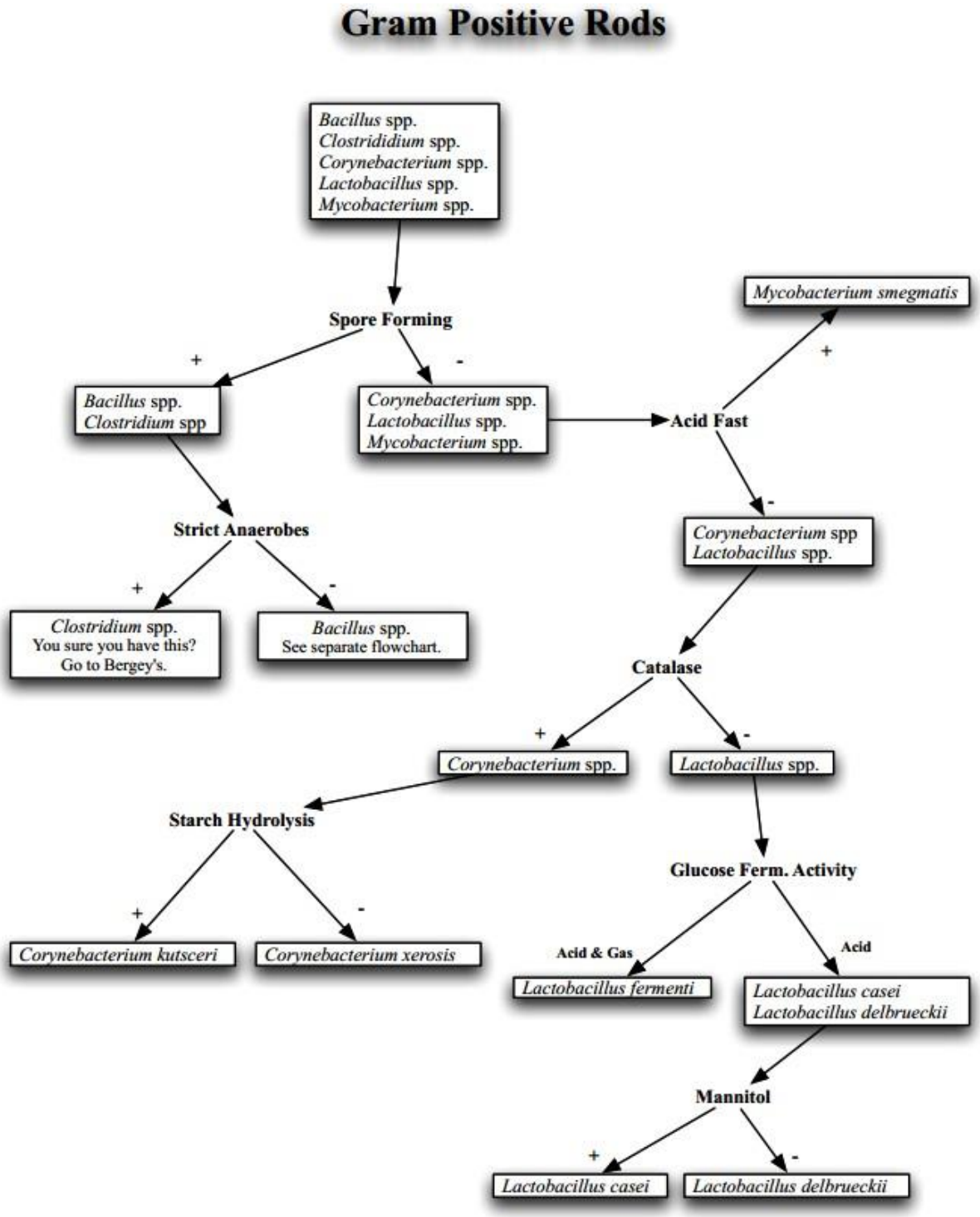
Bài Hội thảo

Duong Kim Ha, Ton Bao Linh, Truong Phuoc Thien Hoang, Tran Thi Kim Oanh, Nguyen Bao Quoc and Le Dinh Don, 2018. Generation gene toxic of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* by PCR and SDS-PAGE method (Poster). 1st INDO – ASEAN Conference on Innovative Approaches in Applied Sciences and Technologies. The Journal of Agriculture and Development**.**

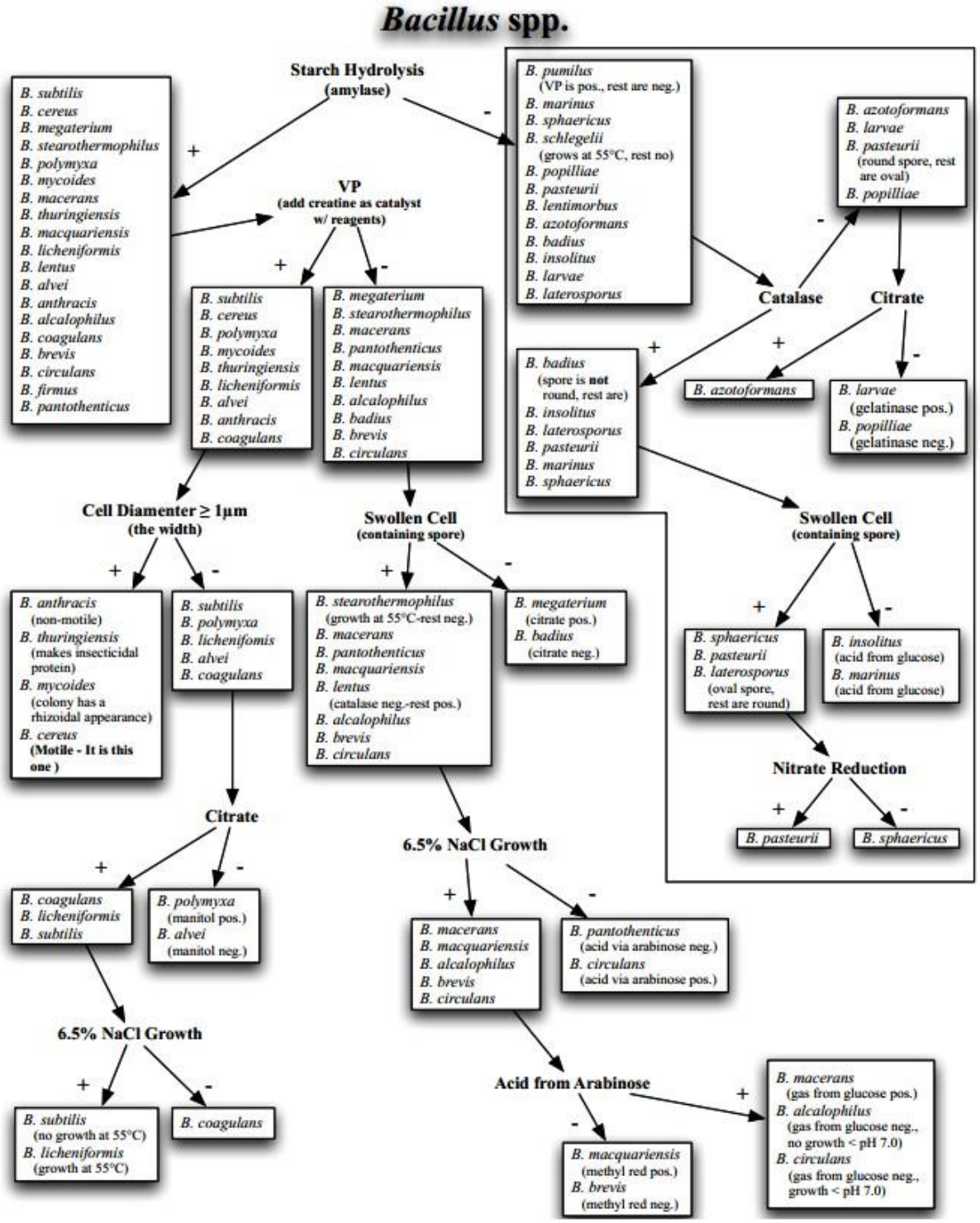
Dương Kim Hà, Trần Thị Kim Oanh, Trần Thị Hồng Nhung, Trương Phước Thiên Hoàng, Nguyễn Bảo Quốc và Lê Đình Đôn, 2019. Xác định mẫu *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* có hoạt tính sinh học dựa vào VIP3A. Hội thảo Quốc gia bệnh hại thực vật Việt Nam. *Nhà Xuất bản Nông nghiệp*, 43 – 48. ISBN 978-604-60-2664-8.

PHỤ LỤC 1.

Sơ đồ phản ứng sinh hóa định danh vi khuẩn của Bergey



Sơ đồ phân loại vi khuẩn *Bacillus* spp.



LY TRÍCH DNA

Bước 1: Hút 1000 µl dịch vi khuẩn từ bình tăng sinh cho vào tube 1.5 ml, sau đó ly tâm 8000 vòng/phút trong 3 phút. Lặp lại thao tác cho đến khi thu được nhiều sinh khối;

Bước 2: Thêm 300 µl TE buffer (Tris 10 mM, EDTA 1 mM) rồi vortex đều. Đem đun cách thủy ở 100ºC từ 10 đến 20 phút, ủ đá trong 5 phút. Ly tâm 13,000 vòng/phút trong 5 phút;

Bước 3: Hút 200 µl dịch nổi cho vào tube mới, sau đó cho vào 20 µl CH_3COONa, 600 µl ethanol 70%. Ủ -20ºC từ 1 – 2 giờ, đem ly tâm 13,000 vòng/ phút trong 5 phút;

Bước 4: Loại dịch nổi, để khô tự nhiên, thêm 30 µl TE buffer và bảo quản ở nhiệt độ -20ºC.

THIẾT BỊ VÀ DỤNG CỤ THỰC HIỆN THÍ NGHIỆM

Thiết bị bao gồm máy lắc, tủ ấm, tủ lạnh, bể ổn nhiệt, nồi hấp khử trùng, tủ cấy vi sinh, lò vi sóng, kính hiển vi, cân điện tử, bếp điện từ, máy PCR, máy điện di, máy vortex, máy chụp gel, máy li tâm, máy đo pH, tủ sấy.

Dụng cụ thí nghiệm bao gồm đĩa petri, ống nghiệm, ống đong, pipet thủy tinh, que cấy trải, que cấy ria, bông gòn, đèn cồn, lame, lamel, Micropipiet, ống Efpendoft, đầu tuýp, cốc thủy tinh, bình thủy tinh, ống Falcon, giấy lọc.

THUỐC TRỪ SÂU Vi-Bt® 32000WP

Thuốc trừ sâu Vi-Bt®32000WP được sản xuất và phân phối bởi Công ty cổ phần thuốc sát trùng Việt Nam (VIPESCO). Là thuốc trừ sâu sinh học, có tính chọn lọc cao, diệt toàn bộ sâu ăn lá, thích hợp cho chương trình sản xuất rau sạch và chương trình phòng trừ tổng hợp.

Tên thương mại: Vi-Bt®32000WP

Thành phần: *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* 32000 UI/mg.

Tác động của thuốc: Tác động vị độc

Nhóm độc: Nhóm 3

Mức độ độc: Không độc với cá, ít độc với ong

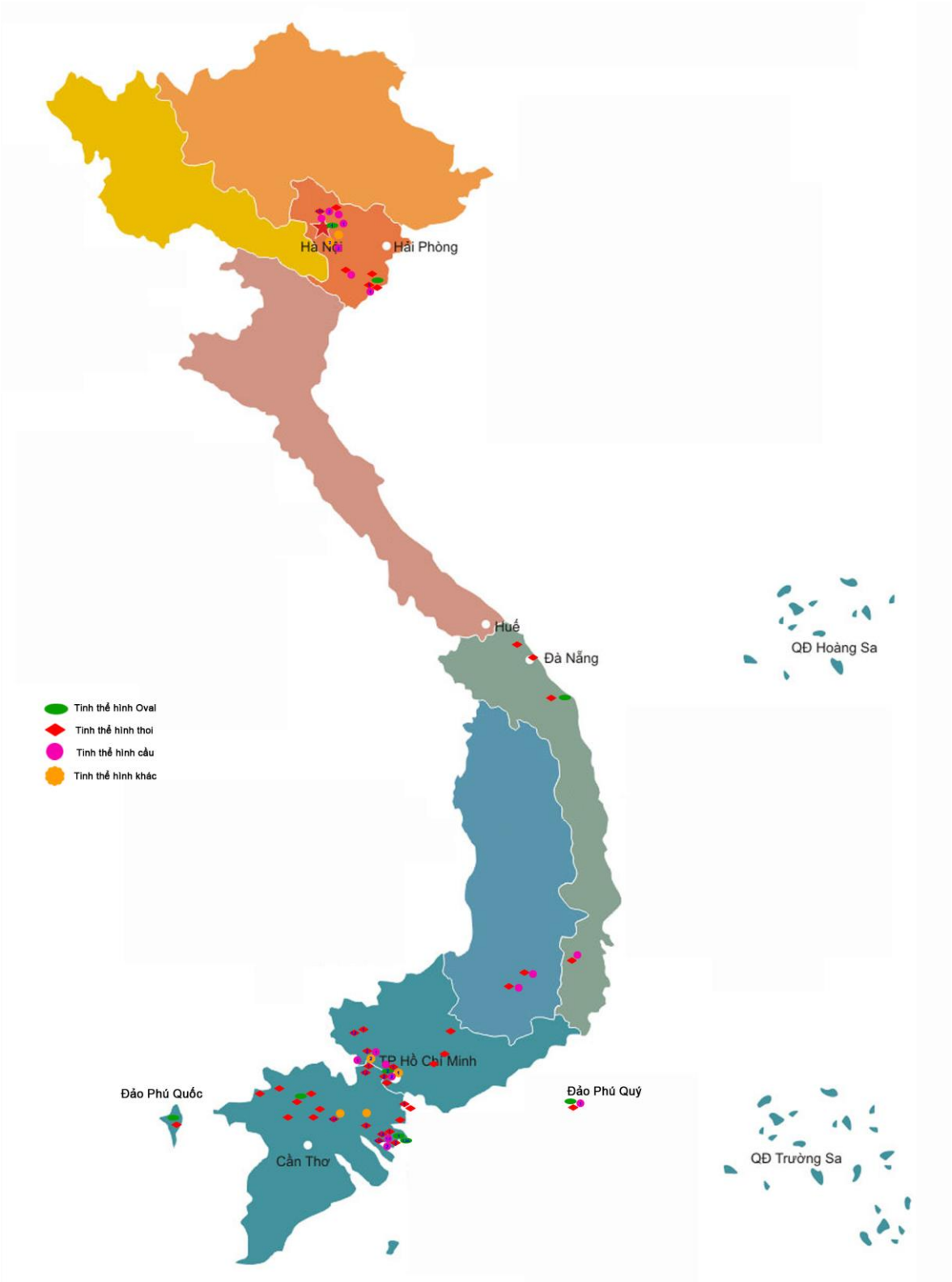
Liều lượng sử dụng: 0,5 – 1 kg/ha pha với 400 lít nước

Cách dùng: Phun kỹ, ướt đều cây trồng

Thời gian cách ly: 5 ngày

Khả năng hỗn hợp: Không hỗn hợp với thuốc có tính kiềm

Cơ chế tác động: Sau khi hòa tan trong dịch ruột giữa, tinh thể protein do *Bacillus thuringiensis* tạo ra sẽ chuyển hóa thành chất độc phá hủy tế bào; côn trùng ngừng ăn, bị đói, bị bệnh và chết sau vài ngày.



Hình 1. Sự phân bố của gen *cry1, cry2, cry4, cry9* và *vip3a* của vi khuẩn *Bacillus thuringiensis var. kurstaki* ở một số tỉnh, thành Việt Nam.

Bảng 1. Đặc điểm khuẩn lạc, tinh thể và gen độc của các chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis*

Số TT	Chủng vi khuẩn	Tỉnh	Đặc điểm khuẩn lạc	Tinh thể	Gen *cry, vip3a*
1	VBt246.1	Hà Nội	Trắng, hình tròn, bề mặt nhăn, viền gợn sóng	Ovan, cầu	*cry1, cry4*
2	VBt2413.1	Hà Nội	Trắng, viền phân thùy, bám chặt vào môi trường	Cầu, quả trám	*cry1, cry2*
3	VBt2119.1	Vĩnh Phúc	Tròn, màu trắng sữa, bề mặt sần sùi, viền nguyên, hơi mờ và mọc lan ra môi trường	Thoi, ovan	*cry1, cry2, vip3a*
4	VBt21110.1	Vĩnh Phúc	Tròn, màu trắng sữa, bề mặt sần sùi, viền nguyên, hơi mờ và mọc lan ra môi trường	Thoi, ovan	*cry1, cry2, vip3a*
5	VBt25211.1	Bình Thuận	Tròn, màu trắng sữa, bề mặt sần sùi, viền nguyên, hơi mờ và mọc lan ra môi trường	Cầu	*cry1, cry2*
6	VBt281.3	TP.HCM	Trắng sữa, hình tròn, nhô lên, nhầy, viền nhẵn	Thoi	*cry1*
7	VBt283.2	TP.HCM	Trắng, viền phân thùy, bám chặt vào môi trường	Thoi	*cry1*
8	VBt2847	TP.HCM	Trắng, dạng bất định, viền nhăn,trong lõm	Thoi	*cry1, cry2*
9	VBt2639.5	Lâm Đồng	Trắng sữa, tròn, khô, viền răng cưa,	Cầu	*cry1, cry9*
10	VBt26317.2	Lâm Đồng	Trắng sữa, viền nhăn, bề mặt khô, nhô lên	Quả trám	*cry1, cry2*
11	VBt26310.1	Lâm Đồng	Trắng kem, tròn, khô, bề mặt nhô lên	Thoi	*cry4*
12	VBt2736.2	Tiền Giang	Tròn, trắng sữa, viền nhăn, bề mặt ướt, nhô lên	Thoi	*cry1, cry2, vip3a*
13	VBt27310	Tiền Giang	Dạng bất định, trắng, viền phân thùy, bề mặt khô	Thoi	*cry2*
14	VBt2735.1	Tiền Giang	Trắng sữa, dạng bất định, viền nhăn, bề mặt phẳng	Thoi	*cry1, cry2, vip3a*
15	VBt2751	Bến Tre	Tròn, màu trắng sữa, bề mặt phẳng, khô, có viền nhăn răng cưa, chấm nhỏ ở tâm	Thoi	*cry1, cry2*

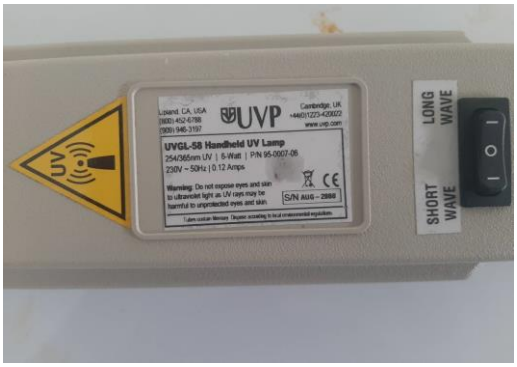
16	VBt2752.2	Bến Tre	Tròn, trắng sữa, bề mặt khô nhầy,có chấm nhỏ trắng ở tâm	Thoi, cầu	*cry1, cry2, cry4*
17	VBt27510	Bến Tre	Trắng, bất định, viền phân thùy, bề mặt phẳng, khô	Thoi, ovan	*cry1, vip3a*
18	VBt2762.1	Tây Ninh	Trắng, nhô, nhám	Thoi	*cry1, cry2*
19	VBt2767.6	Tây Ninh	Trắng, thô, bề mặt hình răng cưa	Thoi	*cry1, cry2*
20	VBt27611	Tây Ninh	Trắng, hình tròn, viền mờ lan ra xung quanh	Thoi	*cry1, cry2*

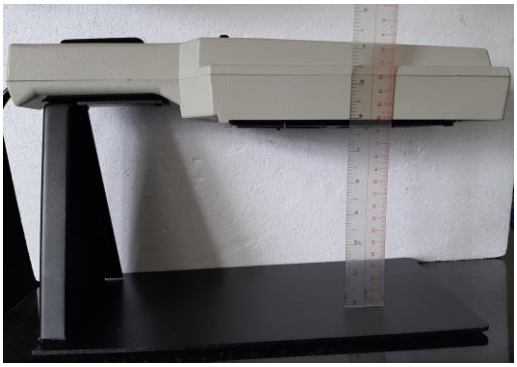
Hình 2. Thu thập mẫu đất ở các khu vực đất nông nghiệp, phi nông nghiệp, đất rừng, ven sông tại các tỉnh, thành Việt Nam.

Hình 3. Thu thập mẫu đất ở các khu vực đất canh tác, đất không canh tác tại một số tỉnh, thành Việt Nam.

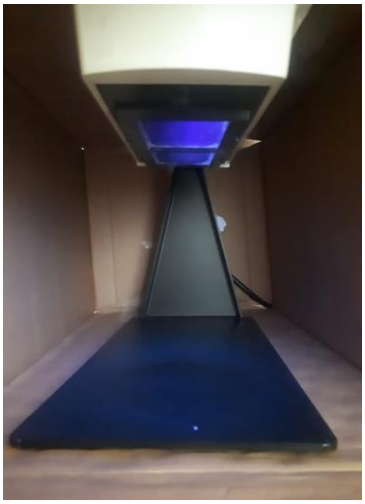
Hình 4. Nhân nuôi sâu tơ, sâu khoang, sâu xanh da láng và trồng cải phục vụ thí nghiệm sinh học tại nhà lưới Viện Nghiên cứu Công nghệ sinh học và Môi trường, Trung tâm Giống cây trồng, vật nuôi và thủy sản TP.HCM

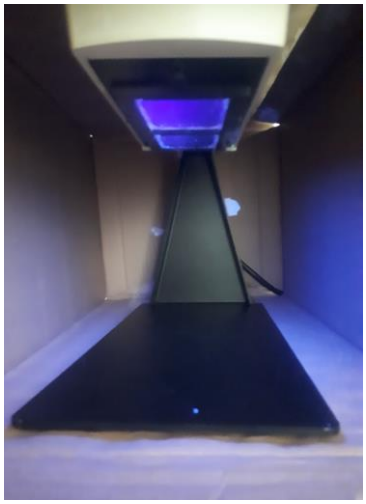
Hình 5. Máy lắc lên men thông thường và máy lên men tự động tại Viện Nghiên cứu công nghệ sinh học và môi trường





Thông số kỹ thuật của đèn chiếu UV Chiều cao của đèn chiếu UV

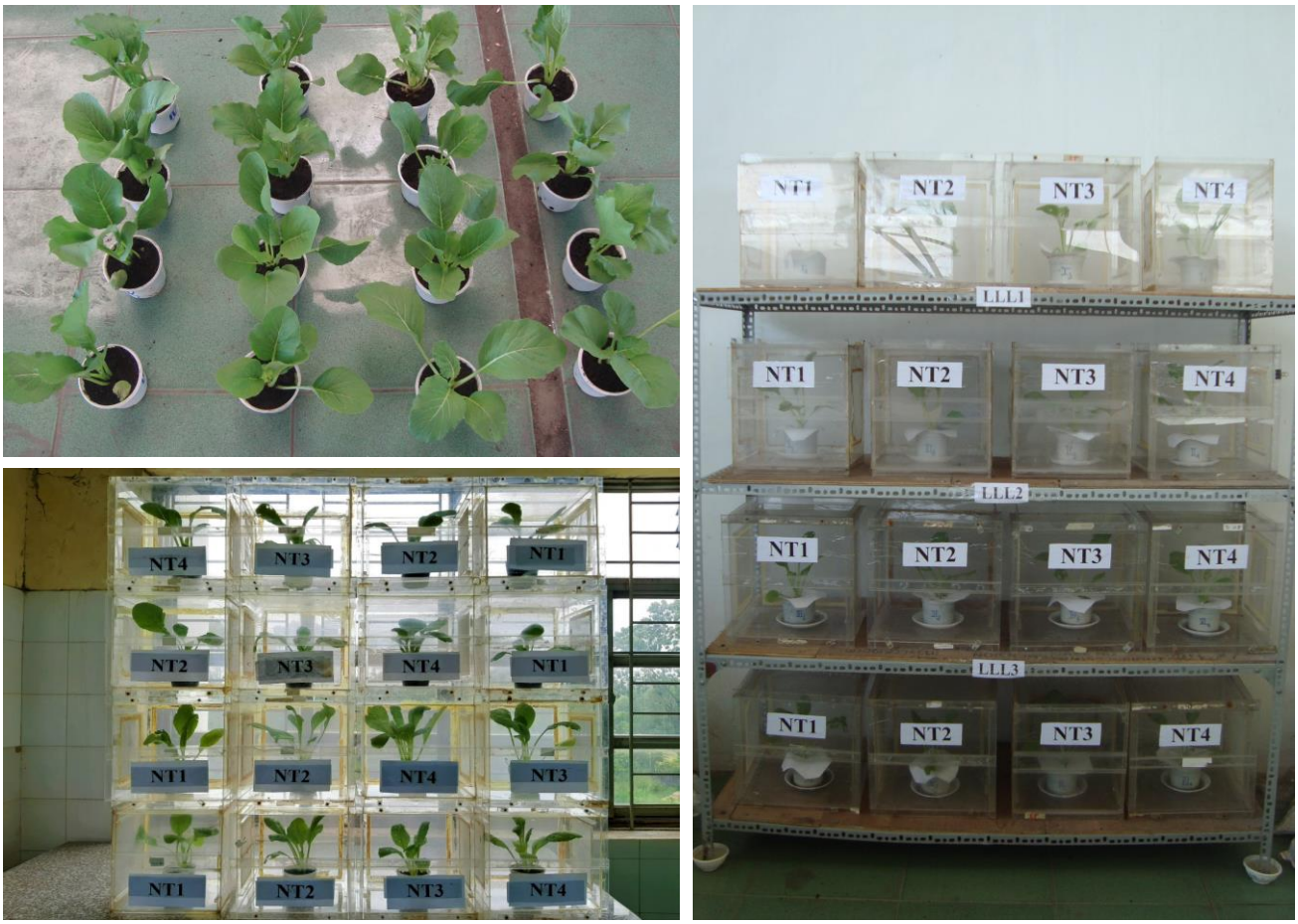




Đèn UV ở bước sóng 254 nm Đèn UV ở bước sóng 365 nm

Hình 6. Đèn chiếu tia UV ở bước sóng 254 và 365 nm

Hình 7. Bố trí thí nghiệm chiếu tia UV ở các bước sóng 254 nm và 365 nm



Hình 8. Bố trí thí nghiệm đánh giá hiệu quả các dòng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* trong điều kiện phòng thí nghiệm

Hình 9. Sự khác biệt giữa các nghiệm thức phun chế phẩm vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* so với đối chứng (I_1) trên sâu tơ.

Hình 10. Thí nghiệm kết hợp hai dòng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* ở các nồng độ khác nhau.

(A) NT 1 (10^7 CFU/mL), (B) NT 2 (10^8 CFU/mL), (C) NT3 (10^9 CFU/mL) và (D)

Hình 11. Thí nghiệm đánh giá hiệu quả của các dòng vi khuẩn trong điều kiện nhà lưới Viện Nghiên cứu Công nghệ sinh học và Môi trường

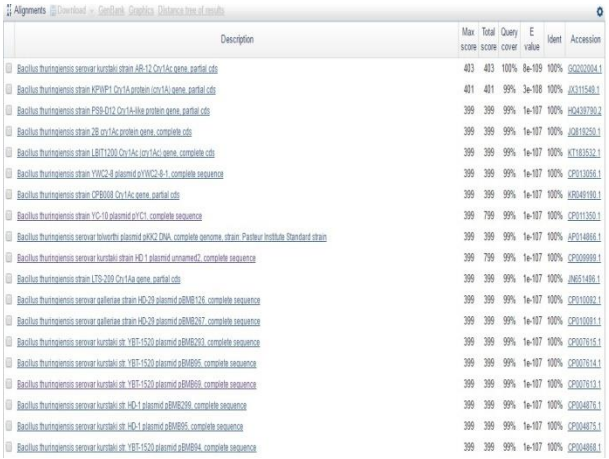
Hình 12. Thí nghiệm đánh giá hiệu quả của chế phẩm VBt trong nhà lưới và ngoài đồng tại Trung tâm Giống cây trồng, vật nuôi và thủy sản

PHỤ LỤC 2.

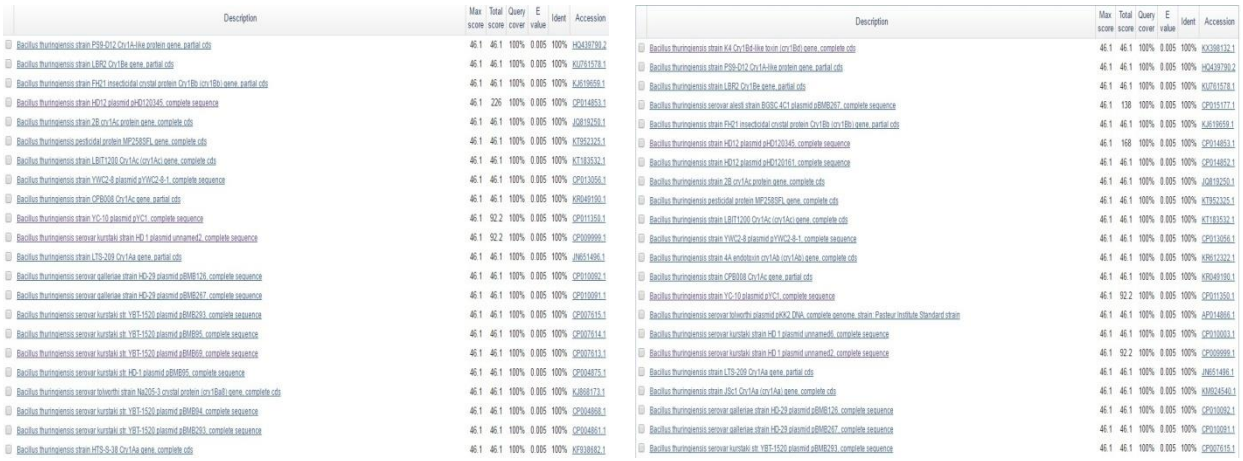
GIẢI TRÌNH TỰ CÁC GEN *cry1, cry2, cry4* và *cry9*

Ký hiệu số GeneBank 18 trình tự gen *Cry1* của chủng *Bacillus thuringiensis* trên ngân hàng gen NCBI (kết quả lấy từ bài báo khoa học chọn cặp mồi)

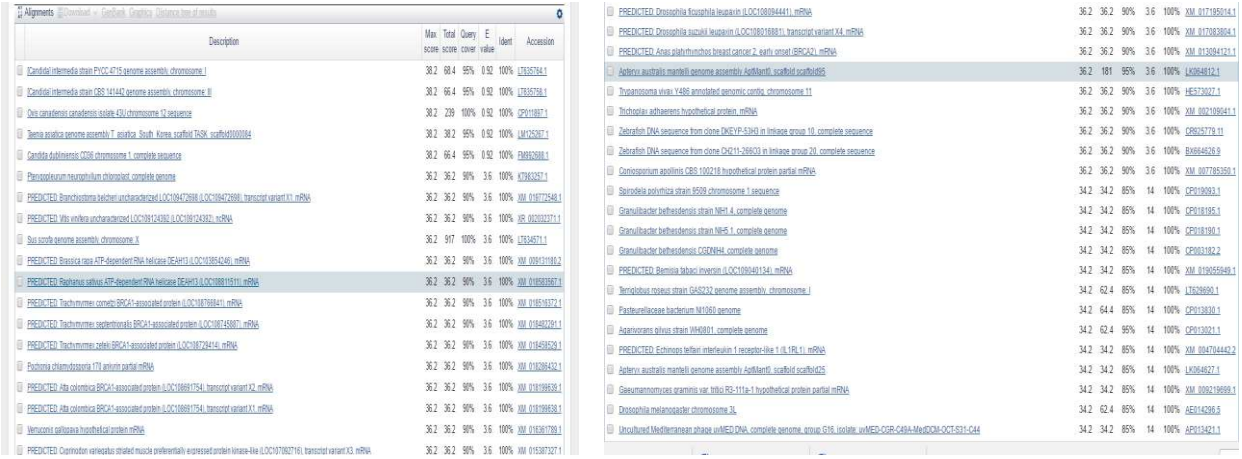
Gene nomenclature		GenBank accession no.	Nucleotide positions hybridized to primers[b]	Mismatch of primers[c]	Product size (bp)
Current	Original				
cry1Aa5	*cryIA(a)*	D17518	2858–2880, 3112–3134	0(d), 0(r)	277
cry1Ab9	*cryIA(b)*	X54939	2775–2797, 3029–3051	1(d), 0(r)	277
cry1Ac5	*cryIA(c)*	M73248	2781–2803, 3035–3057	0(d), 0(r)	277
cry1Ad	*cryIA(d)*	M73250	2778–2800, 3032–3054	1(d), 10(r)	277
cry1Ae	*cryIA(e)*	M65252	2861–2883, 3115–3137	11(d), 0(r)	277
cry1Ba	*cryIB*	X06711	2919–2941, 3170–3192	0(d), 0(r)	274
cry1Bb	*cryI ET5*	L32020	3000–3022, 3251–3273	0(d), 0(r)	274
cry1Da	*cryID*	X54160	2996–3018, 3250–3272	1(d), 16(r)	277
cry1Db	*prtB*	Z22511	2973–2995, 3227–3249	0(d), 0(r)	277
cry1Ea3	*cryIE*	M73252	2760–2782, 3014–3036	1(d), 0(r)	277
cry1Eb	*cryIE(b)*	M73253	2754–2776, 3008–3030	1, 21(d); 0(r)	277
cry1Fa2	*cryIF*	M73254	2760–2782, 3014–3036	0(d), 0(r)	277
cry1Fb	*prtD*	Z22512	3239–3261, 3493–3515	1(d), 0(r)	277
cry1G	*prtA*	Z22510	2802–2824, 3056–3078	1(d), 0(r)	277
cry1H	*prtC*	Z22513	3283–3305, 3537–3559	0(d), 0(r)	277
cry1Hb		U35780	3472–3494, 3726–3748	0(d), 7(r)	277
cry1Ia	*cryI ET4*	L32019	2840–2862, 3091–3113	1(d); 7, 10, 15(r)	274
cry1K		U28801	3318–3340, 3569–3591	1, 4, 7, 12(d); 0(r)	274



Hình 14. Tìm kiếm các trình tự gen tương đồng với sản phẩm của chủng Bt đối chứng dương theo primer



Hình 15. Kết quả BLAST trình tự primer của gene *Cry1* trên NCBI

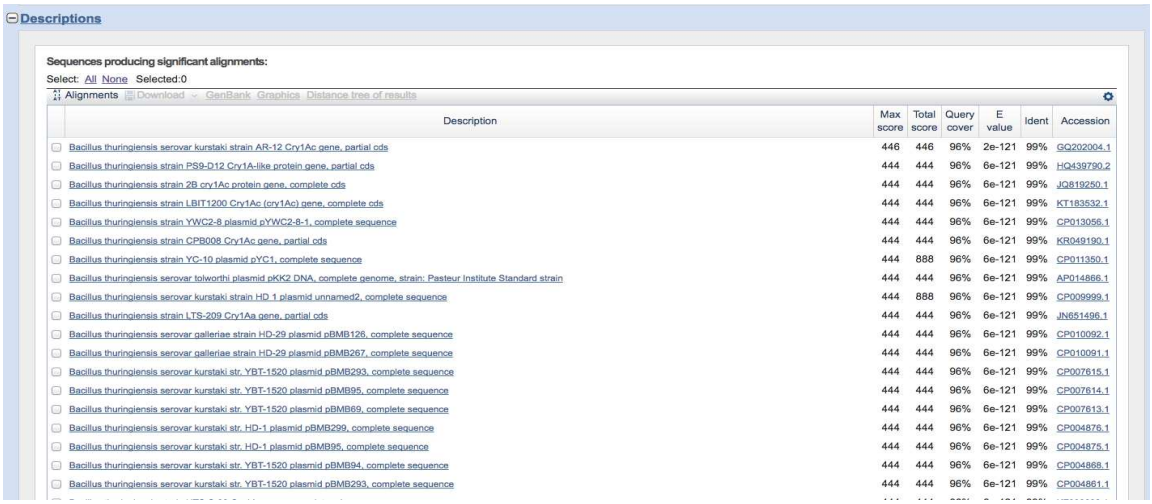


Hình 16. Kết quả kiểm tra mức độ đặc hiệu của các cặp primer dùng để phát hiện gen *cry2* và khả năng bắt cặp đặc hiệu của primer *cry2*-f sử dụng công cụ BLAST

Kết quả giải trình tự các mẫu sản phẩm PCR

1. Mẫu vi khuẩn VBt2754.1

TTGGCTCTACATTCGAGAGCTTATCTGCCTGAGCTGTCTGTGATTCCGGGTG
TCAATGCGGCTATTTTTGAAGAATTAGAAGGGCGTATTTTCACTGCATTCTC
CCTATATGATGCGAGAAATGTCATTAAAAATGGTGATTTTAATAATGGCTT
ATCCTGCTGGAACGTGAAAGGGCATGTAGATGTAGAAGAACAAAACAACC
AACGTTCGGTCCTTGTTGTTCCGGAATGGGAAGCAGAAGTGTCACAAA



Descriptions

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Bacillus thuringiensis serovar kurstaki strain AR-12 Cry1Ac gene, partial cds	446	446	96%	2e-121	99%	GQ202004.1
Bacillus thuringiensis strain PS9-D12 Cry1A-like protein gene, partial cds	444	444	96%	6e-121	99%	HQ439790.2
Bacillus thuringiensis strain 2B cry1Ac protein gene, complete cds	444	444	96%	6e-121	99%	JQ819250.1
Bacillus thuringiensis strain LBIT1200 Cry1Ac (cry1Ac) gene, complete cds	444	444	96%	6e-121	99%	KT183532.1
Bacillus thuringiensis strain YWC2-8 plasmid pYWC2-8-1, complete sequence	444	444	96%	6e-121	99%	CP013056.1
Bacillus thuringiensis strain CPB008 Cry1Ac gene, partial cds	444	444	96%	6e-121	99%	KR049190.1
Bacillus thuringiensis strain YC-10 plasmid pYC1, complete sequence	444	888	96%	6e-121	99%	CP011350.1
Bacillus thuringiensis serovar tolworthi plasmid pKK2 DNA, complete genome, strain: Pasteur Institute Standard strain	444	444	96%	6e-121	99%	AP014866.1
Bacillus thuringiensis serovar kurstaki strain HD 1 plasmid unnamed2, complete sequence	444	888	96%	6e-121	99%	CP009999.1
Bacillus thuringiensis strain LTS-209 Cry1Aa gene, partial cds	444	444	96%	6e-121	99%	JN651496.1
Bacillus thuringiensis serovar galleriae strain HD-29 plasmid pBMB126, complete sequence	444	444	96%	6e-121	99%	CP010092.1
Bacillus thuringiensis serovar galleriae strain HD-29 plasmid pBMB267, complete sequence	444	444	96%	6e-121	99%	CP010091.1
Bacillus thuringiensis serovar kurstaki str. YBT-1520 plasmid pBMB293, complete sequence	444	444	96%	6e-121	99%	CP007615.1
Bacillus thuringiensis serovar kurstaki str. YBT-1520 plasmid pBMB95, complete sequence	444	444	96%	6e-121	99%	CP007614.1
Bacillus thuringiensis serovar kurstaki str. YBT-1520 plasmid pBMB69, complete sequence	444	444	96%	6e-121	99%	CP007613.1
Bacillus thuringiensis serovar kurstaki str. HD-1 plasmid pBMB299, complete sequence	444	444	96%	6e-121	99%	CP004876.1
Bacillus thuringiensis serovar kurstaki str. HD-1 plasmid pBMB95, complete sequence	444	444	96%	6e-121	99%	CP004875.1
Bacillus thuringiensis serovar kurstaki str. YBT-1520 plasmid pBMB94, complete sequence	444	444	96%	6e-121	99%	CP004868.1
Bacillus thuringiensis serovar kurstaki str. YBT-1520 plasmid pBMB293, complete sequence	444	444	96%	6e-121	99%	CP004861.1

2.Mẫu vi khuẩnVBt2735.2

GAGCTTATCTGCCTGAGCTGTCTGTGATTCCGGGTGTCAATGCGGCTATTTT
TGAAGAATTAGAAGGGCGTATTTTCACTGCATTCTCCCTATATGATGCGAG
AAATGTCATTAAAAATGGTGATTTTAATAATGGCTTATCCTGCTGGAACGT
GAAAGGGCATGTAGATGTAGAAGAACAAAACAACCACCGTTCGGTCCTTG
TTGTTCCGGATTGGGAA

Descriptions

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Bacillus thuringiensis strain ATCC 10792 plasmid poh4, complete sequence	403	403	95%	9e-109	99%	CP021065.1
Bacillus thuringiensis serovar kurstaki strain HD 1 plasmid unnamed6, complete sequence	403	403	95%	9e-109	99%	CP010003.1
Bacillus thuringiensis strain JSc1 Cry1Aa (cry1Aa) gene, complete cds	403	403	95%	9e-109	99%	KM924540.1
Bacillus thuringiensis serovar kurstaki str. HD-1 plasmid pBMB65, complete sequence	403	403	95%	9e-109	99%	CP004873.1
Bacillus thuringiensis strain JSc1 Cry1 (cry1) gene, partial cds	403	403	95%	9e-109	99%	KF741361.1
Bacillus thuringiensis strain N32-2-2 Cry1A-like protein gene, partial cds	403	403	95%	9e-109	99%	HQ439777.1
Bacillus thuringiensis serovar thuringiensis str. IS5056 plasmid pIS56-63, complete sequence	403	403	95%	9e-109	99%	CP004131.1
Bacillus thuringiensis strain SK-784 plasmid Cry toxin (cry) gene, complete cds	403	403	95%	9e-109	99%	JF340157.1
Bacillus thuringiensis strain SSy111-c clone HA11 delta-endotoxin (cry1A) gene, complete cds	403	403	95%	9e-109	99%	JN135254.1
Bacillus thuringiensis strain SSy126-c clone HA9 delta-endotoxin (cry1A) gene, complete cds	403	403	95%	9e-109	99%	JN135253.1
Bacillus thuringiensis strain SSy126-c clone HA7 delta-endotoxin (cry1A) gene, complete cds	403	403	95%	9e-109	99%	JN135252.1
Bacillus thuringiensis strain SSy141-c clone HA6 delta-endotoxin (cry1A) gene, complete cds	403	403	95%	9e-109	99%	JN135251.1
Bacillus thuringiensis strain SSy125-c clone HA2 delta-endotoxin-like (cry1A) gene, complete sequence	403	403	95%	9e-109	99%	JN135250.1
Bacillus thuringiensis HD-771 plasmid p03, complete sequence	403	403	95%	9e-109	99%	CP003755.1
Bacillus thuringiensis strain FB Cry1Ab (cry1Ab) gene, partial cds	403	403	95%	9e-109	99%	JN226102.1
Bacillus thuringiensis strain LS-R-30 Cry1Ab gene, partial cds	403	403	95%	9e-109	99%	HQ685122.1
Bacillus thuringiensis serovar kurstaki strain DOR BT-1 delta-endotoxin Cry1Ab (cry1Ab) gene, complete cds	403	403	95%	9e-109	99%	HQ847729.1
Bacillus thuringiensis strain B.t-227 insecticidal protein 1 gene, complete cds	403	403	95%	9e-109	99%	GQ385073.1
Bacillus thuringiensis isolate BtC008 insecticidal crystal protein Cry1Ab (cry1Ab) gene, complete cds	403	403	95%	9e-109	99%	DQ241675.1
Bacillus thuringiensis strain BtS2491Ab endotoxin (cry1Ab) gene, complete cds	403	403	95%	9e-109	99%	EU220269.1

3.Mẫu vi khuẩnVBt26317.2

GTTTCCACACTTCGTACGGTACTCGAGATTATCACTGTGAAAATTATCCAA
GAGATTATTCTAACTATTGAATAAATACGTATCAAATTGCGTTAAAAGGTT
AAAACACCCGTTAACACAATATGTTAAAATTAAAAACATATATGTTTTTAA
ATGTATTTGATTATGTATCTATTGGGTCGTTGTTTAAATATCAAAGTCTTCT
AGTATCTTCCGGTGCTAATTTATATGCAAGTGGTAGTGAACCACACCAAAC
CCAATCATTTACTTCACAAAACTGGCCATTTTAATATTCTCTTTTCCAATTT
AATTCAAATTATGTGTTAAATGGATTTAGGGGTGCTAGGCTTTCTATTACCT
TCCCAAATATAGTGGGTTAACCGGGTTCTACTACAACTCACGCATTGCTTG
CTGCAAGGGTTAATTACAGTGAAGGAATTTCTTCGGGTGATATAGGTGCAT
CTCCTTTAAATCAAAATTTTAATTGTAGCACATTTCCCCCCCCATTGTAAAC
CCCATTTGTTAGAAGTTGGCTAAATTCAGGTTCAAATCGGGAGGGCGTTGC
CACCTTTACAAATTGCCAAACAAAATCCTTTAAAACAACTTTAGGTTTAAG
GAGTGGTGCTTTTACAGCCCGCGAAAATTCAAACTATTTCCCAAATTTTTTA
ACCGGAACCGGAA

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Bacillus thuringiensis strain YC-10 plasmid pYC1 Cry2Ab (cry2Ab) gene, complete cds	898	898	97%	0.0	91%	KY212748.1
Bacillus thuringiensis Cry2Ab29 (cry2Ab29) gene, complete cds	898	898	97%	0.0	91%	KF860847.1
Bacillus thuringiensis serovar alesti strain BGSC 4C1 plasmid pBMB267, complete sequence	898	898	97%	0.0	91%	CP015177.1
Bacillus thuringiensis strain YC-10 plasmid pYC1, complete sequence	898	898	96%	0.0	91%	CP011350.1
Bacillus thuringiensis serovar kurstaki strain HD 1 plasmid unnamed2, complete sequence	898	898	96%	0.0	91%	CP009999.1
Bacillus thuringiensis strain LTS-7 Cry2Aab gene, complete cds	898	898	97%	0.0	91%	JN651494.1
Bacillus thuringiensis serovar galleriae strain HD-29 plasmid pBMB267, complete sequence	898	898	97%	0.0	91%	CP010091.1
Bacillus thuringiensis serovar kurstaki str. YBT-1520 plasmid pBMB293, complete sequence	898	898	97%	0.0	91%	CP007615.1
Bacillus thuringiensis serovar kurstaki str. HD-1 plasmid pBMB299, complete sequence	898	898	97%	0.0	91%	CP004876.1
Bacillus thuringiensis serovar kurstaki str. YBT-1520 plasmid pBMB293, complete sequence	898	898	97%	0.0	91%	CP004861.1
Bacillus thuringiensis strain HTS-S-38 insecticidal crystal protein B2 (cry2Ab) gene, complete cds	898	898	97%	0.0	91%	KJ010821.1
Bacillus thuringiensis strain PS9-C12 Cry2A-like protein gene, partial cds	898	898	97%	0.0	91%	HQ439789.1
Bacillus thuringiensis serovar thuringiensis str. IS5056 plasmid pIS56-285, complete sequence	898	898	97%	0.0	91%	CP004136.1
Bacillus thuringiensis strain SSy111-c clone HA20 delta-endotoxin (cry2A) gene, complete cds	898	898	97%	0.0	91%	JN135261.1
Bacillus thuringiensis strain SSy126-c clone HA19 delta-endotoxin (cry2A) gene, partial cds	898	898	97%	0.0	91%	JN135260.1
Bacillus thuringiensis strain SSy141-c clone HA17 delta-endotoxin (cry2A) gene, complete cds	898	898	97%	0.0	91%	JN135258.1
Bacillus thuringiensis strain SSy125-c clone HA13 delta-endotoxin (cry2A) gene, complete cds	898	898	97%	0.0	91%	JN135255.1
Bacillus thuringiensis strain SSy77 clone HA21 delta-endotoxin (cry2A) gene, complete cds	898	898	97%	0.0	91%	JN426946.1
Bacillus thuringiensis strain SK-793 plasmid crystal protein (cry2A) gene, complete cds	898	898	97%	0.0	91%	GQ866914.1
Bacillus thuringiensis strain SP41 Cry2Ab protein (cry2Ab) gene, complete cds	898	898	97%	0.0	91%	JN415764.1
Bacillus thuringiensis serovar chinensis CT-43 plasmid pCT281, complete sequence	898	898	97%	0.0	91%	CP001910.1
Bacillus thuringiensis strain YY1 insecticidal crystal protein gene, complete cds	898	898	97%	0.0	91%	HM037126.1

4.Mẫu vi khuẩn VBt27310.1

GATTCCACAACATTCACGTACGTATCGAGATTCACTTGAAAATTATCCAAG
AGATTATTCTAATTATTGAATAAATACGTATCAAAGTGCGTTTAAAGGTTT
AAACACCCGTTTACACGATATGTTAAAATTTAAAACATATATGTTTTTAAAT
GTATTTGATTATGTATCTATTTGGTCATTGTTAAAATATCAAAGTCTTCTGG
TATCTTCGGGTGCTAATTTATATGCAAGTGGTAGTGAACCACACCAAACCC
AATCATTTACTTCACAAAACTGGCCATTTTTATATTCTCTTTTCCAAGTTAA
TTCAAATTATGTGTTAAATGGATTTAGTGGTGCTAGGCTTTCTATTACCTTC
CCTAATATAGTTGGTTTACCGGGTTCTACTACAACTCATTCATTGATTGCTG
CAAGGGTTAATTACAGTGAAGGAATTTCATCGGGTGATATAGGGGCAACTC
CTTTAAATCAAAATTTTAATTGTAGCACATTTCTCCCCCCATTGTTAACCCC
ATTTGTTAGAAGTTGGCTGGATTCAGGTCCAAATCGGGAGGGCGTTGCCCC
CTTTACAAATTGGCAAACAAAATCCTTTAAAACAACTTTAGGTTTAAGGAG
TGGTGCTTTTACAGCCCGGGGAAATTCAAACTATTTCCCAAATTTTTATCC
GAAAACGGAAAAA

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Bacillus thuringiensis Cry2-1 (cry2-1) gene, complete cds	961	961	97%	0.0	93%	KJ634087.1
Bacillus thuringiensis strain YC-10 plasmid pYC1 Cry2Ab (cry2Ab) gene, complete cds	955	955	96%	0.0	93%	KY212748.1
Bacillus thuringiensis Cry2Ab29 (cry2Ab29) gene, complete cds	955	955	96%	0.0	93%	KF860847.1
Bacillus thuringiensis serovar alesti strain BGSC 4C1 plasmid pBMB267, complete sequence	955	955	96%	0.0	93%	CP015177.1
Bacillus thuringiensis strain YC-10 plasmid pYC1, complete sequence	955	1728	97%	0.0	93%	CP011350.1
Bacillus thuringiensis serovar kurstaki strain HD 1 plasmid unnamed2, complete sequence	955	1728	97%	0.0	93%	CP009999.1
Bacillus thuringiensis strain LTS-7 Cry2Aab gene, complete cds	955	955	96%	0.0	93%	JN651494.1
Bacillus thuringiensis serovar galleriae strain HD-29 plasmid pBMB267, complete sequence	955	955	96%	0.0	93%	CP010091.1
Bacillus thuringiensis serovar kurstaki str. YBT-1520 plasmid pBMB293, complete sequence	955	1728	97%	0.0	93%	CP007615.1
Bacillus thuringiensis serovar kurstaki str. HD-1 plasmid pBMB299, complete sequence	955	1734	97%	0.0	93%	CP004876.1
Bacillus thuringiensis serovar kurstaki str. YBT-1520 plasmid pBMB293, complete sequence	955	1728	97%	0.0	93%	CP004861.1
Bacillus thuringiensis strain HTS-S-38 insecticidal crystal protein B2 (cry2Ab) gene, complete cds	955	955	96%	0.0	93%	KJ010821.1
Bacillus thuringiensis strain PS9-C12 Cry2A-like protein gene, partial cds	955	955	96%	0.0	93%	HQ439789.1
Bacillus thuringiensis serovar thuringiensis str. IS5056 plasmid pIS56-285, complete sequence	955	1728	97%	0.0	93%	CP004136.1
Bacillus thuringiensis strain SSy111-c clone HA20 delta-endotoxin (cry2A) gene, complete cds	955	955	96%	0.0	93%	JN135261.1
Bacillus thuringiensis strain SSy126-c clone HA19 delta-endotoxin (cry2A) gene, partial cds	955	955	96%	0.0	93%	JN135260.1
Bacillus thuringiensis strain SSy141-c clone HA17 delta-endotoxin (cry2A) gene, complete cds	955	955	96%	0.0	93%	JN135258.1
Bacillus thuringiensis strain SSy125-c clone HA13 delta-endotoxin (cry2A) gene, complete cds	955	955	96%	0.0	93%	JN135255.1
Bacillus thuringiensis strain SSy77 clone HA21 delta-endotoxin (cry2A) gene, complete cds	955	955	96%	0.0	93%	JN426946.1
Bacillus thuringiensis strain SK-793 plasmid crystal protein (cry2A) gene, complete cds	955	955	96%	0.0	93%	GQ866914.1
Bacillus thuringiensis strain SP41 Cry2Ab protein (cry2Ab) gene, complete cds	955	955	96%	0.0	93%	JN415764.1
Bacillus thuringiensis serovar chinensis CT-43 plasmid pCT281, complete sequence	955	1728	97%	0.0	93%	CP001910.1
Bacillus thuringiensis strain YY1 insecticidal crystal protein gene, complete cds	955	955	96%	0.0	93%	HM037126.1

5.Mẫu vi khuẩn VBt2752.2

GATTACCCACACACATTCCGTACCGATTACTCGAGATTCACTTGAAAATTA
TCCAAGAGATTATTCTAATTATTGTATAAATACGTATCAAATTGCGTTTAAA
GGTTTAAACACCCGTTTACACGATATGTTAGAATTTAAAACATATATGTTTT
TAAATGTATTTGATTATGTATCTATTTGGTCATTGTTTAAATATCAAAGTCT
TCTAGTATCTTCGGGTGCTAATTTATATGCAAGTGGTAGTGAACCACACCA
AACCCAATCATTTACTTCACAAAACTGGCCATTTTAATATTCTCTTTTCCAA
GTTAATTCAAATTATGTGTTAAATGGATTTAGTGGTGCTAGGCTTTCTATTA
CCTTCCCTAATATAGTTGGTTTACCGGGTTCTACTACAACTCATTCATTGAT
TGCTGCAAGGGTTAATTACAGTGAAGGAATTTCATCTGGTGATATAGGGGC
ACCTCCTTTAAATCAAAATTTTAATTGCAGCACATTTCTCCCCCCATTGTTA
ACCCCATTTGTTAGAAGTTGGCTGGATTCAGGTTCAGATCGGGAGGGCGTT
GCCACCTTTACAAATTGGCAAACAAAATCCTTTAAAACAACTTTAGGTTTA
AGGAGTGGTGCTTTTCCAGCCCGCGGAAATTCAAACTATTTCCCAAATTTTT
TTCCGGAACCCGCAT

Descriptions

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Bacillus thuringiensis strain YC-10 plasmid pYC1 Cry2Ab (cry2Ab) gene, complete cds	957	957	96%	0.0	93%	KY212748.1
Bacillus thuringiensis Cry2Ab29 (cry2Ab29) gene, complete cds	957	957	96%	0.0	93%	KF860847.1
Bacillus thuringiensis serovar alesti strain BGSC 4C1 plasmid pBMB267, complete sequence	957	957	96%	0.0	93%	CP015177.1
Bacillus thuringiensis strain YC-10 plasmid pYC1, complete sequence	957	1723	96%	0.0	93%	CP011350.1
Bacillus thuringiensis serovar kurstaki strain HD 1 plasmid unnamed2, complete sequence	957	1723	96%	0.0	93%	CP009999.1
Bacillus thuringiensis strain LTS-7 Cry2Aab gene, complete cds	957	957	96%	0.0	93%	JN651494.1
Bacillus thuringiensis serovar galleriae strain HD-29 plasmid pBMB267, complete sequence	957	957	96%	0.0	93%	CP010091.1
Bacillus thuringiensis serovar kurstaki str. YBT-1520 plasmid pBMB293, complete sequence	957	1723	97%	0.0	93%	CP007615.1
Bacillus thuringiensis serovar kurstaki str. HD-1 plasmid pBMB299, complete sequence	957	1723	97%	0.0	93%	CP004876.1
Bacillus thuringiensis serovar kurstaki str. YBT-1520 plasmid pBMB293, complete sequence	957	1723	97%	0.0	93%	CP004861.1
Bacillus thuringiensis strain HTS-S-38 insecticidal crystal protein B2 (cry2Ab) gene, complete cds	957	957	96%	0.0	93%	KJ010821.1
Bacillus thuringiensis strain PS9-C12 Cry2A-like protein gene, partial cds	957	957	96%	0.0	93%	HQ439789.1
Bacillus thuringiensis serovar thuringiensis str. IS5056 plasmid pIS56-285, complete sequence	957	1723	97%	0.0	93%	CP004136.1
Bacillus thuringiensis strain SSy111-c clone HA20 delta-endotoxin (cry2A) gene, complete cds	957	957	96%	0.0	93%	JN135261.1
Bacillus thuringiensis strain SSy126-c clone HA19 delta-endotoxin (cry2A) gene, partial cds	957	957	96%	0.0	93%	JN135260.1
Bacillus thuringiensis strain SSy141-c clone HA17 delta-endotoxin (cry2A) gene, complete cds	957	957	96%	0.0	93%	JN135258.1
Bacillus thuringiensis strain SSy125-c clone HA13 delta-endotoxin (cry2A) gene, complete cds	957	957	96%	0.0	93%	JN135255.1
Bacillus thuringiensis strain SSy77 clone HA21 delta-endotoxin (cry2A) gene, complete cds	957	957	96%	0.0	93%	JN426946.1
Bacillus thuringiensis strain SK-793 plasmid crystal protein (cry2A) gene, complete cds	957	957	96%	0.0	93%	GQ866914.1
Bacillus thuringiensis strain SP41 Cry2Ab protein (cry2Ab) gene, complete cds	957	957	96%	0.0	93%	JN415764.1

6.Mẫu vi khuẩn VBt2119.1

GTTTCCCCACACACATTTCCGTACCGGTACTCGAGATTACACTTGAAAATTA
TCCAAGAGATTATTCTAATTATTGAATAAATACGTATCAAATTGCGTTAAA
AGGTTTAAACACCCGTTAACACAATATGTTAAAATTTAAAACATATATGTT
TTTAAATGTATTTGATTATGTATCCATTTGGTCTTTGTTAAAATATCAAAGT
CTTCTGGTATCTTCGGGTGCTAATTTATATGCAAGTGGTAGTGAACCACAG
CAAACCCAATCATTTACTTCACAAAACTGGCCATTTTAATATTCTCTTTTCC
AAGTTAATTCAAATTATGTGTTAAATGGATTTAGGGGTGCTAGGCTTTCTAT
TACCTTCCCTAATATGGTTGGTTTACCGGGTTCTACTACAACTCATTCATTG
ATTGCTGCAAGGGTTAATTACAGTGAAGGAATTTCTTCGGGTGAAATAGGG
GCACCTCCTTTAAATCAAAATTTTAATTGCAGCACATTTCCCCCCCCTTTGT
TAACCCCATTTGTTAGAAGTTGGCTGGATTCAGGTCCAAATCGGGAGGGCG
TTGCCACCTTTACAAATTGCCAAACAAAATCCTTTAAAACAACTTTAGGTTT
AAGGAGGGGGGCTTTTCCACCCCGGGGAAATTCAAACTATTTCCCATATTT
TTATCCGGAACAAAAAAA

Descriptions

Sequences producing significant alignments:

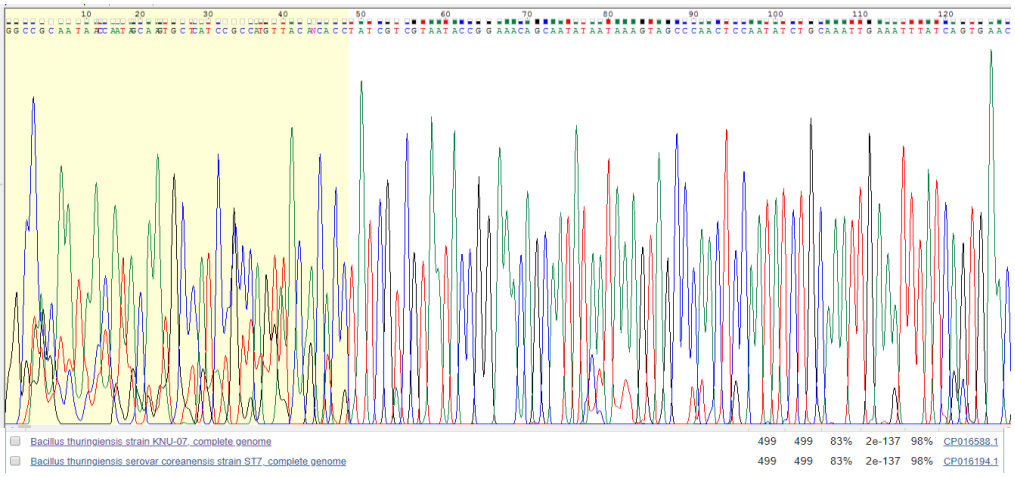
Select: All None Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Bacillus thuringiensis Cry2-1 (cry2-1) gene, complete cds	843	843	96%	0.0	90%	KJ634087.1
Bacillus thuringiensis strain YC-10 plasmid pYC1 Cry2Ab (cry2Ab) gene, complete cds	839	839	95%	0.0	90%	KY212748.1
Bacillus thuringiensis Cry2Ab29 (cry2Ab29) gene, complete cds	839	839	95%	0.0	90%	KF860847.1
Bacillus thuringiensis serovar alesti strain BGSC 4C1 plasmid pBMB267, complete sequence	839	839	95%	0.0	90%	CP015177.1
Bacillus thuringiensis strain YC-10 plasmid pYC1, complete sequence	839	1538	96%	0.0	90%	CP011350.1
Bacillus thuringiensis serovar kurstaki strain HD 1 plasmid unnamed2, complete sequence	839	1538	96%	0.0	90%	CP009999.1
Bacillus thuringiensis strain LTS-7 Cry2Aab gene, complete cds	839	839	95%	0.0	90%	JN651494.1
Bacillus thuringiensis serovar galleriae strain HD-29 plasmid pBMB267, complete sequence	839	839	95%	0.0	90%	CP010091.1
Bacillus thuringiensis serovar kurstaki str. YBT-1520 plasmid pBMB293, complete sequence	839	1538	97%	0.0	90%	CP007615.1
Bacillus thuringiensis serovar kurstaki str. HD-1 plasmid pBMB299, complete sequence	839	1533	97%	0.0	90%	CP004876.1
Bacillus thuringiensis serovar kurstaki str. YBT-1520 plasmid pBMB293, complete sequence	839	1538	97%	0.0	90%	CP004861.1
Bacillus thuringiensis strain HTS-S-38 insecticidal crystal protein B2 (cry2Ab) gene, complete cds	839	839	95%	0.0	90%	KJ010821.1
Bacillus thuringiensis strain PS9-C12 Cry2A-like protein gene, partial cds	839	839	95%	0.0	90%	HQ439789.1
Bacillus thuringiensis serovar thuringiensis str. IS5056 plasmid pIS56-285, complete sequence	839	1538	97%	0.0	90%	CP004136.1
Bacillus thuringiensis strain SSv111-c clone HA20 delta-endotoxin (cry2A) gene, complete cds	839	839	95%	0.0	90%	JN135261.1
Bacillus thuringiensis strain SSv126-c clone HA19 delta-endotoxin (cry2A) gene, partial cds	839	839	95%	0.0	90%	JN135260.1
Bacillus thuringiensis strain SSv141-c clone HA17 delta-endotoxin (cry2A) gene, complete cds	839	839	95%	0.0	90%	JN135258.1
Bacillus thuringiensis strain SSv60-b clone HA14 delta-endotoxin (cry2A) gene, complete cds	839	839	95%	0.0	90%	JN135256.1
Bacillus thuringiensis strain SSv125-c clone HA13 delta-endotoxin (cry2A) gene, complete cds	839	839	95%	0.0	90%	JN135255.1
Bacillus thuringiensis strain SSv77 clone HA21 delta-endotoxin (cry2A) gene, complete cds	839	839	95%	0.0	90%	JN426946.1

7. Mẫu Vi khuẩn VBt2639.5

GGCCGCAATAATCCAATAGCAAGTGCTCATCCGCCATGTTACANCACCTAT
CGTCGTAATACCGGAAACAGCAATATAATAAAGTAGCCCAACTCCAATATC
TGCAAATTGAAATTTATCAGTGAACGGGATAACTGCAAGCACCATAAATGC
TGGCGCAAATGCAATGACAGGCGCTAATATAAACAGCGGTTTATCTGCTGC
TTTTGGAATACTATCTTCTTTCAATAATAGTTTTAAAACATCAGCTACCGTT
TGCAGTAAACCGAATCGGCCTCCAACCTGGTTTGGTCCAATCCGCCCTCGC
TAATAGTAACACCGAGATGTGTTGACTGTTTGAGC



PHỤ LỤC 4.

PHÂN TÍCH THỐNG KÊ

Bảng 25. Bảng Anova kết quả phân tích thống kê đánh giá hiệu quả của các dòng vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* phòng trừ sâu tơ trong phòng thí nghiệm

		Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
1 ngày sau phun	Between Groups	52.238	20	2.612	3.501	.000
	Within Groups	47.000	63	.746		
	Total	99.238	83			
3 ngày sau phun	Between Groups	120.452	20	6.023	5.883	.000
	Within Groups	64.500	63	1.024		
	Total	184.952	83			
5 ngày sau phun	Between Groups	265.643	20	13.282	21.319	.000
	Within Groups	39.250	63	.623		
	Total	304.893	83			
7 ngày sau phun	Between Groups	276.238	20	13.812	32.529	.000
	Within Groups	26.750	63	.425		
	Total	302.988	83			

Bảng 26. Bảng Anova kết quả phân tích thống kê đánh giá hiệu quả của các dòng vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* phòng trừ sâu khoang trong phòng thí nghiệm

		Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
1 ngày sau phun	Between Groups	77.810	20	3.890	6.166	.000
	Within Groups	39.750	63	.631		
	Total	117.560	83			
3 ngày sau phun	Between Groups	159.452	20	7.973	11.613	.000
	Within Groups	43.250	63	.687		
	Total	202.702	83			
5 ngày sau phun	Between Groups	197.571	20	9.879	14.818	.000
	Within Groups	42.000	63	.667		
	Total	239.571	83			
7 ngày sau phun	Between Groups	252.738	20	12.637	23.245	.000
	Within Groups	34.250	63	.544		
	Total	286.988	83			

Bảng 27. Bảng Anova kết quả phân tích thống kê đánh giá hiệu quả của các dòng vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* phòng trừ sâu xanh da láng trong phòng thí nghiệm

		Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
1 ngày sau phun	Between Groups	48.310	20	2.415	5.339	.000
	Within Groups	28.500	63	.452		
	Total	76.810	83			
3 ngày sau phun	Between Groups	100.643	20	5.032	7.124	.000
	Within Groups	44.500	63	.706		
	Total	145.143	83			
5 ngày sau phun	Between Groups	258.667	20	12.933	25.663	.000
	Within Groups	31.750	63	.504		
	Total	290.417	83			
7 ngày sau phun	Between Groups	274.643	20	13.732	28.365	.000
	Within Groups	30.500	63	.484		
	Total	305.143	83			

Kết quả phân tích LC_{50} sâu tơ tuổi 2

```
---------------------------------------------------------------------------
Intercepts and slopes unconstrained. Preparation is ( 1) LD20.2
Not estimating natural response
            parameter   standard error   t ratio
LD20.2       -1.200          0.489       -2.453
SLOPE         0.223          0.056        3.998
Variance-Covariance matrix
                LD20.2        SLOPE
  LD20.2      0.239114     -0.264764E-01
  SLOPE      -0.264764E-01  0.310638E-02
Chi-squared goodness of fit test
prep             dose      n       r   expected  residual   probab  std resid
LD20.2    1591623.037     40.     24.     22.89     1.108    0.572     0.354
        159162303.700     40.     28.     29.40    -1.398    0.735    -0.501
        *************     40.     34.     34.34    -0.339    0.858    -0.154
        *************     40.     38.     37.43     0.575    0.936     0.370
chi-square: 0.537     degrees of freedom: 2     heterogeneity: 0.268
Effective Doses
                  dose      limits    0.90     0.95     0.99
LD50  LD20.2     0.24206E+06  lower  846.42      112.38     0.18966
                            upper 0.36372E+07 0.53764E+07 0.10790E+08
```

```
-----------------------------------------------------------------------
Intercepts and slopes unconstrained. Preparation is ( 2) TN36.4
Not estimating natural response
            parameter   standard error   t ratio
TN36.4       -1.086          0.459       -2.366
SLOPE         0.186          0.051        3.671
Variance-Covariance matrix
                TN36.4        SLOPE
  TN36.4      0.210823     -0.226254E-01
  SLOPE      -0.226254E-01  0.257343E-02
Chi-squared goodness of fit test
prep             dose      n       r   expected  residual   probab  std resid
TN36.4    1662790.698     40.     22.     21.15     0.853    0.529     0.270
        166279069.800     40.     26.     26.86    -0.865    0.672    -0.291
        *************     40.     31.     31.72    -0.719    0.793    -0.281
        *************     40.     36.     35.31     0.687    0.883     0.338
chi-square: 0.351     degrees of freedom: 2     heterogeneity: 0.175
Effective Doses
                  dose      limits    0.90     0.95     0.99
LD50  TN36.4     0.68298E+06  lower  1298.5      115.29     0.22907E-01
                            upper 0.11727E+08 0.17701E+08 0.37163E+08
-----------------------------------------------------------------------
Intercepts and slopes unconstrained. Preparation is ( 3) BT1.3
Not estimating natural response
            parameter   standard error   t ratio
BT1.3        -1.257          0.454       -2.771
SLOPE         0.201          0.051        3.975
Variance-Covariance matrix
                BT1.3         SLOPE
  BT1.3       0.205809     -0.222676E-01
  SLOPE      -0.222676E-01  0.255515E-02
Chi-squared goodness of fit test
prep             dose      n       r   expected  residual   probab  std resid
BT1.3     1361963.190     40.     20.     19.61     0.387    0.490     0.122
        136196319.000     40.     26.     25.89     0.114    0.647     0.038
        *************     40.     30.     31.29    -1.287    0.782    -0.493
        *************     40.     36.     35.25     0.749    0.881     0.366
chi-square: 0.393     degrees of freedom: 2     heterogeneity: 0.197
Effective Doses
                  dose      limits    0.90     0.95     0.99
LD50  BT1.3      0.17983E+07  lower  15096.      2843.3      15.024
                            upper 0.20634E+08 0.29918E+08 0.59241E+08

-----------------------------------------------------------------------
Intercepts and slopes unconstrained. Preparation is ( 4) VP4.1
Not estimating natural response
            parameter   standard error   t ratio
```

```
VP4.1        -1.251          0.445       -2.814
SLOPE         0.192          0.049        3.896

Variance-Covariance matrix
               VP4.1         SLOPE
  VP4.1       0.197687     -0.212959E-01
  SLOPE      -0.212959E-01  0.243402E-02
Chi-squared goodness of fit test
prep             dose      n       r   expected  residual   probab  std resid
VP4.1     1242105.263     40.     19.     18.73     0.274    0.468     0.087
        124210526.300     40.     25.     24.78     0.215    0.620     0.070
        *************     40.     29.     30.18    -1.182    0.755    -0.434
        *************     40.     35.     34.34     0.663    0.858     0.301
chi-square: 0.291     degrees of freedom: 2     heterogeneity: 0.146
Effective Doses
                  dose      limits    0.90     0.95     0.99
LD50  VP4.1      0.32358E+07  lower  31305.      6125.7      33.365
                            upper 0.35711E+08 0.51897E+08 0.10428E+09
```

Kết quả phân tích LC_{50} sâu tơ tuổi 4

```
---------------------------------------------------------------------------
Intercepts and slopes unconstrained. Preparation is ( 1) LD20.2
Not estimating natural response
            parameter   standard error   t ratio
LD20.2       -1.237          0.450       -2.748
SLOPE         0.201          0.053        3.802
Variance-Covariance matrix
               LD20.2        SLOPE
  LD20.2      0.202676     -0.230774E-01
  SLOPE      -0.230774E-01  0.278362E-02
Chi-squared goodness of fit test
prep             dose      n       r   expected  residual   probab  std resid
LD20.2     815013.405     40.     20.     19.18     0.819    0.480     0.259
         81501340.480     40.     23.     25.47    -2.470    0.637    -0.812
        815013404.000     40.     30.     28.36     1.641    0.709     0.571
        *************     40.     35.     35.01    -0.015    0.875    -0.007
chi-square: 1.053     degrees of freedom: 2     heterogeneity: 0.527
Effective Doses
                  dose      limits    0.90     0.95     0.99
LD50  LD20.2     0.14699E+07  lower  15473.      2989.2      13.196
                            upper 0.14695E+08 0.20990E+08 0.40835E+08
---------------------------------------------------------------------------
Intercepts and slopes unconstrained. Preparation is ( 2) TN36.4
Not estimating natural response
            parameter   standard error   t ratio
TN36.4       -1.263          0.427       -2.957
SLOPE         0.188          0.048        3.894
```

```
Variance-Covariance matrix
                TN36.4        SLOPE
  TN36.4      0.182534     -0.200281E-01
  SLOPE      -0.200281E-01  0.233885E-02
Chi-squared goodness of fit test
prep             dose      n       r   expected  residual   probab  std resid
TN36.4     704433.498     40.     19.     17.43     1.574    0.436     0.502
         70443349.750     40.     21.     23.40    -2.399    0.585    -0.770
        *************     40.     29.     28.91     0.086    0.723     0.030
       *************     40.     34.     33.34     0.661    0.833     0.280
chi-square: 0.924     degrees of freedom: 2     heterogeneity: 0.462
Effective Doses
                  dose      limits    0.90     0.95     0.99
LD50  TN36.4     0.51057E+07  lower  82184.      19966.      230.45
                            upper 0.49626E+08 0.71984E+08 0.14721E+09
-----------------------------------------------------------------------
Intercepts and slopes unconstrained. Preparation is ( 3) BT1.3
Not estimating natural response
            parameter   standard error   t ratio
BT1.3        -1.170          0.435       -2.688
SLOPE         0.165          0.047        3.493
Variance-Covariance matrix
                BT1.3         SLOPE
  BT1.3       0.189495     -0.200335E-01
  SLOPE      -0.200335E-01  0.224498E-02
Chi-squared goodness of fit test
prep             dose      n       r   expected  residual   probab  std resid
BT1.3     1361963.190     40.     18.     17.53     0.465    0.438     0.148
        136196319.000     40.     23.     22.79     0.208    0.570     0.066
        *************     40.     26.     27.76    -1.755    0.694    -0.602
        *************     40.     33.     31.96     1.042    0.799     0.411
chi-square: 0.558     degrees of freedom: 2     heterogeneity: 0.279
Effective Doses
                  dose      limits    0.90     0.95     0.99
LD50  BT1.3      0.11785E+08  lower  84269.      12574.
                            upper 0.14498E+09 0.21905E+09
-----------------------------------------------------------------------
Intercepts and slopes unconstrained. Preparation is ( 4) VP4.1
Not estimating natural response
            parameter   standard error   t ratio
VP4.1        -1.331          0.432       -3.082
SLOPE         0.171          0.047        3.641
Variance-Covariance matrix
                VP4.1         SLOPE
  VP4.1       0.186463     -0.196622E-01
  SLOPE      -0.196622E-01  0.219722E-02
```

```
Chi-squared goodness of fit test
prep            dose      n       r   expected  residual   probab  std resid
VP4.1     1242105.263     40.     16.     15.42     0.577    0.386     0.187
        124210526.300     40.     21.     20.81     0.195    0.520     0.062
        *************     40.     24.     26.10    -2.096    0.652    -0.696
        *************     40.     32.     30.73     1.269    0.768     0.476
chi-square: 0.750     degrees of freedom: 2     heterogeneity: 0.375
Effective Doses
                  dose      limits    0.90     0.95     0.99
LD50  VP4.1      0.62859E+08  lower 0.16510E+07 0.48115E+06
                            upper 0.61535E+09 0.94599E+09
----------------------------------------------------------------------
```

Kết quả phân tích LC_{50} sâu khoang tuổi 2

```
Intercepts and slopes unconstrained. Preparation is ( 1) Bt-20.2
Not estimating natural response
parameter   standard error   t ratio
Bt-20.2      -1.532          0.369       -4.156
SLOPE         0.246          0.048        5.105
Variance-Covariance matrix
Bt-20.2       SLOPE
Bt-20.2     0.135918     -0.169811E-01
SLOPE      -0.169811E-01  0.231673E-02
Chi-squared goodness of fit test
prep            dose      n       r   expected  residual   probab  std resid
Bt-20.2     36923.000     40.     15.     13.64     1.362    0.341     0.454
3815385.000     40.     20.     21.35    -1.355    0.534    -0.429
615384615.000     40.     28.     29.39    -1.392    0.735    -0.499
*************     40.     36.     34.78     1.220    0.869     0.573
chi-square: 0.968     degrees of freedom: 2     heterogeneity: 0.484
Effective Doses
dose      limits    0.90     0.95     0.99
LD50  Bt-20.2    0.17202E+07  lower 0.18025E+06  99712.      23229.
upper 0.91560E+07 0.12416E+08 0.22777E+08
----------------------------------------------------------------------
Intercepts and slopes unconstrained. Preparation is ( 2) Bt-36.4
Not estimating natural response
parameter   standard error   t ratio
Bt-36.4       -1.497          0.361       -4.142
SLOPE         0.224          0.046        4.824
Variance-Covariance matrix
Bt-36.4        SLOPE
Bt-36.4      0.130515     -0.160559E-01
SLOPE      -0.160559E-01  0.215666E-02
Chi-squared goodness of fit test
prep            dose      n       r   expected  residual   probab  std resid
Bt-36.4      34286.000     40.     14.     12.62     1.383    0.315     0.471
3542857.000     40.     18.     19.53    -1.533    0.488    -0.485
571428571.000     40.     26.     27.17    -1.165    0.679    -0.395
*************     40.     34.     32.83     1.172    0.821     0.483
```

```
chi-square: 0.845     degrees of freedom: 2     heterogeneity: 0.423

Effective Doses
dose      limits    0.90     0.95     0.99
LD50  Bt-36.4     0.47874E+07  lower 0.51223E+06 0.28757E+06  69159.
upper 0.28154E+08 0.39727E+08 0.81361E+08
---------------------------------------------------------------------------
Intercepts and slopes unconstrained. Preparation is ( 3) Bt-1.3
Not estimating natural response
parameter   standard error   t ratio
Bt-1.3       -1.510          0.362       -4.171
SLOPE         0.217          0.046        4.728
Variance-Covariance matrix
Bt-1.3        SLOPE
Bt-1.3      0.130977     -0.159412E-01
SLOPE      -0.159412E-01  0.211550E-02
Chi-squared goodness of fit test
prep             dose      n       r   expected  residual   probab  std resid
Bt-1.3      36923.000     40.     13.     12.11     0.888    0.303     0.306
3815385.000     40.     18.     18.75    -0.751    0.469    -0.238
615384615.000     40.     25.     26.24    -1.242    0.656    -0.413
*************     40.     33.     32.00     1.004    0.800     0.397
chi-square: 0.478     degrees of freedom: 2     heterogeneity: 0.239
Effective Doses
dose      limits    0.90     0.95     0.99
LD50  Bt-1.3     0.87460E+07  lower 0.97125E+06 0.55576E+06 0.14107E+06
upper 0.54051E+08 0.78048E+08 0.17101E+09
---------------------------------------------------------------------------
Intercepts and slopes unconstrained. Preparation is ( 4) Bt-4.1
Not estimating natural response
parameter   standard error   t ratio
Bt-4.1      -1.545          0.361       -4.281
SLOPE         0.211          0.046        4.633
Variance-Covariance matrix
Bt-4.1       SLOPE
Bt-4.1     0.130136     -0.157571E-01
SLOPE      -0.157571E-01  0.207931E-02
Chi-squared goodness of fit test
prep             dose      n       r   expected  residual   probab  std resid
Bt-4.1     34286.000     40.     12.     11.15     0.849    0.279     0.300
3542857.000     40.     17.     17.44    -0.441    0.436    -0.141
571428571.000     40.     23.     24.80    -1.797    0.620    -0.585
*************     40.     32.     30.72     1.280    0.768     0.480
chi-square: 0.682     degrees of freedom: 2     heterogeneity: 0.341
Effective Doses
dose      limits    0.90     0.95     0.99
LD50  Bt-4.1    0.20496E+08  lower 0.25335E+07 0.15278E+07 0.45477E+06
upper 0.13892E+09 0.21043E+09 0.53349E+09
---------------------------------------------------------------------------

HYPOTHESIS OF EQUALITY (equal slopes, equal intercepts): NOT REJECTED (P>0.05)
(chi-square: 3.78,  degrees of freedom: 6,  tail probability: 0.706)
```

```
---------------------------------------------------------------------

HYPOTHESIS OF PARALLELISM (equal slopes): NOT REJECTED (P>0.05)
(chi-square: 0.30,  degrees of freedom: 3,  tail probability: 0.959)
--------------------------------------------------------------------
Lethal dose ratios (LD50)
ratio      limits     0.95
Bt-36.4       0.359      lower     0.015
               upper     8.720
Bt-1.3       0.197      lower     0.008
                                          Upper     4.794
Bt-4.1      0.084      lower     0.003
                                          upper     2.035
```

Kết quả phân tích LC_{50} sâu khoang tuổi 4

```
Intercepts and slopes unconstrained. Preparation is ( 1) Bt-20.2
Not estimating natural response
parameter   standard error   t ratio
Bt-20.2      -1.757          0.365       -4.816
SLOPE         0.229          0.046        4.973
Variance-Covariance matrix
Bt-20.2       SLOPE
Bt-20.2     0.133014     -0.160873E-01
SLOPE      -0.160873E-01  0.211891E-02
Chi-squared goodness of fit test
prep             dose      n       r   expected  residual   probab  std resid
Bt-20.2     30968.000     40.     11.      9.33     1.674    0.233     0.626
3200000.000     40.     14.     15.78    -1.783    0.395    -0.577
516129032.000     40.     22.     23.76    -1.762    0.594    -0.567
*************     40.     32.     30.33     1.670    0.758     0.617
chi-square: 1.427     degrees of freedom: 2     heterogeneity: 0.713
Effective Doses
dose      limits    0.90     0.95     0.99
LD50  Bt-20.2    0.47115E+08  lower 0.77363E+07 0.51978E+07 0.21373E+07
upper 0.30038E+09 0.45737E+09 0.11906E+10
---------------------------------------------------------------------
Intercepts and slopes unconstrained. Preparation is ( 2) Bt-36.4
Not estimating natural response
parameter   standard error   t ratio
Bt-36.4       -1.884          0.370       -5.092
SLOPE         0.233          0.046        5.054
Variance-Covariance matrix
Bt-36.4        SLOPE
Bt-36.4      0.136842     -0.163819E-01
SLOPE      -0.163819E-01  0.213186E-02
Chi-squared goodness of fit test
prep             dose      n       r   expected  residual   probab  std resid
Bt-36.4      32000.000     40.     10.      8.10     1.898    0.203     0.746
3306667.000     40.     12.     14.34    -2.340    0.358    -0.771
533333333.000     40.     21.     22.43    -1.427    0.561    -0.455
*************     40.     31.     29.35     1.649    0.734     0.590
chi-square: 1.707     degrees of freedom: 2     heterogeneity: 0.853
```

```
Effective Doses
dose      limits    0.90     0.95     0.99
LD50  Bt-36.4     0.11825E+09  lower 0.21172E+08 0.14837E+08 0.69139E+07
upper 0.81633E+09 0.12935E+10 0.37887E+10
-----------------------------------------------------------------------
Intercepts and slopes unconstrained. Preparation is ( 3) Bt-1.3
Not estimating natural response
parameter   standard error   t ratio
Bt-1.3       -1.923          0.372       -5.175
SLOPE         0.234          0.046        5.064
Variance-Covariance matrix
Bt-1.3        SLOPE
Bt-1.3      0.138114     -0.165075E-01
SLOPE      -0.165075E-01  0.214370E-02
Chi-squared goodness of fit test
prep             dose      n       r   expected  residual   probab  std resid
Bt-1.3      30000.000     40.      9.      7.65     1.354    0.191     0.545
3100000.000     40.     12.     13.76    -1.762    0.344    -0.586
500000000.000     40.     21.     21.85    -0.849    0.546    -0.270
*************     40.     30.     28.90     1.104    0.722     0.390
chi-square: 0.865     degrees of freedom: 2     heterogeneity: 0.433
Effective Doses
dose      limits    0.90     0.95     0.99
LD50  Bt-1.3     0.15982E+09  lower 0.29098E+08 0.20619E+08 0.99349E+07
upper 0.11538E+10 0.18636E+10 0.57731E+10
-----------------------------------------------------------------------
Intercepts and slopes unconstrained. Preparation is ( 4) Bt-4.1
Not estimating natural response
parameter   standard error   t ratio
Bt-4.1      -1.966          0.373       -5.265
SLOPE         0.235          0.046        5.074
Variance-Covariance matrix
Bt-4.1       SLOPE
Bt-4.1     0.139441     -0.166210E-01
SLOPE      -0.166210E-01  0.215165E-02
Chi-squared goodness of fit test
prep             dose      n       r   expected  residual   probab  std resid
Bt-4.1     30000.000     40.      9.      7.23     1.767    0.181     0.726
3100000.000     40.     11.     13.23    -2.225    0.331    -0.748
500000000.000     40.     20.     21.30    -1.297    0.532    -0.411
*************     40.     30.     28.45     1.549    0.711     0.541
chi-square: 1.548     degrees of freedom: 2     heterogeneity: 0.774
Effective Doses
dose      limits    0.90     0.95     0.99
LD50  Bt-4.1    0.22549E+09  lower 0.41468E+08 0.29675E+08 0.14744E+08
upper 0.17224E+10 0.28463E+10 0.94190E+10
-----------------------------------------------------------------------
HYPOTHESIS OF EQUALITY (equal slopes, equal intercepts): NOT REJECTED (P>0.05)
(chi-square: 1.31,  degrees of freedom: 6,  tail probability: 0.971)
-----------------------------------------------------------------------
HYPOTHESIS OF PARALLELISM (equal slopes): NOT REJECTED (P>0.05)
(chi-square: 0.01,  degrees of freedom: 3,  tail probability: 1.000)
```

```
-----------------------------------------------------------------------

Lethal dose ratios (LD50)
ratio      limits     0.95
Bt-36.4       0.398      lower     0.021
              upper     7.739
Bt-1.3       0.295      lower     0.015
       upper     5.784
Bt-4.1      0.209      lower     0.010
       upper     4.170
```

Kết quả phân tích LC_{50} sâu xanh da láng tuổi 2

```
            parameter   standard error   t ratio
Bt-20.2      -1.488          0.368       -4.038
SLOPE         0.229          0.047        4.864
Variance-Covariance matrix
                Bt-20.2       SLOPE
  Bt-20.2     0.135696     -0.166011E-01
  SLOPE      -0.166011E-01  0.221286E-02
Chi-squared goodness of fit test
prep            dose      n       r   expected  residual   probab  std resid
Bt-20.2     46154.000     40.     15.     13.48     1.515    0.337     0.507
          4769231.000     40.     19.     20.65    -1.647    0.516    -0.521
        769230769.000     40.     27.     28.29    -1.294    0.707    -0.450
        *************     40.     35.     33.73     1.267    0.843     0.551
chi-square: 1.035     degrees of freedom: 2     heterogeneity: 0.517
Effective Doses
                  dose      limits    0.90     0.95     0.99
LC50  Bt-20.2    0.31713E+07  lower 0.30157E+06 0.16137E+06  33726.
                            upper 0.18393E+08 0.25507E+08 0.49482E+08
-----------------------------------------------------------------------

            parameter   standard error   t ratio
Bt-36.4       -1.425          0.362       -3.939
SLOPE         0.207          0.046        4.531
Variance-Covariance matrix
                Bt-36.4        SLOPE
  Bt-36.4      0.130772     -0.158409E-01
  SLOPE       -0.158409E-01  0.209129E-02
Chi-squared goodness of fit test
prep             dose      n       r   expected  residual   probab  std resid
Bt-36.4     41379.000     40.     14.     12.79     1.206    0.320     0.409
          4275862.000     40.     18.     19.19    -1.190    0.480    -0.377
        689655172.000     40.     25.     26.31    -1.314    0.658    -0.438
        *************     40.     33.     31.82     1.183    0.795     0.464

chi-square: 0.716     degrees of freedom: 2     heterogeneity: 0.358
Effective Doses
                  dose      limits    0.90     0.95     0.99
LC50  Bt-36.4     0.75170E+07  lower 0.68904E+06 0.36640E+06  73604.
                            upper 0.50317E+08 0.73524E+08 0.16512E+09
-----------------------------------------------------------------------

            parameter   standard error   t ratio
Bt-1.3       -1.491          0.365       -4.087
SLOPE         0.205          0.045        4.508
Variance-Covariance matrix
                Bt-1.3        SLOPE
  Bt-1.3      0.133008     -0.158879E-01
  SLOPE       -0.158879E-01  0.206375E-02
Chi-squared goodness of fit test
prep             dose      n       r   expected  residual   probab  std resid
Bt-1.3      48000.000     40.     13.     11.90     1.103    0.297     0.382
          4960000.000     40.     17.     18.10    -1.100    0.453    -0.350
```

```
        800000000.000     40.     24.     25.21    -1.214    0.630    -0.398
        *************     40.     32.     30.90     1.105    0.772     0.417
chi-square: 0.599     degrees of freedom: 2     heterogeneity: 0.300
Effective Doses
                  dose      limits    0.90     0.95     0.99
LC50  Bt-1.3     0.18974E+08  lower 0.20142E+07 0.11435E+07 0.28170E+06
                            upper 0.13277E+09 0.20050E+09 0.50002E+09

-----------------------------------------------------------------------

            parameter   standard error   t ratio
Bt-4.1      -1.748          0.369       -4.741
SLOPE         0.229          0.046        4.974
Variance-Covariance matrix
                Bt-4.1       SLOPE
  Bt-4.1     0.136039     -0.162957E-01
  SLOPE      -0.162957E-01  0.212165E-02
Chi-squared goodness of fit test
prep             dose      n       r   expected  residual   probab  std resid
Bt-4.1     40000.000     40.     11.      9.75     1.247    0.244     0.459
          4133333.000     40.     15.     16.32    -1.322    0.408    -0.425
        666666667.000     40.     23.     24.31    -1.306    0.608    -0.423
        *************     40.     32.     30.77     1.231    0.769     0.462
chi-square: 0.784     degrees of freedom: 2     heterogeneity: 0.392
Effective Doses
                  dose      limits    0.90     0.95     0.99
LC50  Bt-4.1    0.42797E+08  lower 0.67887E+07 0.44811E+07 0.17471E+07
                            upper 0.26239E+09 0.39205E+09 0.96474E+09
-----------------------------------------------------------------------
HYPOTHESIS OF EQUALITY (equal slopes, equal intercepts): NOT REJECTED (P>0.05)
   (chi-square: 3.62,  degrees of freedom: 6,  tail probability: 0.728)
-----------------------------------------------------------------------
-----------------------------------------------------------------------
Lethal dose ratios (LD50)
             ratio      limits     0.95
Bt-36.4       0.422      lower     0.015
                        upper    12.069
Bt-1.3       0.167      lower     0.006
                        upper     4.613
Bt-4.1      0.074      lower     0.003
                        upper     1.699
```

Kết quả phân tích LC_{50} sâu xanh da láng tuổi 4

```
            parameter   standard error   t ratio
Bt-20.2      -1.937          0.375       -5.163
SLOPE         0.244          0.047        5.248
Variance-Covariance matrix
                Bt-20.2       SLOPE
  Bt-20.2     0.140720     -0.167618E-01
  SLOPE      -0.167618E-01  0.216647E-02
Chi-squared goodness of fit test
prep             dose      n       r   expected  residual   probab  std resid
Bt-20.2    40000.000     40.     10.      8.33     1.674    0.208     0.652
          4133333.000     40.     13.     14.97    -1.966    0.374    -0.642
        666666667.000     40.     22.     23.46    -1.457    0.586    -0.468
        *************     40.     32.     30.47     1.529    0.762     0.567
chi-square: 1.379     degrees of freedom: 2     heterogeneity: 0.689
Effective Doses
                  dose      limits    0.90     0.95     0.99
LC50  Bt-20.2    0.85119E+08  lower 0.15962E+08 0.11188E+08 0.51719E+07
                            upper 0.50011E+09 0.74802E+09 0.18578E+10
-----------------------------------------------------------------------
            parameter   standard error   t ratio
Bt-36.4       -1.961          0.376       -5.215
SLOPE         0.241          0.047        5.185
Variance-Covariance matrix
                Bt-36.4        SLOPE
  Bt-36.4      0.141395     -0.168005E-01
  SLOPE      -0.168005E-01  0.216520E-02
```

```
Chi-squared goodness of fit test
 prep           dose     n     r   expected  residual   probab  std resid
 Bt-36.4 36923.000     40.      9.      7.81     1.194    0.195     0.476
       3815385.000     40.     13.     14.18    -1.181    0.355    -0.390
     615384615.000     40.     21.     22.53    -1.534    0.563    -0.489
*************     40.     31.     29.65     1.352    0.741     0.488
 chi-square: 0.856     degrees of freedom: 2     heterogeneity: 0.428
 Effective Doses
                  dose      limits    0.90     0.95     0.99
 LC50  Bt-36.4     0.13433E+09  lower 0.25298E+08 0.17931E+08 0.85895E+07
                             upper 0.86263E+09 0.13359E+10 0.36657E+10
 ----------------------------------------------------------------------
            parameter   standard error   t ratio
 Bt-1.3       -1.948          0.376       -5.177
 SLOPE         0.234          0.046        5.064
 Variance-Covariance matrix
                Bt-1.3        SLOPE
   Bt-1.3      0.141678     -0.167373E-01
   SLOPE      -0.167373E-01  0.214370E-02
 Chi-squared goodness of fit test
 prep             dose      n       r   expected  residual   probab  std resid
 Bt-1.3      38400.000     40.      9.      7.65     1.354    0.191     0.545
          3968000.000     40.     12.     13.76    -1.762    0.344    -0.586
        640000000.000     40.     21.     21.85    -0.849    0.546    -0.270
        *************     40.     30.     28.90     1.104    0.722     0.390
 chi-square: 0.865     degrees of freedom: 2     heterogeneity: 0.433
 Effective Doses
                  dose      limits    0.90     0.95     0.99
 LC50  Bt-1.3     0.20457E+09  lower 0.37245E+08 0.26392E+08 0.12717E+08
                             upper 0.14768E+10 0.23854E+10 0.73896E+10
 ----------------------------------------------------------------------

            parameter   standard error   t ratio
 Bt-4.1      -1.932          0.375       -5.153
 SLOPE         0.231          0.046        4.996
 Variance-Covariance matrix
                Bt-4.1        SLOPE
   Bt-4.1      0.140559     -0.166465E-01
   SLOPE      -0.166465E-01  0.213857E-02
 Chi-squared goodness of fit test
 prep             dose      n       r   expected  residual   probab  std resid
 Bt-4.1      35556.000     40.      9.      7.57     1.426    0.189     0.575
          3674074.000     40.     12.     13.56    -1.565    0.339    -0.523
        592592593.000     40.     20.     21.52    -1.517    0.538    -0.481
        *************     40.     30.     28.52     1.480    0.713     0.517
 chi-square: 1.103     degrees of freedom: 2     heterogeneity: 0.552
 Effective Doses
                  dose      limits    0.90     0.95     0.99
 LC50  Bt-4.1    0.22950E+09  lower 0.40979E+08 0.29033E+08 0.14034E+08
                             upper 0.17751E+10 0.29409E+10 0.98177E+10
 ----------------------------------------------------------------------
 HYPOTHESIS OF EQUALITY (equal slopes, equal intercepts): NOT REJECTED (P>0.05)
    (chi-square: 0.59,  degrees of freedom: 6,  tail probability: 0.997)
 ----------------------------------------------------------------------
 ----------------------------------------------------------------------
 Lethal dose ratios (LD50)
              ratio      limits     0.95
 Bt-36.4       0.634      lower     0.037
                         upper    10.873
 Bt-1.3       0.416      lower     0.023
                         upper     7.555
 Bt-4.1      0.371      lower     0.020
                         upper     6.961
```

Bảng 28. Bảng Anova kết quả phân tích LT_{50} sâu tơ tuổi 2 và 4

		Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Tuổi 2	Between Groups	12,850	3	4,283	,909	,438
	Within Groups	735,050	156	4,712		
	Total	747,900	159			
Tuổi 4	Between Groups	12,350	3	4,117	,879	,454
	Within Groups	730,750	156	4,684		
	Total	743,100	159			

Bảng 29. Bảng Anova kết quả phân tích LT_{50} sâu khoang tuổi 2 và 4

		Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Tuổi 2	Between Groups	3.219	3	1.073	.262	.852
	Within Groups	638.125	156	4.091		
	Total	641.344	159			
Tuổi 4	Between Groups	5.669	3	1.890	.489	.690
	Within Groups	602.525	156	3.862		
	Total	608.194	159			

Bảng 30. Bảng Anova kết quả phân tích LT_{50} sâu xanh da láng tuổi 2 và 4

		Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Tuổi 2	Between Groups	8.169	3	2.723	.703	.552
	Within Groups	604.325	156	3.874		
	Total	612.494	159			
Tuổi 4	Between Groups	2.625	3	.875	.193	.901
	Within Groups	708.750	156	4.543		
	Total	711.375	159			

Bảng 31. Bảng Anova kết quả phân tích các dòng vi khuẩn chiếu tia UV ở bước sóng 254 nm ở các mức thời gian

		Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Chiếu UV 30 phút	Between Groups	.376	3	.125	2.756	.088
	Within Groups	.545	12	.045		
	Total	.921	15			
Chiếu UV 60 phút	Between Groups	10.863	3	3.621	45.232	.000
	Within Groups	.961	12	.080		
	Total	11.823	15			
Chiếu UV 90 phút	Between Groups	89.575	3	29.858	497.672	.000
	Within Groups	.720	12	.060		
	Total	90.295	15			
Chiếu UV 120 phút	Between Groups	41.237	3	13.746	2.374E3	.000
	Within Groups	.069	12	.006		
	Total	41.306	15			

Bảng 32. Bảng Anova kết quả phân tích các dòng vi khuẩn chiếu tia UV ở bước sóng 365 nm ở các mốc thời gian

		Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Chiếu UV 30 phút	Between Groups	.269	3	.090	.671	.586
	Within Groups	1.604	12	.134		
	Total	1.873	15			
Chiếu UV 60 phút	Between Groups	3.585	3	1.195	39.029	.000
	Within Groups	.367	12	.031		
	Total	3.952	15			
Chiếu UV 90 phút	Between Groups	9.561	3	3.187	37.031	.000
	Within Groups	1.033	12	.086		
	Total	10.594	15			
Chiếu UV 120 phút	Between Groups	76.861	3	25.620	2.558E3	.000
	Within Groups	.120	12	.010		
	Total	76.981	15			

Bảng 33. Bảng ANOVA kết quả phân tích hai dòng vi khuẩn VBt2110.1 và VBt26310.1 phòng trừ sâu tơ trong điều kiện phòng thí nghiệm

		Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
1 ngày sau phun	Between Groups	24.500	6	4.083	8.167	.000
	Within Groups	10.500	21	.500		
	Total	35.000	27			
2 ngày sau phun	Between Groups	70.214	6	11.702	25.868	.000
	Within Groups	9.500	21	.452		
	Total	79.714	27			
3 ngày sau phun	Between Groups	114.429	6	19.071	33.375	.000
	Within Groups	12.000	21	.571		
	Total	126.429	27			
5 ngày sau phun	Between Groups	139.214	6	23.202	57.324	.000
	Within Groups	8.500	21	.405		
	Total	147.714	27			
7 ngày sau phun	Between Groups	181.500	6	30.250	181.500	.000
	Within Groups	3.500	21	.167		
	Total	185.000	27			

Bảng 34a. Bảng ANOVA kết quả phân tích hai dòng vi khuẩn VBt2110.1 và VBt26310.1 phòng trừ sâu khoang trong điều kiện phòng thí nghiệm

		Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
1 ngày sau phun	Between Groups	26.857	6	4.476	15.667	.000
	Within Groups	6.000	21	.286		
	Total	32.857	27			
2 ngày sau phun	Between Groups	69.429	6	11.571	15.934	.000
	Within Groups	15.250	21	.726		
	Total	84.679	27			
3 ngày sau phun	Between Groups	97.357	6	16.226	26.725	.000
	Within Groups	12.750	21	.607		
	Total	110.107	27			

Bảng 34b. Bảng ANOVA kết quả phân tích hai dòng vi khuẩn VBt2110.1 và VBt26310.1 phòng trừ sâu khoang trong điều kiện phòng thí nghiệm

		Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
5 ngày sau phun	Between Groups	148.857	6	24.810	71.862	.000
	Within Groups	7.250	21	.345		
	Total	156.107	27			
7 ngày sau phun	Between Groups	181.357	6	30.226	59.047	.000
	Within Groups	10.750	21	.512		
	Total	192.107	27			

Bảng 35. Bảng ANOVA kết quả phân tích hai dòng vi khuẩn VBt2110.1 và VBt26310.1 phòng trừ sâu xanh da láng của trong điều kiện phòng thí nghiệm

		Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
1 ngày sau phun	Between Groups	45.357	6	7.560	16.711	.000
	Within Groups	9.500	21	.452		
	Total	54.857	27			
2 ngày sau phun	Between Groups	58.214	6	9.702	18.953	.000
	Within Groups	10.750	21	.512		
	Total	68.964	27			
3 ngày sau phun	Between Groups	77.429	6	12.905	29.297	.000
	Within Groups	9.250	21	.440		
	Total	86.679	27			
5 ngày sau phun	Between Groups	114.214	6	19.036	31.353	.000
	Within Groups	12.750	21	.607		
	Total	126.964	27			
7 ngày sau phun	Between Groups	165.214	6	27.536	74.613	.000
	Within Groups	7.750	21	.369		
	Total	172.964	27			

Bảng 36. Bảng Anova kết quả phân tích thống kê lên men bằng hệ thống lên men tự động 2 lít BioFlo 120

		Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Lên men 24 giờ	Between Groups	68.389	3	22.796	149.359	.000
	Within Groups	1.832	12	.153		
	Total	70.220	15			
Lên men 48 giờ	Between Groups	103.725	3	34.575	419.028	.000
	Within Groups	.990	12	.083		
	Total	104.715	15			

Bảng 37. Bảng Anova kết quả phân tích thống kê sử dụng chế phẩm VBt phòng trừ sâu tơ trong điều kiện nhà lưới

		Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
1 ngày sau phun	Between Groups	33.688	3	11.229	31.706	.000
	Within Groups	4.250	12	.354		
	Total	37.938	15			
2 ngày sau phun	Between Groups	05.688	3	35.229	112.733	.000
	Within Groups	3.750	12	.312		
	Total	109.438	15			
3 ngày sau phun	Between Groups	148.688	3	49.562	158.600	.000
	Within Groups	3.750	12	.312		
	Total	152.438	15			
5 ngày sau phun	Between Groups	175.688	3	58.562	187.400	.000
	Within Groups	3.750	12	.312		
	Total	179.438	15			
7 ngày sau phun	Between Groups	182.188	3	60.729	171.471	.000
	Within Groups	2.750	12	.229		
	Total	161.938	15			

Bảng 38. Bảng Anova kết quả phân tích thống kê sử dụng chế phẩm VBt phòng trừ sâu khoang trong điều kiện nhà lưới

		Sum of Squares	Df	M Square	F	Sig.
1 ngày sau phun	Between Groups	26.250	3	8.750	70.000	.000
	Within Groups	1.500	12	.125		
	Total	27.750	15			
2 ngày sau phun	Between Groups	86.250	3	28.750	98.571	.000
	Within Groups	3.500	12	.292		
	Total	89.750	15			
3 ngày sau phun	Between Groups	121.500	3	40.500	64.800	.000
	Within Groups	7.500	12	.625		
	Total	129.000	15			
5 ngày sau phun	Between Groups	159.688	3	53.229	150.294	.000
	Within Groups	4.250	12	.354		
	Total	163.938	15			
7 ngày sau phun	Between Groups	184.750	3	61.583	147.800	.000
	Within Groups	5.000	12	.417		
	Total	189.750	15			.000

Bảng 39. Bảng Anova kết quả phân tích thống kê sử dụng chế phẩm VBt phòng trừ sâu xanh da láng trong điều kiện nhà lưới

		Sum of Squares	Df	MSquare	F	Sig.
1 ngày sau phun	Between Groups	28.500	3	9.500	45.600	.000
	Within Groups	2.500	12	.208		
	Total	31.000	15			
2 ngày sau phun	Between Groups	87.188	3	29.062	45.000	.000
	Within Groups	7.750	12	.646		
	Total	94.938	15			
3 ngày sau phun	Between Groups	123.500	3	41.167	141.143	.000
	Within Groups	3.500	12	.292		
	Total	127.000	15			
5 ngày sau phun	Between Groups	146.688	3	48.896	156.467	.000
	Within Groups	3.750	12	.312		
	Total	150.438	15			
7 ngày sau phun	Between Groups	170.750	3	56.917	227.667	.000
	Within Groups	3.000	12	.250		
	Total	173.750	15			

Bảng 40. Bảng Anova kết quả phân tích thống kê sử dụng chế phẩm VBt phòng trừ sâu tơ trên cây cải ngoài đồng ruộng

		Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Trước khi phun	Between Groups	11.500	3	3.833	.503	.688
	Within Groups	91.500	12	7.625		
	Total	103.000	15			
1 ngày sau phun	Between Groups	148.188	3	49.396	21.360	.000
	Within Groups	27.750	12	2.312		
	Total	175.938	15			
3 ngày sau phun	Between Groups	303.188	3	101.062	112.814	.000
	Within Groups	10.750	12	.896		
	Total	313.938	15			
7 ngày sau phun	Between Groups	433.188	3	144.396	210.030	.000
	Within Groups	8.250	12	.688		
	Total	441.438	15			
14 ngày sau phun	Between Groups	296.250	3	98.750	103.043	.000
	Within Groups	11.500	12	.958		
	Total	307.750	15			

PHỤ LỤC 3.
SỐ LIỆU THÍ NGHIỆM

Bảng 2. Mật số (con/nghiệm thức) và hiệu lực (%) phòng trừ sâu tơ của các chủng vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* trong phòng thí nghiệm sau **7** ngày xử lý

NT	LLL 1	LLL 2	LLL 3	LLL 4	TB	Hiệu lực
VBt246.1	5	3	4	4	4,0	60,00
VBt2413.1	5	4	4	5	4,5	55,00
VBt2119.1	2	2	3	2	2,3	77,50
VBt21110.1	2	2	1	2	1,8	82,50
VBt25211.1	5	4	4	4	4,3	57,50
VBt281.3	2	3	2	2	2,3	77,50
VBt283.2	4	4	3	4	3,8	62,50
VBt2847	3	3	4	3	3,3	67,50
VBt2639.5	5	5	6	4	5,0	50,00
VBt26317.2	6	5	4	5	5,0	50,00
VBt26310.1	2	3	2	2	2,3	77,50
VBt2736.2	2	3	2	1	2,0	80,00
VBt27310	5	5	4	4	4,5	55,00
VBt2735.1	2	3	2	2	2,3	77,50
VBt2751	2	3	3	2	2,5	75,00
VBt2752.2	3	2	3	2	2,5	75,00
VBt2762.1	2	2	3	3	2,5	75,00
VBt2767.6	3	2	2	1	2,0	80,00
VBt27510	4	3	2	1	2,5	75,00
VBt27611	5	4	5	5	4,8	52,50
ĐC	10	10	10	10	10,0	0,0

Bảng 3. Mật số (con/nghiệm thức) và hiệu lực (%) phòng trừ sâu khoang của các chủng vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* trong phòng thí nghiệm sau 7 ngày xử lý

NT	LLL 1	LLL 2	LLL 3	LLL 4	TB	Hiệu lực
VBt246.1	4	5	5	4	4,5	55,00
VBt2413.1	6	6	6	5	5,8	42,50
VBt2119.1	3	3	2	3	2,8	72,50
VBt21110.1	3	2	2	2	2,3	77,50
VBt25211.1	4	4	5	4	4,3	57,50
VBt281.3	3	4	3	4	3,5	65,00
VBt283.2	5	6	5	4	5,0	50,00
VBt2847	4	5	3	6	4,5	55,00
VBt2639.5	5	5	4	5	4,8	52,50
VBt26317.2	4	5	3	5	4,3	57,50
VBt26310.1	2	2	2	2	2,0	80,00
VBt276311.2	3	2	3	3	2,8	72,50
VBt27310	5	6	4	4	4,8	52,50
VBt72735.1	1	2	3	3	2,3	77,50
VBt2751	1	4	2	3	2,5	75,00
VBt2752.2	4	3	3	2	3,0	70,00
VBt2762.1	3	2	2	2	2,3	77,50
VBt2767.6	2	3	3	4	3,0	70,00
VBt27510	3	4	3	2	3,0	70,00
VBt27611	4	4	3	4	3,8	62,50
ĐC	10	10	10	10	10,0	0,0

Bảng 4. Mật số (con/nghiệm thức) và hiệu lực (%) phòng trừ sâu xanh da láng của các chủng vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* trong phòng thí nghiệm sau 7 ngày xử lý

NT	LLL 1	LLL 2	LLL 3	LLL 4	TB	Hiệu lực
VBt246.1	5	7	6	5	5,8	42,50
VBt2413.1	6	5	7	6	6,0	40,00
VBt2119.1	3	2	4	3	3,0	70,00
VBt21110.1	3	3	3	2	2,8	72,50
VBt25211.1	7	6	6	6	6,3	37,50
VBt281.3	4	3	2	3	3,0	70,00
VBt283.2	5	4	5	5	4,8	52,50
VBt2847	6	5	4	5	5,0	50,00
VBt2639.5	5	6	5	6	5,5	45,00
VBt26317.2	6	5	4	5	5,0	50,00
VBt26310.1	2	3	2	3	2,5	75,00
VBt2736.2	2	2	3	3	2,5	75,00
VBt27310	4	4	4	4	4,0	60,00
VBt2735.1	3	2	2	3	2,5	75,00
VBt2751	2	4	3	3	3,0	70,00
VBt2752.2	4	2	3	3	3,0	70,00
VBt2762.1	4	3	4	3	3,5	65,00
VBt2767.6	4	3	2	2	2,8	72,50
VBt27510	4	4	3	3	3,5	65,00
VBt27611	6	5	7	5	5,8	42,50
ĐC	10	10	10	10	10,0	0,0

Bảng 5a. Diễn biến mật số các chủng vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (CFU/mL) sau khi chiếu UV ở bước sóng 254 nm

Nghiệm thức	Lần lặp lại	Mật số vi khuẩn (CFU/mL)				
		0 phút (ĐC)	30 phút	60 phút	90 phút	120 phút
VBt2119.1	1	$2,0 \times 10^8$	0	0	0	0
	2	$2,0 \times 10^8$	0	0	0	0
	3	$2,0 \times 10^8$	$1,2 \times 10^3$	0	0	0
	4	$2,0 \times 10^8$	0	0	0	0
VBt21110.1	1	$2,0 \times 10^8$	$8,4 \times 10^6$	$3,2 \times 10^6$	$9,2 \times 10^4$	$4,2 \times 10^3$
	2	$2,0 \times 10^8$	$5,8 \times 10^6$	$5,2 \times 10^5$	$6,4 \times 10^4$	$3,5 \times 10^3$
	3	$2,0 \times 10^8$	$4,8 \times 10^6$	$9,9 \times 10^5$	$7,0 \times 10^4$	$6,5 \times 10^3$
	4	$2,0 \times 10^8$	$9,0 \times 10^6$	$7,0 \times 10^5$	$2,8 \times 10^5$	$7,2 \times 10^3$
VBt26310.1	1	$2,0 \times 10^8$	$1,5 \times 10^7$	$2,1 \times 10^4$	$5,1 \times 10^3$	0
	2	$2,0 \times 10^8$	$5,9 \times 10^5$	$1,8 \times 10^4$	$6,7 \times 10^3$	$1,1 \times 10^3$
	3	$2,0 \times 10^8$	$6,5 \times 10^6$	$2,7 \times 10^4$	$1,8 \times 10^4$	0
	4	$2,0 \times 10^8$	$2,8 \times 10^5$	0	0	0
VBt26311.1	1	$2,0 \times 10^8$	$2,5 \times 10^6$	$6,5 \times 10^3$	$5,4 \times 10^2$	0
	2	$2,0 \times 10^8$	$2,1 \times 10^6$	$5,3 \times 10^3$	$4,0 \times 10^3$	0
	3	$2,0 \times 10^8$	$3,0 \times 10^6$	$3,2 \times 10^3$	0	0
	4	$2,0 \times 10^8$	$1,9 \times 10^6$	$3,5 \times 10^3$	0	0

Bảng 5b. Diễn biến mật số các chủng vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (CFU/mL) sau khi chiếu UV ở bước sóng 254 nm

Nghiệm thức	Lần lặp lại	Mật số vi khuẩn (CFU/mL)				
		0 phút (ĐC)	30 phút	60 phút	90 phút	120 phút
VBt26317.3	1	$2,0 \times 10^8$	$3,7 \times 10^6$	$3,0 \times 10^6$	$2,0 \times 10^3$	0
	2	$2,0 \times 10^8$	$4,2 \times 10^6$	$2,3 \times 10^6$	$3,2 \times 10^4$	0
	3	$2,0 \times 10^8$	$3,0 \times 10^6$	$4,4 \times 10^6$	$4,4 \times 10^3$	0
	4	$2,0 \times 10^8$	$5,0 \times 10^6$	$4,1 \times 10^6$	$4,5 \times 10^4$	0
VBt2813	1	$2,0 \times 10^8$	$5,1 \times 10^6$	$4,0 \times 10^4$	0	0
	2	$2,0 \times 10^8$	$6,7 \times 10^6$	$3,4 \times 10^4$	$2,2 \times 10^3$	0
	3	$2,0 \times 10^8$	$4,3 \times 10^6$	$2,3 \times 10^4$	$2,5 \times 10^3$	0
	4	$2,0 \times 10^8$	$5,5 \times 10^6$	$1,0 \times 10^4$	0	0
VBt2735.1	1	$2,0 \times 10^8$	$1,1 \times 10^4$	0	0	0
	2	$2,0 \times 10^8$	$6,1 \times 10^5$	$2,7 \times 10^3$	0	0
	3	$2,0 \times 10^8$	$6,6 \times 10^3$	0	0	0
	4	$2,0 \times 10^8$	$2,8 \times 10^5$	0	0	0
VBt2736.2	1	$2,0 \times 10^8$	$2,0 \times 10^6$	$7,8 \times 10^3$	0	0
	2	$2,0 \times 10^8$	$3,1 \times 10^6$	$8,3 \times 10^3$	0	0
	3	$2,0 \times 10^8$	$5,0 \times 10^6$	$4,0 \times 10^3$	0	0
	4	$2,0 \times 10^8$	$1,9 \times 10^6$	$4,9 \times 10^3$	0	0

Bảng 5c. Diễn biến mật độ của các chủng vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (CFU/mL) sau khi chiếu UV ở bước sóng 254 nm

Nghiệm thức	Lần lặp lại	Mật độ vi khuẩn (CFU/mL)				
		0 phút (ĐC)	30 phút	60 phút	90 phút	120 phút
VBt2751	1	$2,0 \times 10^8$	$7,4 \times 10^6$	$3,2 \times 10^6$	$5,2 \times 10^4$	$3,2 \times 10^3$
	2	$2,0 \times 10^8$	$4,3 \times 10^6$	$3,2 \times 10^5$	$4,5 \times 10^4$	$2,5 \times 10^3$
	3	$2,0 \times 10^8$	$4,1 \times 10^6$	$6,2 \times 10^5$	$2,9 \times 10^4$	$4,3 \times 10^3$
	4	$2,0 \times 10^8$	$3,0 \times 10^6$	$4,0 \times 10^5$	$3,8 \times 10^5$	$6,1 \times 10^3$
VBt27510	1	$2,0 \times 10^8$	$1,7 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6$	$1,0 \times 10^4$	0
	2	$2,0 \times 10^8$	$6,2 \times 10^6$	$3,0 \times 10^6$	$6,2 \times 10^4$	0
	3	$2,0 \times 10^8$	$2,2 \times 10^6$	$1,4 \times 10^6$	$1,4 \times 10^4$	0
	4	$2,0 \times 10^8$	$8,0 \times 10^6$	$3,1 \times 10^6$	$4,9 \times 10^4$	0
VBt2762.1	1	$2,0 \times 10^8$	$1,1 \times 10^6$	$1,1 \times 10^5$	$3,7 \times 10^3$	0
	2	$2,0 \times 10^8$	$6,3 \times 10^6$	$2,7 \times 10^6$	$1,8 \times 10^3$	0
	3	$2,0 \times 10^8$	$2,2 \times 10^5$	$6,7 \times 10^5$	$1,2 \times 10^3$	0
	4	$2,0 \times 10^8$	$2,2 \times 10^5$	$1,3 \times 10^5$	$8,2 \times 10^3$	0
VBt2767.6	1	$2,0 \times 10^8$	$7,1 \times 10^6$	$1,0 \times 10^4$	0	0
	2	$2,0 \times 10^8$	$7,7 \times 10^6$	$3,9 \times 10^4$	0	0
	3	$2,0 \times 10^8$	$4,0 \times 10^6$	$4,3 \times 10^4$	0	0
	4	$2,0 \times 10^8$	$5,0 \times 10^6$	$1,1 \times 10^4$	0	0

Bảng 6a. Diễn biến mật độ của các chủng vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (CFU/mL) sau khi chiếu UV ở bước sóng 365 nm

Nghiệm thức	Lần lặp lại	Mật độ vi khuẩn (CFU/mL)				
		0 phút (ĐC)	30 phút	60 phút	90 phút	120 phút
VBt2119.1	1	$2,0 \times 10^8$	$5,6 \times 10^5$	$5,5 \times 10^5$	$1,3 \times 10^3$	0
	2	$2,0 \times 10^8$	$9,3 \times 10^5$	$6,3 \times 10^5$	$4,8 \times 10^4$	$1,1 \times 10^3$
	3	$2,0 \times 10^8$	$2,8 \times 10^5$	$7,6 \times 10^4$	0	0
	4	$2,0 \times 10^8$	$7,7 \times 10^4$	$2,1 \times 10^5$	$8,2 \times 10^4$	0
VBt21110.1	1	$2,0 \times 10^8$	$4,8 \times 10^6$	$4,6 \times 10^6$	$3,3 \times 10^5$	$1,1 \times 10^5$
	2	$2,0 \times 10^8$	$8,4 \times 10^6$	$3,4 \times 10^6$	$8,4 \times 10^4$	$4,1 \times 10^4$
	3	$2,0 \times 10^8$	$9,4 \times 10^6$	$5,8 \times 10^6$	$5,2 \times 10^4$	$4,5 \times 10^4$
	4	$2,0 \times 10^8$	$5,9 \times 10^7$	$8,4 \times 10^6$	$3,5 \times 10^5$	$5,3 \times 10^4$
VBt26310.1	1	$2,0 \times 10^8$	$2,1 \times 10^7$	$9,3 \times 10^6$	$7,1 \times 10^6$	$4,2 \times 10^5$
	2	$2,0 \times 10^8$	$1,9 \times 10^8$	$4,6 \times 10^6$	$2,8 \times 10^6$	$7,5 \times 10^5$
	3	$2,0 \times 10^8$	$3,5 \times 10^7$	$1,3 \times 10^7$	$6,2 \times 10^5$	$1,1 \times 10^3$
	4	$2,0 \times 10^8$	$1,7 \times 10^8$	$3,2 \times 10^7$	$2,3 \times 10^6$	$7,5 \times 10^4$
VBt26311.1	1	$2,0 \times 10^8$	$5,7 \times 10^5$	$5,5 \times 10^3$	$1,3 \times 10^3$	0
	2	$2,0 \times 10^8$	$9,4 \times 10^5$	$4,3 \times 10^4$	$4,8 \times 10^3$	0
	3	$2,0 \times 10^8$	$3,8 \times 10^5$	$7,6 \times 10^4$	$2,8 \times 10^4$	$1,1 \times 10^3$
	4	$2,0 \times 10^8$	$6,7 \times 10^4$	$4,1 \times 10^5$	$5,2 \times 10^4$	0

Bảng 6b. Diễn biến mật độ của các chủng vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (CFU/mL) sau khi chiếu UV ở bước sóng 365 nm

Nghiệm thức	Lần lặp lại	Mật độ vi khuẩn (CFU/mL)				
		0 phút (ĐC)	30 phút	60 phút	90 phút	120 phút
VBt26317.3	1	$2,0 \times 10^8$	$6,5 \times 10^6$	$1,2 \times 10^6$	$2,5 \times 10^5$	$3,2 \times 10^3$
	2	$2,0 \times 10^8$	$8,5 \times 10^6$	$1,5 \times 10^6$	$6,5 \times 10^4$	$5,2 \times 10^3$
	3	$2,0 \times 10^8$	$2,1 \times 10^7$	$1,2 \times 10^6$	$7,2 \times 10^4$	$4,4 \times 10^3$
	4	$2,0 \times 10^8$	$5,4 \times 10^6$	$8,4 \times 10^5$	$4,9 \times 10^5$	$6,8 \times 10^3$
VBt2813	1	$2,0 \times 10^8$	$4,6 \times 10^7$	$1,2 \times 10^7$	$5,8 \times 10^6$	$3,7 \times 10^4$
	2	$2,0 \times 10^8$	$6,7 \times 10^6$	$2,5 \times 10^6$	$2,2 \times 10^5$	$3,3 \times 10^4$
	3	$2,0 \times 10^8$	$5,2 \times 10^7$	$2,4 \times 10^6$	$4,2 \times 10^5$	$2,7 \times 10^4$
	4	$2,0 \times 10^8$	$4,1 \times 10^7$	$3,3 \times 10^6$	$6,1 \times 10^4$	$1,1 \times 10^4$
VBt2735.1	1	$2,0 \times 10^8$	$3,6 \times 10^7$	$1,2 \times 10^7$	$5,8 \times 10^6$	$4,7 \times 10^4$
	2	$2,0 \times 10^8$	$8,9 \times 10^6$	$3,5 \times 10^6$	$1,2 \times 10^5$	$5,3 \times 10^4$
	3	$2,0 \times 10^8$	$8,2 \times 10^7$	$2,7 \times 10^7$	$7,2 \times 10^5$	$1,8 \times 10^4$
	4	$2,0 \times 10^8$	$5,1 \times 10^6$	$3,3 \times 10^7$	$7,1 \times 10^4$	$1,6 \times 10^4$
VBt2736.2	1	$2,0 \times 10^8$	$7,2 \times 10^6$	$3,7 \times 10^5$	$4,0 \times 10^3$	0
	2	$2,0 \times 10^8$	$3,4 \times 10^7$	$2,0 \times 10^5$	$2,7 \times 10^3$	0
	3	$2,0 \times 10^8$	$9,0 \times 10^6$	$5,6 \times 10^5$	$3,7 \times 10^3$	0
	4	$2,0 \times 10^8$	$2,6 \times 10^7$	$6,2 \times 10^5$	$5,0 \times 10^3$	0

Bảng 6c. Diễn biến mật độ của các chủng vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (CFU/mL) sau khi chiếu UV ở bước sóng 365 nm

Nghiệm thức	Lần lặp lại	Mật độ vi khuẩn (CFU/mL)				
		0 phút (ĐC)	30 phút	60 phút	90 phút	120 phút
VBt2751	1	$2,0 \times 10^8$	$4,3 \times 10^6$	$4,6 \times 10^6$	$3,3 \times 10^5$	$1,1 \times 10^5$
	2	$2,0 \times 10^8$	$6,4 \times 10^6$	$3,4 \times 10^6$	$8,4 \times 10^4$	$4,1 \times 10^4$
	3	$2,0 \times 10^8$	$7,4 \times 10^6$	$5,8 \times 10^6$	$5,2 \times 10^4$	$4,5 \times 10^4$
	4	$2,0 \times 10^8$	$4,5 \times 10^7$	$8,4 \times 10^6$	$3,5 \times 10^5$	$5,3 \times 10^4$
VBt27510	1	$2,0 \times 10^8$	$9,5 \times 10^6$	$1,4 \times 10^6$	$3,5 \times 10^5$	$8,0 \times 10^3$
	2	$2,0 \times 10^8$	$5,5 \times 10^6$	$1,2 \times 10^6$	$7,5 \times 10^4$	$8,0 \times 10^3$
	3	$2,0 \times 10^8$	$1,1 \times 10^7$	$1,6 \times 10^6$	$9,0 \times 10^4$	$9,0 \times 10^3$
	4	$2,0 \times 10^8$	$7,4 \times 10^6$	$9,3 \times 10^5$	$3,8 \times 10^5$	$9,8 \times 10^3$
VBt2762.1	1	$2,0 \times 10^8$	$2,8 \times 10^7$	$2,7 \times 10^7$	$5,1 \times 10^6$	$2,9 \times 10^5$
	2	$2,0 \times 10^8$	$1,5 \times 10^7$	$3,7 \times 10^6$	$1,2 \times 10^6$	$5,8 \times 10^5$
	3	$2,0 \times 10^8$	$3,6 \times 10^7$	$1,8 \times 10^7$	$7,2 \times 10^6$	$6,5 \times 10^4$
	4	$2,0 \times 10^8$	$7,7 \times 10^7$	$6,9 \times 10^7$	$2,5 \times 10^6$	$5,9 \times 10^5$
VBt2767.6	1	$2,0 \times 10^8$	$6,1 \times 10^6$	$3,6 \times 10^6$	$7,8 \times 10^3$	0
	2	$2,0 \times 10^8$	$1,5 \times 10^7$	$8,4 \times 10^6$	$5,6 \times 10^3$	0
	3	$2,0 \times 10^8$	$5,6 \times 10^6$	$4,0 \times 10^6$	$6,5 \times 10^3$	0
	4	$2,0 \times 10^8$	$1,9 \times 10^7$	$7,8 \times 10^6$	$3,8 \times 10^3$	0

Bảng 7a. Mật số (con/nghiệm thức) và hiệu lực (%) phòng trừ sâu tơ của các chủng vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* chiếu tia UV

Nghiệm thức	Số sâu sống (con/nghiệm thức)				TB
1 NSXL	**LLL 1**	**LLL 2**	**LLL 3**	**LLL 4**	
VBt21110.1UV	8	8	9	9	8.5
VBt26310.1UV	8	10	10	9	9.3
VBt2751UV	9	9	9	9	9.0
VBt21110.1	7	6	7	8	7,0
VBt26310.1	8	9	7	8	8,0
VBt2751	9	7	9	7	7,8
ĐC	10	10	10	10	10.0
2 NSXL	**LLL 1**	**LLL 2**	**LLL 3**	**LLL 4**	**TB**
VBt21110.1UV	5	6	6	7	6.0
VBt26310.1UV	8	9	9	8	8.5
VBt2751UV	8	8	8	9	8.3
VBt21110.1	6	5	5	4	5.0
VBt26310.1	7	6	7	6	6.5
VBt2751	8	6	7	6	6.8
ĐC	10	10	10	10	10.0
3 NSXL	**LLL 1**	**LLL 2**	**LLL 3**	**LLL 4**	**TB**
VBt21110.1UV	5	5	4	5	4.8
VBt26310.1UV	8	8	9	8	8.3
VBt2751UV	7	6	7	8	7.0
VBt21110.1	5	3	4	3	3.8
VBt26310.1	6	5	6	5	5.5
VBt2751	7	5	4	5	5.3
ĐC	10	10	10	10	10.0

Bảng 7b. Mật số (con/nghiệm thức) và hiệu lực (%) phòng trừ sâu tơ của các chủng vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* chiếu tia UV

5 NSXL	LLL 1	LLL 2	LLL 3	LLL 4	TB
VBt21110.1UV	4	3	5	4	4.0
VBt26310.1UV	6	6	7	7	6.5
VBt2751UV	5	6	6	5	5.5
VBt21110.1	3	2	3	3	2,8
VBt26310.1	5	4	5	4	4,5
VBt2751	5	4	3	3	3,8
ĐC	10	10	10	10	10.0
7 NSXL	**LLL 1**	**LLL 2**	**LLL 3**	**LLL 4**	**TB**
VBt21110.1UV	3	3	4	4	3.5
VBt26310.1UV	5	6	6	5	5.5
VBt2751UV	5	5	5	5	5.0
VBt21110.1	2	2	2	2	2,0
VBt26310.1	3	3	3	3	3,0
VBt2751	3	2	2	2	2,3
ĐC	10	10	10	10	10.0

Bảng 7c Hiệu quả gây chết (%) sâu tơ của các chủng vi khuẩn đã được chiếu tia UV

Dòng vi khuẩn	Hiệu quả gây chết (%) sâu tơ				
	1 NSXL	2 NSXL	3 NSXL	5 NSXL	7 NSXL
VBt21110.1ΔUV	15,0 bcd	40,0 b	52,5 ab	60,0 b	65,0 b
VBt26310.1ΔUV	7,5 cde	15,0 c	17,5 c	35,0 b	45,0 c
VBt2751ΔUV	10,0 de	17,5 c	30,0 d	45,0 d	50,0 c
VBt21110.1	30,0 a	50,0 a	62,5 a	72,5 a	80,0 a
VBt26310.1	20,0 ab	35,0 b	45,0 b	55,0 b	70,0 b
VBt2751	22,5 abc	32,5 b	47,5 b	62,5 b	77,5 a
ĐC	0,0 e	0,0 d	0,0 e	0,0 e	0,0 d
Mức ý nghĩa	**	**	**	**	**
CV (%)	5,4	4,7	8,0	7,8	8,2

*Trong cùng 1 cột, các giá trị có chữ cái theo sau giống nhau thì sự khác biệt không có ý nghĩa; **: khác biệt ở mức rất có ý nghĩa; NSXL: Ngày sau xử lý; Mật độ vi khuẩn 10^8 CFU/mL, Đối chứng phun nước cất với liều lượng là 100 ml.*

Bảng 8a. Mật số (con/nghiệm thức) và hiệu lực (%) phòng trừ sâu khoang của các chủng vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* chiếu tia UV

Nghiệm thức	Số sâu sống (con/nghiệm thức)				TB
1 NSXL	**LLL 1**	**LLL 2**	**LLL 3**	**LLL 4**	
VBt21110.1UV	9	8	9	9	8.8
VBt26310.1UV	9	9	9	9	9.0
VBt2751UV	9	9	9	10	9.3
VBt21110.1	7	6	7	7	6,8
VBt26310.1	9	8	9	8	8,5
VBt2751	9	7	7	8	7,8
ĐC	10	10	10	10	10.0
2 NSXL	**LLL 1**	**LLL 2**	**LLL 3**	**LLL 4**	**TB**
VBt21110.1UV	9	7	8	8	8.0
VBt26310.1UV	8	9	8	8	8.3
VBt2751UV	9	8	9	8	8.5
VBt21110.1	6	5	5	6	5,5
VBt26310.1	8	8	7	8	7,8
VBt2751	8	4	5	6	5,8
ĐC	10	10	10	10	10.0
3 NSXL	**LLL 1**	**LLL 2**	**LLL 3**	**LLL 4**	**TB**
VBt21110.1UV	8	6	7	7	7.0
VBt26310.1UV	8	7	7	9	7.8
VBt2751UV	8	7	9	8	8.0
VBt21110.1	5	4	4	4	4,3
VBt26310.1	6	6	7	5	6,0
VBt2751	6	4	5	5	5,0
ĐC	10	10	10	10	10.0

Bảng 8b. Mật số (con/nghiệm thức) và hiệu lực (%) phòng trừ sâu khoang của các chủng vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* chiếu tia UV

5 NSXL	LLL 1	LLL 2	LLL 3	LLL 4	TB
VBt21110.1UV	6	5	7	5	5.8
VBt26310.1UV	6	6	7	7	6.5
VBt2751UV	7	8	7	8	7.5
VBt21110.1	4	2	3	3	3,0
VBt26310.1	5	5	5	4	4,8
VBt2751	4	3	4	4	3,8
ĐC	10	10	10	10	10.0
7 NSXL	**LLL 1**	**LLL 2**	**LLL 3**	**LLL 4**	**TB**
VBt21110.1UV	4	4	5	4	4.3
VBt26310.1UV	5	4	5	6	5.0
VBt2751UV	7	6	7	7	6.8
VBt21110.1	3	2	2	2	2,3
VBt26310.1	4	4	3	2	3,3
VBt2751	3	3	2	3	2,8
ĐC	10	10	10	10	10.0

Bảng 8c. Hiệu lực gây chết (%) sâu khoang của các chủng vi khuẩn đã được chiếu tia UV

Chủng vi khuẩn	Hiệu quả gây chết (%)sâu khoang				
	1 NSXL	2 NSXL	3 NSXL	5 NSXL	7 NSXL
VBt21110.1ΔUV	12,5 c	20,0 b	30,0 cd	42,5 d	57,5 c
VBt26310.1ΔUV	10,0 c	17,5 b	22,5 d	35,0 d	50,0 c
VBt2751ΔUV	7,5 cd	15,0 b	20,0 d	25,0 e	32,5 d
VBt21110.1	32,5 a	45,0 a	57,5 a	70,0 a	77,5 a
VBt26310.1	15,0 bc	22,5 b	40,0 bc	52,5 c	67,5 b
VBt2751	22,5 b	42,5 a	50,0 a	62,5 b	72,5 a
ĐC	0,0 d	0,0 c	0,0 e	0,0 f	0,0 e
Mức ý nghĩa	**	**	**	**	**
CV (%)	6,3	10,9	10,1	6,3	3,9

*Trong cùng 1 cột, các giá trị có chữ cái theo sau giống nhau thì sự khác biệt không có ý nghĩa; **: khác biệt ở mức rất có ý nghĩa; NSXL: Ngày sau xử lý; Mật độ vi khuẩn 10^8 CFU/mL, Đối chứng phun nước cất với liều lượng là 100 ml.*

Bảng 9a. Mật số (con/nghiệm thức) và hiệu lực (%) phòng trừ sâu xanh da láng của vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* chiếu tia UV

Nghiệm thức	Số sâu sống (con/nghiệm thức)				TB
1 NSXL	**LLL 1**	**LLL 2**	**LLL 3**	**LLL 4**	
VBt21110.1UV	10	8	9	8	8.8
VBt26310.1UV	10	9	9	10	9.5
VBt2751UV	10	10	10	10	10.0
VBt21110.1	7	7	6	6	6,5
VBt26310.1	8	9	8	7	8,0
VBt2751	8	7	8	6	7,3
ĐC	10	10	10	10	10.0
2 NSXL	**LLL 1**	**LLL 2**	**LLL 3**	**LLL 4**	**TB**
VBt21110.1UV	8	8	7	6	7.3
VBt26310.1UV	8	9	8	8	8.3
VBt2751UV	9	9	8	8	8.5
VBt21110.1	5	6	5	5	5,3
VBt26310.1	8	8	7	6	7,3
VBt2751	7	8	7	5	6,3
ĐC	10	10	10	10	10.0
3 NSXL	**LLL 1**	**LLL 2**	**LLL 3**	**LLL 4**	**TB**
VBt21110.1UV	7	8	6	6	6.8
VBt26310.1UV	8	8	7	7	7.5
VBt2751UV	8	8	7	8	7.8
VBt21110.1	4	5	5	4	4,5
VBt26310.1	7	7	6	6	6,5
VBt2751	6	5	6	4	5,3
ĐC	10	10	10	10	10.0

Bảng 9b. *B. thuringiensis* var. *kurstaki* phòng trừ sâu xanh da láng của các chủng vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* chiếu tia UV

5 NSXL	LLL 1	LLL 2	LLL 3	LLL 4	TB
VBt21110.1UV	6	7	6	6	6.3
VBt26310.1UV	7	6	6	7	6.5
VBt2751UV	8	7	6	7	7.0
VBt21110.1	4	5	3	2	3,5
VBt26310.1	5	6	5	4	5,0
VBt2751	4	5	4	3	4,0
ĐC	10	10	10	10	10.0
7 NSXL	**LLL 1**	**LLL 2**	**LLL 3**	**LLL 4**	**TB**
VBt21110.1UV	5	5	5	4	4.8
VBt26310.1UV	4	6	5	6	5.3
VBt2751UV	7	6	6	6	6.3
VBt21110.1	3	2	2	2	2,3
VBt26310.1	4	3	3	3	3,3
VBt2751	3	4	2	3	3,0
ĐC	10	10	10	10	10.0

Bảng 9c. Hiệu quả gây chết (%) sâu xanh da láng của các chủng vi khuẩn đã được chiếu tia UV

Chủng vi khuẩn	Hiệu quả gây chết (%) sâu xanh da láng				
	1 NSXL	2 NSXL	3 NSXL	5 NSXL	7 NSXL
VBt21110.1ΔUV	12,5 cd	27,5 bc	32,5 bc	37,5 b	52,5 c
VBt26310.1ΔUV	5,0 de	17,5 cd	25,0 bc	35,0 b	47,5 c
VBt2751ΔUV	0,0 e	15,0 d	22,5 c	30,0 b	37,5 d
VBt21110.1	35,0 a	47,5 a	55,0 a	65,0 a	77,5 a
VBt26310.1	20,0 bc	27,5 bc	35,0 b	50,0 b	67,5 b
VBt2751	27,5 ab	37,5 ab	47,5 a	60,0 ab	70,0 ab
ĐC	0,0 e	0,0 e	0,0 d	0,0 d	0,0 e
Mức ý nghĩa	**	**	**	**	**
CV (%)	7,6	3,6	7,1	8,9	7,4

*Trong cùng 1 cột, các giá trị có chữ cái theo sau giống nhau thì sự khác biệt không có ý nghĩa; **: khác biệt ở mức rất có ý nghĩa; NSXL: Ngày sau xử lý; Mật độ vi khuẩn 10^8 CFU/mL, Đối chứng phun nước cất với liều lượng là 100 ml.*

Bảng 10. Diễn biến mật độ của các chủng vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (CFU/mL) ở các môi trường

Nghiệm thức	Lần lặp lại	Mật độ vi khuẩn (CFU/mL)			
		MT1	MT2	MT3	MT4
VBt21110.1	1	$5,2 \times 10^8$	$6,1 \times 10^7$	$5,5 \times 10^8$	$2,0 \times 10^8$
	2	$4,9 \times 10^8$	$5,0 \times 10^7$	$6,9 \times 10^8$	$3,7 \times 10^8$
	3	$5,0 \times 10^8$	$4,6 \times 10^7$	$7,0 \times 10^8$	$3,4 \times 10^8$
	4	$5,2 \times 10^8$	$5,0 \times 10^7$	$7,2 \times 10^8$	$3,0 \times 10^8$
VBt26310.1	1	$3,0 \times 10^8$	$1,0 \times 10^8$	$5,0 \times 10^8$	$1,5 \times 10^8$
	2	$3,5 \times 10^8$	$7,3 \times 10^7$	$6,5 \times 10^8$	$1,1 \times 10^8$
	3	$3,2 \times 10^8$	$5,6 \times 10^7$	$4,4 \times 10^8$	$2,0 \times 10^8$
	4	$3,3 \times 10^8$	$5,3 \times 10^7$	$4,7 \times 10^8$	$1,7 \times 10^8$
VBt2751	1	$2,1 \times 10^8$	$4,1 \times 10^7$	$3,8 \times 10^8$	$1,7 \times 10^8$
	2	$2,1 \times 10^8$	$3,2 \times 10^7$	$3,5 \times 10^8$	$1,55 \times 10^8$
	3	$2,05 \times 10^8$	$3,7 \times 10^7$	$3,4 \times 10^8$	$1,1 \times 10^8$
	4	$2,0 \times 10^8$	$3,3 \times 10^7$	$4,0 \times 10^8$	$1,5 \times 10^8$

Bảng 11. Diễn biến mật độ của các chủng vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (CFU/mL) ở các mức thời gian

Nghiệm thức	Lần lặp lại	Mật độ vi khuẩn (CFU/mL)				
		24	36	48	60	72
VBt21110.1	1	3,98 x 10^7	5,6 x 10^7	5,5 x 10^8	2,7 x 10^8	6,6 x 10^7
	2	4,0 x 10^7	4,7 x 10^7	7,0 x 10^8	3,6 x 10^8	4,4 x 10^7
	3	3,7 x 10^7	5,0 x 10^7	7,5 x 10^8	3,0 x 10^8	5,8 x 10^7
	4	4,1 x 10^7	5,5 x 10^7	7,2 x 10^8	3,5 x 10^8	6,5 x 10^7
VBt26310.1	1	5,1 x 10^8	7,5 x 10^7	5,8 x 10^8	2,5 x 10^8	4,5 x 10^7
	2	4,2x 10^7	7,3 x 10^7	5,4 x 10^8	3,1 x 10^8	3,5 x 10^7
	3	3,8 x 10^7	5,4 x 10^7	4,7 x 10^8	2,5 x 10^8	3,4 x 10^7
	4	5,1 x 10^7	5,3 x 10^7	5,1 x 10^8	2,7 x 10^8	2,9 x 10^7
VBt2751	1	4,2 x 10^7	6,3 x 10^7	5,5 x 10^8	2,3 x 10^8	3,3 x 10^7
	2	3,4 x 10^7	5,4 x 10^7	6,9 x 10^8	2,7 x 10^8	2,4 x 10^7
	3	3,2 x 10^7	5,8 x 10^7	4,5 x 10^8	3,4 x 10^8	1,8 x 10^7
	4	3,7 x 10^7	6,0 x 10^7	6,2 x 10^8	3,3 x 10^8	4,0 x 10^7

Bảng 12. Diễn biến mật độ của các chủng vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (CFU/mL) ở các mức pH

Nghiệm thức	Lần lặp lại	Mật đội khuẩn (CFU/mL)				
		6	**6.5**	**7**	**7.5**	**8**
VBt21110.1	1	$1,9 \times 10^8$	$3,0 \times 10^8$	$3,7 \times 10^8$	$4,1 \times 10^8$	$4,1 \times 10^8$
	2	$2,6 \times 10^8$	$2,5 \times 10^8$	$4,8 \times 10^8$	$4,2 \times 10^8$	$7,1 \times 10^8$
	3	$2,2 \times 10^8$	$2,7 \times 10^8$	$4,1 \times 10^8$	$4,7 \times 10^8$	$4,5 \times 10^8$
	4	$2,5 \times 10^8$	$2,8 \times 10^8$	$3,5 \times 10^8$	$5,0 \times 10^8$	$5,5 \times 10^8$
VBt26310.1	1	$2,7 \times 10^8$	$4,1 \times 10^8$	$3,5 \times 10^8$	$5,4 \times 10^8$	$1,5 \times 10^8$
	2	$2,4 \times 10^8$	$3,5 \times 10^8$	$4,1 \times 10^8$	$5,5 \times 10^8$	$2,5 \times 10^8$
	3	$2,8 \times 10^8$	$2,4 \times 10^8$	$3,1 \times 10^8$	$6,4 \times 10^8$	$1,2 \times 10^8$
	4	$2,5 \times 10^8$	$2,7 \times 10^8$	$3,7 \times 10^8$	$7,3 \times 10^8$	$2,2 \times 10^8$
VBt2751	1	$1,3 \times 10^8$	$3,1 \times 10^8$	$4,1 \times 10^8$	$8,2 \times 10^7$	$5,0 \times 10^7$
	2	$1,9 \times 10^8$	$2,9 \times 10^8$	$4,0 \times 10^8$	$7,5 \times 10^7$	$8,1 \times 10^7$
	3	$2,4 \times 10^8$	$2,4 \times 10^8$	$4,4 \times 10^8$	$4,7 \times 10^8$	$4,0 \times 10^8$
	4	$1,4 \times 10^8$	$3,2 \times 10^8$	$5,0 \times 10^8$	$5,3 \times 10^8$	$5,2 \times 10^8$

Bảng 13. Diễn biến mật độ của các chủng vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (CFU/mL) ở các mức nhiệt độ

Nghiệm thức	Lần lặp lại	Mật độ vi khuẩn (CFU/g)				
		27	30	33	36	39
VBt21110.1	1	$3,5 \times 10^8$	$5,1 \times 10^8$	$5,4 \times 10^8$	$2,1 \times 10^8$	$1,5 \times 10^8$
	2	$2,4 \times 10^8$	30×10^8	$5,5 \times 10^8$	$1,5 \times 10^8$	$1,5 \times 10^8$
	3	$3,8 \times 10^8$	$3,6 \times 10^8$	$6,4 \times 10^8$	$2,2 \times 10^8$	$1,2 \times 10^8$
	4	$3,5 \times 10^8$	$3,5 \times 10^8$	$7,3 \times 10^8$	$1,3 \times 10^8$	$2,2 \times 10^8$
VBt26310.1	1	$1,9 \times 10^8$	$4,0 \times 10^8$	$4,7 \times 10^8$	$1,6 \times 10^8$	$7,0 \times 10^7$
	2	$2,6 \times 10^8$	$3,5 \times 10^8$	$6,8 \times 10^8$	$1,8 \times 10^8$	$6,1 \times 10^7$
	3	$2,2 \times 10^8$	$2,7 \times 10^8$	$5,1 \times 10^8$	$1,6 \times 10^8$	$3,8 \times 10^7$
	4	$2,5 \times 10^8$	$2,8 \times 10^8$	$5,2 \times 10^8$	$2,5 \times 10^8$	$5,2 \times 10^7$
VBt2751	1	$2,3 \times 10^8$	$4,1 \times 10^8$	$6,1 \times 10^8$	$5,8 \times 10^8$	$1,3 \times 10^8$
	2	$2,9 \times 10^8$	$4,9 \times 10^8$	$6,5 \times 10^8$	$5,5 \times 10^8$	$1,9 \times 10^8$
	3	$2,5 \times 10^8$	$3,4 \times 10^8$	$2,9 \times 10^8$	$5,4 \times 10^8$	$2,0 \times 10^8$
	4	$2,1 \times 10^8$	$3,5 \times 10^8$	$4,9 \times 10^8$	$7,3 \times 10^8$	$1,4 \times 10^8$

Bảng 14. Diễn biến mật độ vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (CFU/mL) khi lên men bằng hệ thống lên men tự động 2 lít BioFlo 120

Nghiệm thức	Lần lặp lại	Mật độ vi khuẩn (CFU/mL)	
		24 giờ	48 giờ
NT1	1	$4,8 \times 10^{13}$	$2,1 \times 10^{14}$
	2	$3,8 \times 10^{12}$	$1,4 \times 10^{14}$
	3	$2,1 \times 10^{12}$	$2,2 \times 10^{14}$
	4	$3,2 \times 10^{12}$	$1,3 \times 10^{14}$
NT2	1	$5,4 \times 10^{13}$	$1,3 \times 10^{15}$
	2	$5,5 \times 10^{12}$	$1,8 \times 10^{14}$
	3	$6,4 \times 10^{12}$	$1,6 \times 10^{14}$
	4	$7,3 \times 10^{12}$	$2,5 \times 10^{14}$
NT3	1	$5,5 \times 10^{12}$	$2,8 \times 10^{14}$
	2	$6,9 \times 10^{12}$	$3,5 \times 10^{14}$
	3	$4,3 \times 10^{13}$	$1,4 \times 10^{15}$
	4	$7,2 \times 10^{12}$	$4,3 \times 10^{14}$
NT4	1	$5,5 \times 10^{8}$	$3,8 \times 10^{8}$
	2	$5,9 \times 10^{7}$	$3,7 \times 10^{8}$
	3	$1,3 \times 10^{8}$	$2,5 \times 10^{8}$
	4	$6,5 \times 10^{8}$	$7,0 \times 10^{8}$

NT 1 (Lên men tự động BioFlo 120, dịch tăng sinh 0,1%), NT 2 (Lên men tự động BioFlo 120, dịch tăng sinh 0,5%), NT 3 (Lên men tự động BioFlo 120, dịch tăng sinh 1,0%), NT 4 (Lên men thông thường, dịch tăng sinh 1,0%)

Bảng 15. Diễn biến mật số sâu tơ (*Plutella xylostella*) của hai chủng vi khuẩn VBt21110.1 và VBt26310.1 trong điều kiện phòng thí nghiệm

Nghiệm thức	Số sâu tơ sống (con/nghiệm thức)				TB
1 NSXL	**LLL 1**	**LLL 2**	**LLL 3**	**LLL 4**	
10^7 CFU/mL	7	7	6	7	6,8
10^8 CFU/mL	5	6	5	6	5,5
10^9 CFU/mL	4	5	5	5	4,8
Đối chứng	10	10	10	10	10,0
2 NSXL	**LLL 1**	**LLL 2**	**LLL 3**	**LLL 4**	**TB**
10^7 CFU/mL	5	6	4	3	4,5
10^8 CFU/mL	3	4	5	4	4,0
10^9 CFU/mL	3	4	3	3	3,3
Đối chứng	10	10	10	10	10,0
3 NSXL	**LLL 1**	**LLL 2**	**LLL 3**	**LLL 4**	**TB**
10^7 CFU/mL	3	4	3	2	3.0
10^8 CFU/mL	2	3	3	3	2.8
10^9 CFU/mL	3	2	3	2	2.5
Đối chứng	10	10	10	10	10.0
5 NSXL	**LLL 1**	**LLL 2**	**LLL 3**	**LLL 4**	**TB**
10^7 CFU/mL	2	3	2	2	2,3
10^8 CFU/mL	1	2	2	3	2,0
10^9 CFU/mL	2	2	2	1	1,8
Đối chứng	10	10	10	10	10.0
7 NSXL	**LLL 1**	**LLL 2**	**LLL 3**	**LLL 4**	**TB**
10^7 CFU/mL	1	2	1	2	1,5
10^8 CFU/mL	0	1	1	1	0,8
10^9 CFU/mL	0	1	0	0	0,3
Đối chứng	10	10	10	10	10.0

Bảng 16. Diễn biến mật số sâu khoang (*Spodoptera litura*) của hai chủng vi khuẩn VBt2110.1 và VBt26310.1 trong điều kiện phòng thí nghiệm

Nghiệm thức	Số sâu khoang sống (con/nghiệm thức)				TB
1 NSXL	**LLL 1**	**LLL 2**	**LLL 3**	**LLL 4**	
10^7 CFU/mL	8	9	7	7	7,8
10^8 CFU/mL	6	8	6	8	7,0
10^9 CFU/mL	7	7	5	6	6,3
Đối chứng	10	10	10	10	10,0
2 NSXL	**LLL 1**	**LLL 2**	**LLL 3**	**LLL 4**	**TB**
10^7 CFU/mL	4	6	5	5	5,0
10^8 CFU/mL	5	4	5	5	4,8
10^9 CFU/mL	4	3	4	4	3,8
Đối chứng	10	10	10	10	10,0
3 NSXL	**LLL 1**	**LLL 2**	**LLL 3**	**LLL 4**	**TB**
10^7 CFU/mL	3	4	4	5	4,0
10^8 CFU/mL	3	4	3	3	3,3
10^9 CFU/mL	3	2	3	2	2,5
Đối chứng	10	10	10	10	10.0
5 NSXL	**LLL 1**	**LLL 2**	**LLL 3**	**LLL 4**	**TB**
10^7 CFU/mL	3	2	3	3	2,8
10^8 CFU/mL	3	2	2	2	2,3
10^9 CFU/mL	2	2	2	1	1,8
Đối chứng	10	10	10	10	10.0
7 NSXL	**LLL 1**	**LLL 2**	**LLL 3**	**LLL 4**	**TB**
10^7 CFU/mL	3	2	1	2	2,0
10^8 CFU/mL	2	1	2	1	1,5
10^9 CFU/mL	1	1	2	1	1,3
Đối chứng	10	10	10	10	10.0

Bảng 17. Diễn biến mật số sâu xanh da láng (*Spodoptera exigua*) của hai chủng vi khuẩn VBt2110.1 và VBt26310.1 trong điều kiện phòng thí nghiệm

Nghiệm thức	Số sâu xanh da láng sống (con/nghiệm thức)				TB
1 NSXL	**LLL 1**	**LLL 2**	**LLL 3**	**LLL 4**	
10^7 CFU/mL	8	7	8	8	7,8
10^8 CFU/mL	7	6	7	5	6,3
10^9 CFU/mL	5	6	7	4	5,5
Đối chứng	10	10	10	10	10,0
2 NSXL	**LLL 1**	**LLL 2**	**LLL 3**	**LLL 4**	**TB**
10^7 CFU/mL	6	5	6	6	5,8
10^8 CFU/mL	5	4	4	4	4,3
10^9 CFU/mL	3	4	4	4	3,8
Đối chứng	10	10	10	10	10,0
3 NSXL	**LLL 1**	**LLL 2**	**LLL 3**	**LLL 4**	**TB**
10^7 CFU/mL	5	4	5	5	4,8
10^8 CFU/mL	3	3	4	4	3,5
10^9 CFU/mL	3	3	3	3	3,0
Đối chứng	10	10	10	10	10.0
5 NSXL	**LLL 1**	**LLL 2**	**LLL 3**	**LLL 4**	**TB**
10^7 CFU/mL	4	3	4	4	3,8
10^8 CFU/mL	3	3	2	3	2,8
10^9 CFU/mL	3	2	3	2	2,5
Đối chứng	10	10	10	10	10.0
7 NSXL	**LLL 1**	**LLL 2**	**LLL 3**	**LLL 4**	**TB**
10^7 CFU/mL	2	2	2	3	2,3
10^8 CFU/mL	2	2	1	2	1,8
10^9 CFU/mL	2	1	2	1	1,5
Đối chứng	10	10	10	10	10.0

Bảng 18. Diễn biến mật số sâu tơ (*Plutella xylostella*) ở các nghiệm thức phun chế phẩm VBt trong điều kiện nhà lưới

Nghiệm thức	Số sâu sống (con/nghiệm thức)				TB
1 NSXL	**LLL 1**	**LLL 2**	**LLL 3**	**LLL 4**	
NT 1	8	6	7	6	6,8
NT 2	7	7	7	8	7,3
NT 3	6	6	7	6	6,3
NT 4	10	10	10	10	10,0
2 NSXL	**LLL 1**	**LLL 2**	**LLL 3**	**LLL 4**	**TB**
NT 1	4	3	4	3	3,5
NT 2	5	6	5	5	5,3
NT 3	4	4	5	3	4,0
NT 4	10	10	10	10	10,0
3 NSXL	**LLL 1**	**LLL 2**	**LLL 3**	**LLL 4**	**TB**
NT 1	3	2	2	3	2,5
NT 2	4	5	4	3	4,0
NT 3	3	2	3	3	2,8
NT 4	10	10	10	10	10.0
5 NSXL	**LLL 1**	**LLL 2**	**LLL 3**	**LLL 4**	**TB**
NT 1	2	2	2	1	1,8
NT 2	3	4	3	2	3,0
NT 3	3	2	2	3	2,5
NT 4	10	10	10	10	10.0
7 NSXL	**LLL 1**	**LLL 2**	**LLL 3**	**LLL 4**	**TB**
NT 1	1	2	1	1	1,3
NT 2	3	3	3	2	2,8
NT 3	2	2	2	3	2,3
NT 4	10	10	10	10	10.0

*NT 1 (Lên men tự động BioFlo 120), NT 2 (Lên men thông thường), NT3 (*Vi-Bt® 32000 WP) *NT 4 (Phun nước cất). NSXL: ngày sau xử lý; LLL; lần lặp lại*

Bảng 19. Hiệu quả (%) của chế phẩm VBt đối với sâu tơ trong điều kiện nhà lưới

Nghiệm thức	Liều lượng (ml, g/ha)	Hiệu quả gây chết sâu tơ (%)				
		1 NSP	2 NSP	3 NSP	5 NSP	7 NSP
NT 1	**1.000**	32,5 ab	65,0 a	75,0 a	82,5 a	87,5 a
NT 2	**1.000**	27,5 b	47,5 b	60,0 b	70,0 b	72,5 a
NT 3	**1.000**	37,5 a	60,0 a	72,5 a	75,0 ab	77,5 ab
NT 4	**1.000**	0,0 c	0,0 c	0,0 c	0,0 c	0,0 c
Mức ý nghĩa		**	**	**	**	**
CV (%)		8,8	5,6	5,1	4,9	4,5

***: khác biệt ở mức rất có ý nghĩa; NSP: Ngày sau phun; NT 1 (Lên men tự động BioFlo 120), NT 2 (Lên men thông thường), NT3 (*Vi-Bt® 32000 WP) *NT 4 (Phun nước cất).*

Bảng 20. Hiệu quả (%) của chế phẩm VBt đối với sâu khoang (*Spodoptera litura*) trong điều kiện nhà lưới

Nghiệm thức	Liều lượng (ml, g/ha)	Hiệu quả gây chết sâu khoang (%)				
		1 NSP	2 NSP	3 NSP	5 NSP	7 NSP
NT 1	**1.000**	32,5 a	60,0 a	67,5 a	77,5 a	85,0 a
NT 2	**1.000**	22,5 b	42,5 b	62,5 4	70,0 b	75,0 a
NT 3	**1.000**	30,0 a	52,5 a	60,0 a	75,0 ab	80,0 a
NT 4	**1.000**	0,0 c	0,0 c	0,0 c	0,0 c	0,0 c
Mức ý nghĩa		**	**	**	**	**
CV (%)		11,6	6,6	5,4	4,9	4,4

*Trắc nghiệm phân hạng theo phép thử DUNCAN ở mức 5 %; **: khác biệt ở mức rất có ý nghĩa; NSP: Ngày sau phun; NT 1 (Lên men tự động BioFlo 120), NT 2 (Lên men thông thường), NT3 (*Vi-Bt® 32000 WP) *NT 4 (Phun nước cất).*

Bảng 21. Diễn biến mật số sâu khoang (*Spodoptera litura*) ở các nghiệm thức phun chế phẩm VBt trong điều kiện nhà lưới

Nghiệm thức	Số sâu sống (con/nghiệm thức)				TB
1 NSXL	**LLL 1**	**LLL 2**	**LLL 3**	**LLL 4**	
NT 1	6	7	7	7	6,8
NT 2	8	8	8	7	7,8
NT 3	7	7	7	7	7,0
NT 4	10	10	10	10	10.0
2 NSXL	**LLL 1**	**LLL 2**	**LLL 3**	**LLL 4**	**TB**
NT 1	5	4	3	4	4,0
NT 2	6	5	6	6	5,8
NT 3	5	5	4	5	4,8
NT 4	10	10	10	10	10.0
3 NSXL	**LLL 1**	**LLL 2**	**LLL 3**	**LLL 4**	**TB**
NT 1	4	3	3	3	3,3
NT 2	4	4	3	4	3,8
NT 3	4	5	2	5	4,0
NT 4	10	10	10	10	10.0
5 NSXL	**LLL 1**	**LLL 2**	**LLL 3**	**LLL 4**	**TB**
NT 1	2	3	2	2	2,3
NT 2	3	2	3	4	3,0
NT 3	2	3	2	3	2,5
NT 4	10	10	10	10	10.0
7 NSXL	**LLL 1**	**LLL 2**	**LLL 3**	**LLL 4**	**TB**
NT 1	1	2	2	1	1,5
NT 2	2	2	3	3	2,5
NT 3	2	2	1	3	2,0
NT 4	10	10	10	10	10.0

*NT 1 (Lên men tự động BioFlo 120), NT 2 (Lên men thông thường), NT3 (*Vi-Bt® 32000 WP) *NT 4 (Phun nước cất). NSXL: ngày sau xử lý; LLL; lần lặp lại*

Bảng 22. Diễn biến mật số sâu xanh da láng (*Spodoptera exigua)* ở các nghiệm thức phun chế phẩm VBt trong điều kiện nhà lưới

Nghiệm thức	Số sâu sống (con/nghiệm thức)				TB
1 NSXL	**LLL 1**	**LLL 2**	**LLL 3**	**LLL 4**	
NT 1	6	7	7	6	6,5
NT 2	7	7	7	8	7,3
NT 3	8	7	7	7	7,3
NT 4	10	10	10	10	10.0
2 NSXL	**LLL 1**	**LLL 2**	**LLL 3**	**LLL 4**	**TB**
NT 1	5	4	6	4	4,0
NT 2	4	5	6	7	5,5
NT 3	5	5	5	4	4,8
NT 4	10	10	10	10	10.0
3 NSXL	**LLL 1**	**LLL 2**	**LLL 3**	**LLL 4**	**TB**
NT 1	3	4	3	2	3,0
NT 2	4	4	4	5	4,3
NT 3	3	4	4	4	3,8
NT 4	10	10	10	10	10.0
5 NSXL	**LLL 1**	**LLL 2**	**LLL 3**	**LLL 4**	**TB**
NT 1	3	2	3	2	2,5
NT 2	3	4	4	4	3,8
NT 3	3	2	4	3	3,0
NT 4	10	10	10	10	10.0
7 NSXL	**LLL 1**	**LLL 2**	**LLL 3**	**LLL 4**	**TB**
NT 1	2	2	2	2	2,0
NT 2	3	2	3	4	3,0
NT 3	3	2	2	3	2,5
NT 4	10	10	10	10	10.0

*NT 1 (Lên men tự động BioFlo 120), NT 2 (Lên men thông thường), NT3 (*Vi-Bt® 32000 WP) *NT 4 (Phun nước cất). NSXL: ngày sau xử lý; LLL; lần lặp lại*

Bảng 23 Hiệu quả (%) của chế phẩm VBt đối với sâu xanh da láng (*Spodoptera exigua*) trong điều kiện nhà lưới

Nghiệm thức	Liều lượng (ml, g/ha)	Hiệu quả gây bệnh sâu xanh da láng (%)				
		1 NSP	2 NSP	3 NSP	5 NSP	7 NSP
NT 1	**1.000**	35,0 a	60,0 a	70,0 a	75,0 a	80,0 a
NT 2	**1.000**	27,5 b	45,0 b	57,5 b	62,5 b	70,0 b
NT 3	**1.000**	27,5 b	52,5 ab	62,5 ab	70,0 ab	75,0 ab
NT 4	**1.000**	0,0 c	0,0 c	0,0 c	0,0 c	0,0 c
Mức ý nghĩa		**	**	**	**	**
CV (%)		11,1	8,2	5,3	4,9	4,7

*Trắc nghiệm phân hạng theo phép thử DUNCAN ở mức 5 %; **: khác biệt ở mức rất có ý nghĩa; NSP: Ngày sau phun; NT 1 (Lên men tự động BioFlo 120), NT 2 (Lên men thông thường), NT3 (*Vi-Bt® 32000 WP) *NT 4 (Phun nước cất).*

Bảng 24. Diễn biến mật số sâu tơ (*Plutella xylostella*) ở các nghiệm thức phun chế phẩm VBt trên cây cải ngoài đồng ruộng

Nghiệm thức	Số sâu sống (con/nghiệm thức)				TB
Trước phun	**LLL 1**	**LLL 2**	**LLL 3**	**LLL 4**	
NT 1	12	9	10	8	9,8
NT 2	8	10	8	10	9,3
NT 3	12	10	8	10	10,0
NT 4	8	7	10	11	9,0
1 NSXL	**LLL 1**	**LLL 2**	**LLL 3**	**LLL 4**	**TB**
NT 1	6	5	7	6	6,0
NT 2	7	8	7	8	7,5
NT 3	8	6	6	8	7,0
NT 4	9	9	11	10	9,8
3 NSXL	**LLL 1**	**LLL 2**	**LLL 3**	**LLL 4**	**TB**
NT 1	4	3	5	4	4,0
NT 2	5	6	6	7	6,0
NT 3	6	5	5	5	5,3
NT 4	13	14	14	15	14,0
5 NSXL	**LLL 1**	**LLL 2**	**LLL 3**	**LLL 4**	**TB**
NT 1	2	2	3	2	2,3
NT 2	4	3	4	4	3,8
NT 3	4	3	3	2	3,0
NT 4	14	15	13	16	14,5
7 NSXL	**LLL 1**	**LLL 2**	**LLL 3**	**LLL 4**	**TB**
NT 1	2	3	2	1	2,0
NT 2	3	4	3	3	3,3
NT 3	3	4	2	3	3,0
NT 4	10	12	10	12	11,0

*NT 1 (Lên men tự động BioFlo 120), NT 2 (Lên men thông thường), NT3 (*Vi-Bt® 32000 WP) *NT 4 (Phun nước cất). NSXL: ngày sau xử lý; LLL; lần lặp lại*

PHỤ LỤC

SỐ LIỆU VÙNG LẤY MẪU

STT	ĐỊA ĐIỂM		VĨ ĐỘ	KINH ĐỘ	MÃ HÓA	Đặc điểm
	TỈNH, TP	HUYỆN, XÃ				
	Đồng bằng sông Hồng (8 tỉnh - 31/152)					
1	**Hà Nội**	Xã Dục Tú, Đông Anh	$21^0$06’07,7’’	$105^0$52’42,4’’	VBt246	Trắng, hình tròn, bề mặt nhăn, viền gợn sóng
2	Hà Nội	Thôn Lương Nổ (Xã Tuyên Dương) Đông Anh	$21^0$09’36,4’’	$105^0$50’42,1’’	VBt2410	Trắng, bề mặt hơi sần sùi, viền răng cưa
3	Hà Nội	Phú Cường, Sóc Sơn	$21^0$12’09,9’’	$105^0$48’11,7’’	VBt2413	Trắng, viền phân thùy, bám chặt vào môi trường
4	Hà Nội	Thôn Thượng Đại Thịnh, Mê Linh	$21^0$11’50,6’’	$105^0$42’37,1’’	VBt2417	Trắng sữa, hình tròn, nhô lên, nhầy, viền nhẵn
5	Hà Nội	Khu Liên Linh, Thanh Trì	$20^0$56’12,3’’	$105^0$51’32,3’’	VBt2426	Trắng, hình trứng, viền mờ, bề mặt sần sùi
6	Hà Nội	Hạ Hồi, Thường Tín	$20^0$51’39,0’’	$105^0$52’49,7’’	VBt2429	Trắng, dạng bất định, viền phân thùy nhỏ, sần sùi
7	**Vĩnh Phúc**	Đạo Đức, Bình Xuyên	$21^0$14’54,5’’	$105^0$40’28,2’’	VBt2112	Tròn, màu trắng sữa, viền nguyên, bề mặt bằng phẳng mọc tỏa ra như lông chim.
8	Vĩnh Phúc	Cầu Lò Cang	$21^0$16’27,5’’	$105^0$38’31,4’’	VBt2113	Dạng bất định, màu hồng nhạt, viền phân thùy, có núm ở tâm, bền mặt nhẵn dính chặt vào môi trường
9	Vĩnh Phúc	Thanh Trà, Vĩnh Yên	$21^0$16’40,9’’	$105^0$36’48,0’’	VBt2115	Tròn, màu trắng sữa, bề mặt sần sùi, viền nguyên, hơi mờ và mọc lan ra môi trường

STT	ĐỊA ĐIỂM		VĨ ĐỘ	KINH ĐỘ	MÃ HÓA	Đặc điểm
	TỈNH, TP	HUYỆN, XÃ				
10	Vĩnh Phúc	Phước Lưu, Vĩnh Yên	$21^0$16’56,0’’	$105^0$37’28,3’’	VBt2116	Tròn, màu trắng sữa, bề mặt sần sùi, viền nguyên, hơi mờ và mọc lan ra môi trường
11	Vĩnh Phúc	Đạo Đức, Bình Xuyên	$21^0$15’16,1’’	$105^0$39’59,0’’	VBt2119	Tròn, màu trắng sữa, bề mặt sần sùi, viền nguyên, hơi mờ và mọc lan ra môi trường
12	Vĩnh Phúc	Thị Xã Phúc Yên	$21^0$13’40,6’’	$105^0$42’48,0’’	VBt21110	Tròn, màu trắng sữa, bề mặt sần sùi, viền nguyên, hơi mờ và mọc lan ra môi trường
13	**Thái Bình**	Khu cầu Bo, TP Thái Bình	$20^0$27’12,7’’	$106^0$20’55,2’’	VBt2272	Tròn, màu trắng sữa, bề mặt sần sùi, viền nguyên, hơi mờ và mọc lan ra môi trường
14	Thái Bình	Ngã Ba Đông Mỹ	$20^0$27’43,2’’	$106^0$21’3,33’’	VBt2274	Tròn, viền nguyên, màu trắng sữa, có núm ở tâm, bề mặt sần sùi, dính chặt vào môi trường
15	Thái Bình	Xã Phú Lương, Đông Hưng	$20^0$34’13,8’’	$106^0$20’34’’	VBt2277	Tròn, màu hồng nhạt, viền nguyên, bề mặt ướt, nhô lên.
16	Thái Bình	Xã Đông Hải, Quỳnh Phụ	$20^0$36’22,2’’	$106^0$22’48,7’’	VBt2279	Dạng bất định, màu hồng nhạt, có núm, viền nhăn, bề mặt bằng phẳng, hơi nhô
17	Thái Bình	Tả Sông Hồng, Vũ Thư	$20^0$26’30,10’’	$106^0$13’16,20’’	VBt22713	Tròn, màu trắng sữa, viền nguyên, tâm nhăn, bề mặt dạng sợi li ti, bám chặt vào môi trường
18	**Hà Nam**	Xã Thanh Tuyền, Thanh Liêm	$20^0$29’51,7’’	$105^0$55’02,5’’	VBt2263	Tròn, màu trắng sữa, viền nguyên, bề mặt ướt, tâm sậm màu, hơi nhô.
19	Hà Nam	Liêm Chung, Phú Lý	$20^0$31’33,4’’	$105^0$55’46,80’’	VBt22616	Tròn, viền nhăn, màu trắng sữa, có núm ở tâm, bề mặt nhẵn, mọc tỏa ra như lông chim

STT	ĐỊA ĐIỂM		VĨ ĐỘ	KINH ĐỘ	MÃ HÓA	Đặc điểm
	TỈNH, TP	HUYỆN, XÃ				
20	**Nam Định**	Đê Sông Hồng, Mỹ Tân, Mỹ Lộc	$20^0$26’42,30’’	$106^0$12’06,10’’	VBt22811	Dạng bất định, màu hồng nhạt, tâm nhọn, nhăn, viền nguyên, bề măt bằng phẳng, KL dày.
21	Nam Định	Hiền Khánh, Vũ Bản	$20^0$26’35,1’’	$106^0$03’58,10’’	VBt2284	Dạng bất định, màu trắng sữa, viền phân thùy, núm nhọn, bằng phẳng, bám vào môi trường
22	**Hưng Yên**	Nam Dương, Nhật Tân, Tiên Lữ	$20^0$41’17,1’’	$106^0$05’34,0’’	VBt2214	Tròn, màu trắng sữa, viền nguyên, tâm nhăn, bề mặt dạng sợi li ti, bám chặt vào môi trường
23	Hưng Yên	Toàn Thắng, Kim Động	$20^0$47’53,9’’	$106^0$02’27,5’’	VBt2219	Tròn, màu trắng sữa, viền nguyên, bề mặt bằng phẳng mọc tỏa ra như lông chim.
24	Hưng Yên	Lục Điền, Minh Châu, Yên Mỹ	$20^0$51’34,0’’	$106^0$01’17,04’’	VBt2219	Dạng bất định, màu trắng sữa, viền phân thùy, núm nhọn, bằng phẳng, bám vào môi trường
25	**Bắc Ninh**	Tân Chí, Tiên Du	$21^0$04’30,6’’	$106^0$05’37,6’’	VBt2228	Tròn, viền nguyên, màu trắng sữa, có núm ở tâm, bề mặt sần sùi, dính chặt vào môi trường
26	Bắc Ninh	Tương Giang, Từ Sơn	$21^0$07’22,8’’	$105^0$59’24,6’’	VBt22210	Dạng bất định, màu hồng nhạt, tâm nhọn nhăn, viền nguyên, bề măt bằng phẳng, KL dày.
27	**Hải Dương**	Ninh Thành, Ninh Giang	$20^0$45’31,3’’	$106^0$22’28,3’’	VBt22014	Tròn màu trắng sữa, viền nhăn, có núm nhỏ ở tâm, nhìn nghiêng bề mặt hơi sần sùi
28	Hải Dương	Cao Thắng, Thanh Miện	$20^0$45’54,8’’	$106^0$13’18,13’’	VBt22019	Tròn, màu trắng sữa, bề mặt sần sùi, viền nguyên, hơi mờ và mọc lan ra môi trường
29	**Hải Phòng**	Địa phận An Hòa, Vĩnh Bảo	$20^0$40’13,9’’	$106^0$28’04,6’’	VBt2254	Tròn, màu hồng nhạt, viền nguyên, bề mặt ướt, nhô lên.

STT	ĐỊA ĐIỂM		VĨ ĐỘ	KINH ĐỘ	MÃ HÓA	Đặc điểm
	TỈNH, TP	HUYỆN, XÃ				
30	Hải Phòng	Xã Nguyên Giáp, Tú Kỳ	$20^0$45’30,5’’	$106^0$29’34,7’’	VBt22511	Tròn, viền nhăn, màu trắng sữa, có núm ở tâm, bề mặt nhẵn, mọc tỏa ra như lông chim
31	Hải Phòng	Bảo An, An Lão	$20^0$50’05’’	$106^0$33’19,7’’	VBt22515	Dạng bất định, màu trắng sữa, viền phân thùy, núm nhọn, bằng phẳng, bám vào môi trường
1	**Đà Nẵng**	Biển Thanh Khê	$16^0$04’42,10’’	$108^0$10’23,8’’	VBt2361	Tròn màu trắng sữa, viền nhăn, có núm nhỏ ở tâm, nhìn nghiêng bề mặt hơi sần sùi
2	Đà Nẵng	Hòa Khánh, Đà Nẵng	$16^0$04’40,7’’	$108^0$10’28,9’’	VBt2362	Tròn, màu trắng sữa , bề mặt sần sùi, viền nhăn, có nhiều vòng tròn đồng tâm.
3	Đà Nẵng	Ngũ Hành Sơn	$16^0$00’21,0’’	$108^0$15’50,6’’	VBt2367	Tròn, màu trắng sữa, bề mặt ướt, bìa nguyên mọc lan trong môi trường, tâm có màu hồng hơi nhô
4	**Quảng Nam**	Bình Quí, Thăng Bình	$15^0$42’55,7’’	$108^0$21’26,0’’	VBt2351	Dạng bất định màu trắng sữa,viền nhăn, bề mặt hơi nhầy nhớt, ở giữa có núm nhỏ
5	Quảng Nam	Quế Phú, Quế Sơn	$15^0$47’54,4’’	$108^0$20’25,1’’	VBt2357	Dạng bất định, màu hồng nhạt, tâm nhọn, nhăn, viền nguyên, bề măt bằng phẳng, KL dày.
6	Quảng Nam	Bình Minh, Thăng Bình	$15^0$46’27,2’’	$108^0$25’59,0’’	VBt2358	Tròn, màu trắng sữa, bề mặt sần sùi, viền nguyên, hơi mờ và mọc lan ra môi trường
7	Quảng Nam	S. Trường Giang Bình Giang, Thăng Bình	$15^0$48’29,8’’	$108^0$21’00,8’’	VBt23511	Tròn, màu hồng nhạt, viền nguyên, bề mặt ướt, nhô lên.
8	**Bình Thuận**	Núi Tà Cú	$10^0$49’34,1''	$107^0$52’56,9''	VBt2522	Dạng bất định, màu hồng nhạt, tâm nhọn, nhăn, viền nguyên, bề măt bằng phẳng, KL dày.
9	Bình Thuận	Mũi Né, Phan Thiết	$10^0$56’22,6''	$108^0$9’25,7''	VBt2527	Tròn, viền nhăn, màu trắng sữa, có núm ở tâm, bề mặt nhẵn, mọc tỏa ra như lông chim

STT	ĐỊA ĐIỂM		VĨ ĐỘ	KINH ĐỘ	MÃ HÓA	Đặc điểm
	TỈNH, TP	HUYỆN, XÃ				
10	Bình Thuận	Long Hải, huyện Phú Quí	$10^0$32’77,8''	$108^0$56’84,4''	VBt2528	Dạng bất định, màu trắng sữa, viền phân thùy, núm nhọn, bằng phẳng, bám vào môi trường
11	Bình Thuận	Mỹ Khê, phuyện Phú Quí	$10^0$30’90,7''	$108^0$55’90,0''	VBt25211	Tròn, màu trắng sữa, bề mặt sần sùi, viền nguyên, hơi mờ và mọc lan ra môi trường
12	Bình Thuận	Tam Thanh, huyện Phú Quí	$10^0$30’80,9''	$108^0$56’39,4''	VBt25212	Tròn, màu trắng sữa, bề mặt phăng, khô, có viền nhăn, núm nhỏ ở tâm
	Đông Nam bộ (4 tỉnh - 33/196)					
1	**TPHCM**	Lý Nhơn, Cần Giờ	$10^0$33’25,1’’	$106^0$45’30,1’’	VBt281	Trắng sữa, hình tròn, nhô lên, nhầy, viền nhẵn
2	TPHCM	An Thới Đông, Cần Giờ	$10^0$30’25,1’’	$106^0$51’45,8’’	VBt283	Trắng, viền phân thùy, bám chặt vào môi trường
3	TPHCM	An Thới Đông, Cần Giờ	$10^0$30’51,3’’	$106^0$51’41,5’’	VBt285	Trắng sữa, hình tròn, bề mặt khô
4	TPHCM	An Thới Đông, Cần Giờ	$10^0$30’01,6’’	$106^0$51’52,6’’	VBt287	Trắng sữa, hình tròn, bề mặt khô
5	TPHCM	NĐ, Củ Chi	$11^0$02’17,7''	$106^0$28’47,2’’	VBt2836	Tròn, viền răng cưa, trắng đục
6	TPHCM	NĐ, Củ Chi	$11^0$02’32,2''	$106^0$29’34,9’’	VBt2847	Trắng, dạng bất định, viền nhăn, trong lõm
7	TPHCM	TLT, Củ Chi	$11^0$04’42,5''	$106^0$25’50,4’’	VBt2857	Tròn, trắng đục, viền không đều, hình tán xạ, lan rộng trên thạch,
8	TPHCM	Thạnh Xuân, Q12	$10^0$53’17,7''	$106^0$40’23,7’’	VBt2874	Trắng sữa, hình tròn, nhô lên, nhầy, viền nhẵn
9	TPHCM	Nhị Bình, Hóc Môn	$10^0$55’6,7''	$106^0$41’6,8’’	VBt2881	Tròn, trắng đục, viền không đều, lồi, hình tán xạ lan rộng trên mặt thạch
10	TPHCM	Đông Thạnh, Hóc Môn	$10^0$53’58,1''	$106^0$38’34,5''	VBt28105	Trắng, dạng bất định, viền phân thùy nhỏ, sần sùi

STT	ĐỊA ĐIỂM		VĨ ĐỘ	KINH ĐỘ	MÃ HÓA	Đặc điểm
	TỈNH, TP	HUYỆN, XÃ				
11	TPHCM	Thới Tam Thôn, Hóc Môn	$10^0$53’13,0’’	$106^0$37’22,0’’	VBt28117	Trắng, viền phân thùy, bám chặt vào môi trường
12	**Tây Ninh**	Suối Đá, Dương Minh Châu	$11^0$24’1,3’’	$106^0$19’42,8’’	VBt2762	Trắng, nhô, nhám
13	Tây Ninh	Suối Đá, Dương Minh Châu	$11^0$22’40,6’’	$106^0$11’38,7’’	VBt2767	Trắng, thô, bề mặt hình răng cưa
14	Tây Ninh	Sông Vàm Cỏ Đông	$11^0$7’24,3’’	$106^0$13’57,7’’	VBt27611	Trắng, hình tròn, viền mờ lan ra xung quanh
15	Tây Ninh	Phước Lưu, Trảng Bàng	$11^0$1’59,8’’	$106^0$13’44,0’’	VBt27614	Trắng, hình tròn, viền mờ lan ra xung quanh
16	Tây Ninh	Thành Điền, Châu Thành	$11^0$13’10,4’’	$106^0$5’24,3’’	VBt27618	Trắng, thô, bề mặt hình răng cưa
17	**Đồng Nai**	Thống Nhất	$10^0$58’07,3’’	$107^0$08’37”	VBt2511	Tròn, viền nguyên, màu trắng sữa, có núm ở tâm, bề mặt sần sùi, dính chặt vào môi trường
18	Đồng Nai	Định Quán	$11^0$08’54,8”	$107^0$14’4,0”	VBt2519	Tròn màu trắng sữa, viền nhăn, có núm nhỏ ở tâm, nhìn nghiêng bề mặt hơi sần sùi
19	Đồng Nai	Trảng Bom	$11^0$0’34,69”	$107^0$3’2,0”	VBt25114	Tròn, màu trắng sữa, viền nguyên, bề mặt bằng phẳng mọc tỏa ra như lông chim.
20	Đồng Nai	Tân Phú	$11^0$24’13,46”	$107^0$23’43,42”	VBt25120	Tròn, màu trắng sữa, bề mặt ướt, bìa nguyên mọc lan trong môi trường, tâm có màu hồng hơi nhô
21	**Lâm Đồng**	Phường 9, Đà Lạt	$11^0$57’37”	$108^0$28’23”	VBt2639	Trắng sữa, tròn, khô, viền răng cưa,
22	Lâm Đồng	Phường Xuân Thọ	$11^0$56’46”	$108^0$30’58”	VBt26310	Trắng kem, tròn, khô, bề mặt nhô lên
23	Lâm Đồng	Phường 4, Đà Lạt	$11^0$54’46”	$108^0$25’12”	VBt26311	Trắng đục, có mép răng cưa
24	Lâm Đồng	Phường 7, Đà Lạt	$11^0$58’38”	$108^0$25'13”	VBt26312	Trắng sữa, viền nhăn, bề mặt khô, nhô lên
25	Lâm Đồng	Hồ lắng, Hồ Xuân Hương	$11^0$57’04.6”	$108^0$27’07.6”	VBt26313	Trắng, tròn, khô, viền nhăn, nhô lên
26	Lâm Đồng	Xã Đạ Sar, Lạc Dương	$12^0$5’20”	$108^0$31’47”	VBt26314	Trắng sữa, xù xì, có viền răng cưa,
27	Lâm Đồng	Xã Đạ Sar, Lạc Dương	$12^0$0’49”	$108^0$29’49”	VBt26315	Trắng trong, bề mặt xù xì

STT	ĐỊA ĐIỂM		VĨ ĐỘ	KINH ĐỘ	MÃ HÓA	Đặc điểm
	TỈNH, TP	HUYỆN, XÃ				
28	Lâm Đồng	Thị Trấn, Lạc Dương	$12^0$02’42”	$108^0$29’17”	VBt26316	Trắng, tròm, bề mặt khô, nhô lên
29	Lâm Đồng	Xã Đạ Chais, Lạc Dương	$12^0$7’56”	$108^0$37’60”	VBt26317	Trắng sữa, viền nhăn, bề mặt khô, nhô lên,
30	Lâm Đồng	Xã Ka Đô, Đơn Dương	$11^0$77’00”	$108^0$51’62”	VBt26318	Trắng, tròn, khô, viền nhăn, nhô lên
31	Lâm Đồng	Xã Lạc Xuân, Đơn Dương	$11^0$78'40”	$108^0$56’65”	VBt26321	Trắng đục, bề mặt nhô lên, viền răng cưa
32	Lâm Đồng	Thị trấn Phi Nôm	$11^0$45'59"	$108^0$22’48”	VBt26325	Trắng, viền nhăn, bề mặt nhẵn
33	Lâm Đồng	Xã Hiệp Thạnh, Đức Trọng	$11^0$45'08”	$108^0$24’24”	VBt26327	Trắng sữa,thô, viền răng cưa
	Đồng bằng sông Cửu Long (5 tỉnh - 17/106)					
1	**Tiền Giang**	Hậu Thuận, Hậu Thành - C.Bè	$10^0$23’05”	$105^0$59’57”	VBt2735	Trắng sữa, dạng bất định, viền nhăn, bề mặt phẳng
2	Tiền Giang	Hậu Thuận, Hậu Thành - C.Bè	$10^0$23’05”	$105^0$59’57”	VBt2736	Tròn, trắng sữa, viền nhăn, bề mặt ướt, nhô lên
3	Tiền Giang	Tân Thành - Gò Công Đông	$10^0$18’49''	$106^0$45’35''	VBt27310	Dạng bất định, trắng, viền phân thùy, màu trắng, bề mặt khô
4	Tiền Giang	Tăng Hoà - Gò Công Đông	$10^0$18’38''	$106^0$42’57''	VBt27311	Trắng, viền phân thùy, lan nhanh, bề mặt phẳng
5	Tiền Giang	An Thái - An Cư - Cái Bè	$10^0$22’39''	$106^0$4’48''	VBt27315	Tròn, màu trắng, viền nguyên, bề mặt nổi
6	Tiền Giang	Phú Thạnh, Phú Riềng - Châu Thành	$10^0$22’27''	$106^0$17’53''	VBt27322	Tròn, trắng, viền hơi nhăn, bề mặt phẳng, khô
7	**Bến Tre**	Bình Thành, Giồng Trôm	$10^0$08’35,5''	$106^0$32’33,8''	VBt2751	Tròn, màu trắng sữa, bề mặt phẳng, khô, có viền nhăn răng cưa, chấm nhỏ ở tâm
8	Bến Tre	Tân Thạnh, Giồng Trôm	$10^0$08’19.43''	$106^0$29’54.8''	VBt2752	Tròn, trắng sữa, bề mặt khô nhầy,có chấm nhỏ trắng ở tâm
9	Bến Tre	Phú Hưng, Giồng Trôm	$10^0$14'21.9''	$106^0$24’18.0''	VBt2753	Trắng, dạng bất định, viền phân thùy nhỏ, sần sùi

STT	ĐỊA ĐIỂM		VĨ ĐỘ	KINH ĐỘ	MÃ HÓA	Đặc điểm
	TỈNH, TP	HUYỆN, XÃ				
10	Bến Tre	Tân Hào, Giồng Trôm	$10^0$08’29.50’’	$106^0$28’28.23’’	VBt2754	Trắng sữa, hình tròn, nhô lên, nhầy, viền nhẵn
11	Bến Tre	Tân Thạnh, Giồng Trôm	$10^0$07’38.11’’	$106^0$29’49.9’’	VBt2755	Tròn, màu trắng sữa, có chấm nhỏ màu trắng ở tâm
12	Bến Tre	Lương Hòa, Giồng Trôm	$10^0$12’55.13’’	$106^0$21’14.22’’	VBt2756	Tròn, màu trắng, viền nhăn, có tâm trắng
13	Bến Tre	Thạnh Trị, Bình Đại	$10^0$8’40,1’’	$106^0$38’12,5’’	VBt27510	Trắng, bất định, viền phân thùy, bề mặt phẳng, khô
14	**An Giang**	Bình Phươc Xuân	$10^0$26’17,9’’	$105^0$33’32,6”	VBt2961	Trắng, dạng bất định, viền phân thùy nhỏ, sần sùi
15	**Đồng Tháp**	Cao Lãnh	$10^0$16’59,5”	$105^0$45’55,4”	VBt2771	Trắng, hình tròn, viền mờ lan ra xung quanh
16	**Kiên Giang**	Phú Quốc			VBt2971	Trắng, thô, bề mặt hình răng cưa
17	Kiên Giang	Phú Quốc			VBt2975	Trắng xám, sần sùi

PHỤ LỤC

SỐ LIỆU VÙNG LÂY MẪU

STT	ĐỊA ĐIỂM		VĨ ĐỘ	KINH ĐỘ	MÃ HÓA	Tinh thể			
	TỈNH, TP	HUYỆN, XÃ				Hình Thoi	Hình ovan	Hình cầu	Hình quả trám
	Đồng bằng sông Hồng (8 tỉnh - 31/152)								
1	**Hà Nội**	Xã Dục Tú, Đông Anh	$21^0$06’07,7’’	$105^0$52’42,4’’	VBt246		1	1	
2	Hà Nội	Thôn Lương Nổ (Xã Tuyên Dương) Đông Anh	$21^0$09’36,4’’	$105^0$50’42,1’’	VBt2410			1	1
3	Hà Nội	Phú Cường, Sóc Sơn	$21^0$12’09,9’’	$105^0$48’11,7’’	VBt2413		1	1	
4	Hà Nội	Thôn Thượng Đại Thịnh, Mê Linh	$21^0$11’50,6’’	$105^0$42’37,1’’	VBt2417		1	1	
5	Hà Nội	Khu Liên Linh, Thanh Trì	$20^0$56’12,3’’	$105^0$51’32,3’’	VBt2426			1	1
6	Hà Nội	Hạ Hồi, Thường Tín	$20^0$51’39,0’’	$105^0$52’49,7’’	VBt2429		1		
7	**Vĩnh Phúc**	Đạo Đức, Bình Xuyên	$21^0$14’54,5’’	$105^0$40’28,2’’	VBt2112		1		
8	Vĩnh Phúc	Cầu Lò Cang	$21^0$16’27,5’’	$105^0$38’31,4’’	VBt2113	1			
9	Vĩnh Phúc	Thanh Trà, Vĩnh Yên	$21^0$16’40,9’’	$105^0$36’48,0’’	VBt2115	1			

STT	ĐỊA ĐIỂM		VĨ ĐỘ	KINH ĐỘ	MÃ HÓA	Tinh thể			
	TỈNH, TP	HUYỆN, XÃ				Hình Thoi	Hình ovan	Hình cầu	Hình quả trám
10	Vĩnh Phúc	Phước Lưu, Vĩnh Yên	$21^0$16’56,0’’	$105^0$37’28,3’’	VBt2116	1			
11	Vĩnh Phúc	Đạo Đức, Bình Xuyên	$21^0$15’16,1’’	$105^0$39’59,0’’	VBt2119	1	1		
12	Vĩnh Phúc	Thị Xã Phúc Yên	$21^0$13’40,6’’	$105^0$42’48,0’’	VBt21110	1	1		
13	**Thái Bình**	Khu cầu Bo, TP Thái Bình	$20^0$27’12,7’’	$106^0$20’55,2’’	VBt2272	1			
14	Thái Bình	Ngã Ba Đông Mỹ	$20^0$27’43,2’’	$106^0$21’3,33’’	VBt2274		1		
15	Thái Bình	Xã Phú Lương, Đông Hưng	$20^0$34’13,8’’	$106^0$20’34’’	VBt2277	1			
16	Thái Bình	Xã Đông Hải, Quỳnh Phụ	$20^0$36’22,2’’	$106^0$22’48,7’’	VBt2279	1			1
17	Thái Bình	Tả Sông Hồng, Vũ Thư	$20^0$26’30,10’’	$106^0$13’16,20’’	VBt22713	1		1	
18	**Hà Nam**	Xã Thanh Tuyền, Thanh Liêm	$20^0$29’51,7’’	$105^0$55’02,5’’	VBt2263	1			
19	Hà Nam	Liêm Chung, Phú Lý	$20^0$31’33,4’’	$105^0$55’46,80’’	VBt22616		1		

STT	ĐỊA ĐIỂM		VĨ ĐỘ	KINH ĐỘ	MÃ HÓA	Tinh thể			
	TỈNH, TP	HUYỆN, XÃ				Hình Thoi	Hình ovan	Hình cầu	Hình quả trám
20	**Nam Định**	Đê Sông Hồng, Mỹ Tân, Mỹ Lộc	$20^0$26’42,30’’	$106^0$12’06,10’’	VBt22811	1		1	
21	Nam Định	Hiền Khánh, Vũ Bản	$20^0$26’35,1’’	$106^0$03’58,10’’	VBt2284	1			
22	**Hưng Yên**	Nam Dương, Nhật Tân, Tiên Lữ	$20^0$41’17,1’’	$106^0$05’34,0’’	VBt2214			1	
23	Hưng Yên	Toàn Thắng, Kim Động	$20^0$47’53,9’’	$106^0$02’27,5’’	VBt2219		1		
24	Hưng Yên	Lục Điền, Minh Châu, Yên Mỹ	$20^0$51’34,0’’	$106^0$01’17,04’’	VBt2219				1
25	**Bắc Ninh**	Tân Chí, Tiên Du	$21^0$04’30,6’’	$106^0$05’37,6’’	VBt2228			1	
26	Bắc Ninh	Tương Giang, Từ Sơn	$21^0$07’22,8’’	$105^0$59’24,6’’	VBt22210	1		1	
27	**Hải Dương**	Ninh Thành, Ninh Giang	$20^0$45’31,3’’	$106^0$22’28,3’’	VBt22014			1	
28	Hải Dương	Cao Thắng, Thanh Miện	$20^0$45’54,8’’	$106^0$13’18,13’’	VBt22019		1		
29	**Hải Phòng**	Địa phận An Hòa, Vĩnh Bảo	$20^0$40’13,9’’	$106^0$28’04,6’’	VBt2254		1		

STT	ĐỊA ĐIỂM		VĨ ĐỘ	KINH ĐỘ	MÃ HÓA	Tinh thể			
	TỈNH, TP	HUYỆN, XÃ				Hình Thoi	Hình ovan	Hình cầu	Hình quả trám
30	Hải Phòng	Xã Nguyên Giáp, Tú Kỳ	$20^0$45’30,5’’	$106^0$29’34,7’’	VBt22511	1			
31	Hải Phòng	Bảo An, An Lão	$20^0$50’05’’	$106^0$33’19,7’’	VBt22515				1
1	**Đà Nẵng**	Biển Thanh Khê	$16^0$04’42,10’’	$108^0$10’23,8’’	VBt2361	1			
2	Đà Nẵng	Hòa Khánh, Đà Nẵng	$16^0$04’40,7’’	$108^0$10’28,9’’	VBt2362	1			
3	Đà Nẵng	Ngũ Hành Sơn	$16^0$00’21,0’’	$108^0$15’50,6’’	VBt2367	1			
4	**Quảng Nam**	Bình Quí, Thăng Bình	$15^0$42’55,7’’	$108^0$21’26,0’’	VBt2351			1	
5	Quảng Nam	Quế Phú, Quế Sơn	$15^0$47’54,4’’	$108^0$20’25,1’’	VBt2357	1		1	
6	Quảng Nam	Bình Minh, Thăng Bình	$15^0$46’27,2’’	$108^0$25’59,0’’	VBt2358		1		
7	Quảng Nam	S. Trường Giang Bình Giang, Thăng Bình	$15^0$48’29,8’’	$108^0$21’00,8’’	VBt23511	1			1
8	**Bình Thuận**	Núi Tà Cú	$10^0$49’34,1’’	$107^0$52’56,9’’	VBt2522	1			
9	Bình Thuận	Mũi Né, Phan Thiết	$10^0$56’22,6’’	$108^0$9’25,7’’	VBt2527	1			

STT	ĐỊA ĐIỂM		VĨ ĐỘ	KINH ĐỘ	MÃ HÓA	Tinh thể			
	TỈNH, TP	HUYỆN, XÃ				Hình Thoi	Hình ovan	Hình cầu	Hình quả trám
10	Bình Thuận	Long Hải, huyện Phú Quí	$10^0$32’77,8’’	$108^0$56’84,4’’	VBt2528		1		
11	Bình Thuận	Mỹ Khê, phuyện Phú Quí	$10^0$30’90,7’’	$108^0$55’90,0’’	VBt25211			1	
12	Bình Thuận	Tam Thanh, huyện Phú Quí	$10^0$30’80,9’’	$108^0$56’39,4’’	VBt25212	1			
	Đông Nam bộ (4 tỉnh - 33/196)								
1	**TPHCM**	Lý Nhơn, Cần Giờ	$10^0$33’25,1’’	$106^0$45’30,1’’	VBt281	1			
2	TPHCM	An Thới Đông, Cần Giờ	$10^0$30’25,1’’	$106^0$51’45,8’’	VBt283	1			
3	TPHCM	An Thới Đông, Cần Giờ	$10^0$30’51,3’’	$106^0$51’41,5’’	VBt285	1		1	
4	TPHCM	An Thới Đông, Cần Giờ	$10^0$30’01,6’’	$106^0$51’52,6’’	VBt287	1		1	
5	TPHCM	NĐ, Củ Chi	$11^0$02’17,7’’	$106^0$28’47,2’’	VBt2836	1			1
6	TPHCM	NĐ, Củ Chi	$11^0$02’32,2’’	$106^0$29’34,9’’	VBt2847	1			
7	TPHCM	TLT, Củ Chi	$11^0$04’42,5’’	$106^0$25’50,4’’	VBt2857	1			
8	TPHCM	Thạnh Xuân, Q12	$10^0$53’17,7’’	$106^0$40’23,7’’	VBt2874	1	1		
9	TPHCM	Nhị Bình, Hóc Môn	$10^0$55’6,7’’	$106^0$41’6,8’’	VBt2881	1			1
10	TPHCM	Đông Thạnh, Hóc Môn	$10^0$53’58,1’’	$106^0$38’34,5’’	VBt28105	1		1	

STT	ĐỊA ĐIỂM		VĨ ĐỘ	KINH ĐỘ	MÃ HÓA	Tinh thể			
	TỈNH, TP	HUYỆN, XÃ				Hình Thoi	Hình ovan	Hình cầu	Hình quả trám
11	TPHCM	Thới Tam Thôn, Hóc Môn	$10^0$53’13,0’’	$106^0$37’22,0’’	VBt28117	1		1	
12	**Tây Ninh**	Suối Đá, Dương Minh Châu	$11^0$24’1,3’’	$106^0$19’42,8’’	VBt2762	1			
13	Tây Ninh	Suối Đá, Dương Minh Châu	$11^0$22’40,6’’	$106^0$11’38,7’’	VBt2767	1			
14	Tây Ninh	Sông Vàm Cỏ Đông	$11^0$7’24,3’’	$106^0$13’57,7’’	VBt27611	1			
15	Tây Ninh	Phước Lưu, Trảng Bàng	$11^0$1’59,8’’	$106^0$13’44,0’’	VBt27614			1	
16	Tây Ninh	Thành Điền, Châu Thành	$11^0$13’10,4’’	$106^0$5’24,3’’	VBt27618			1	
17	**Đồng Nai**	Thống Nhất	$10^0$58’07,3’’	$107^0$08’37”	VBt2511	1			
18	Đồng Nai	Định Quán	$11^0$08’54,8”	$107^0$14’4,0”	VBt2519	1			
19	Đồng Nai	Trảng Bom	$11^0$0’34,69”	$107^0$3’2,0”	VBt25114	1			
20	Đồng Nai	Tân Phú	$11^0$24’13,46”	$107^0$23’43,42”	VBt25120	1			
21	**Lâm Đồng**	Phường 9, Đà Lạt	$11^0$57’37”	$108^0$28’23”	VBt2639			1	
22	Lâm Đồng	Phường Xuân Thọ	$11^0$56’46”	$108^0$30’58”	VBt26310	1			
23	Lâm Đồng	Phường 4, Đà Lạt	$11^0$54’46”	$108^0$25’12”	VBt26311			1	
24	Lâm Đồng	Phường 7, Đà Lạt	$11^0$58’38”	$108^0$25'13”	VBt26312	1			
25	Lâm Đồng	Hồ lắng, Hồ Xuân Hương	$11^0$57’04.6”	$108^0$27’07.6”	VBt26313			1	
26	Lâm Đồng	Xã Đạ Sar, Lạc Dương	$12^0$5’20”	$108^0$31’47”	VBt26314	1			
27	Lâm Đồng	Xã Đạ Sar, Lạc Dương	$12^0$0’49”	$108^0$29’49”	VBt26315			1	

STT	ĐỊA ĐIỂM		VĨ ĐỘ	KINH ĐỘ	MÃ HÓA	Tinh thể			
	TỈNH, TP	HUYỆN, XÃ				Hình Thoi	Hình ovan	Hình cầu	Hình quả trám
28	Lâm Đồng	Thị Trấn, Lạc Dương	$12^0$02’42”	$108^0$29’17”	VBt26316			1	
29	Lâm Đồng	Xã Đạ Chais, Lạc Dương	$12^0$7’56”	$108^0$37’60”	VBt26317	1			1
30	Lâm Đồng	Xã Ka Đô, Đơn Dương	$11^0$77’00”	$108^0$51’62”	VBt26318	1		1	
31	Lâm Đồng	Xã Lạc Xuân, Đơn Dương	$11^0$78'40”	$108^0$56’65”	VBt26321			1	
32	Lâm Đồng	Thị trấn Phi Nôm	$11^0$45'59"	$108^0$22’48”	VBt26325			1	
33	Lâm Đồng	Xã Hiệp Thạnh, Đức Trọng	$11^0$45'08”	$108^0$24’24”	VBt26327			1	
	Đồng bằng sông Cửu Long (5 tỉnh - 17/106)								
1	**Tiền Giang**	Hậu Thuận, Hậu Thành - C.Bè	$10^0$23’05”	$105^0$59’57”	VBt2735	1			
2	Tiền Giang	Hậu Thuận, Hậu Thành - C.Bè	$10^0$23’05”	$105^0$59’57”	VBt2736	1			
3	Tiền Giang	Tân Thành - Gò Công Đông	$10^0$18’49’’	$106^0$45’35’’	VBt27310	1			
4	Tiền Giang	Tăng Hoà - Gò Công Đông	$10^0$18’38’’	$106^0$42’57’’	VBt27311	1			
5	Tiền Giang	An Thái - An Cư - Cái Bè	$10^0$22’39’’	$106^0$4’48’’	VBt27315	1			1
6	Tiền Giang	Phú Thạnh, Phú Riềng - Châu Thành	$10^0$22’27’’	$106^0$17’53’’	VBt27322				1
7	**Bến Tre**	Bình Thành, Giồng Trôm	$10^0$08’35,5’’	$106^0$32’33,8’’	VBt2751	1			
8	Bến Tre	Tân Thạnh, Giồng Trôm	$10^0$08’19.43’’	$106^0$29’54.8’’	VBt2752	1		1	
9	Bến Tre	Phú Hưng, Giồng Trôm	$10^0$14'21.9’’	$106^0$24’18.0’’	VBt2753	1	1		

STT	ĐỊA ĐIỂM		VĨ ĐỘ	KINH ĐỘ	MÃ HÓA	Tinh thể			
	TỈNH, TP	HUYỆN, XÃ				Hình Thoi	Hình ovan	Hình cầu	Hình quả trám
10	Bến Tre	Tân Hào, Giồng Trôm	$10^0$08’29.50’’	$106^0$28’28.23’’	VBt2754	1	1		
11	Bến Tre	Tân Thạnh, Giồng Trôm	$10^0$07’38.11’’	$106^0$29’49.9’’	VBt2755	1		1	
12	Bến Tre	Lương Hòa, Giồng Trôm	$10^0$12’55.13’’	$106^0$21’14.22’’	VBt2756	1			
13	Bến Tre	Thạnh Trị, Bình Đại	$10^0$8’40,1’’	$106^0$38’12,5’’	VBt27510	1	1		
14	**An Giang**	Bình Phươc Xuân	$10^0$26’17,9’’	$105^0$33’32,6’’	VBt2961	1			
15	**Đồng Tháp**	Cao Lãnh	$10^0$16’59,5’’	$105^0$45’55,4’’	VBt2771	1			
16	**Kiên Giang**	Phú Quốc			VBt2971	1			
17	Kiên Giang	Phú Quốc			VBt2975		1		

PHỤ LỤC

SỐ LIỆU VÙNG LÂY MẪU

STT	ĐỊA ĐIỂM		VĨ ĐỘ	KINH ĐỘ	MÃ HÓA	Gen độc tố				
	TỈNH, TP	HUYỆN, XÃ				Cry 1	Cry 2	Cry4	Cry 9	Vip3A
	Đồng bằng sông Hồng (8 tỉnh - 31/152)									
1	**Hà Nội**	Xã Dục Tú, Đông Anh	$21^0$06’07,7’’	$105^0$52’42,4’’	VBt246	1		1		
2	Hà Nội	Thôn Lương Nổ (Xã Tuyên Dương) Đông Anh	$21^0$09’36,4’’	$105^0$50’42,1’’	VBt2410	1				
3	Hà Nội	Phú Cường, Sóc Sơn	$21^0$12’09,9’’	$105^0$48’11,7’’	VBt2413	1	1			
4	Hà Nội	Thôn Thượng Đại Thịnh, Mê Linh	$21^0$11’50,6’’	$105^0$42’37,1’’	VBt2417					
5	Hà Nội	Khu Liên Linh, Thanh Trì	$20^0$56’12,3’’	$105^0$51’32,3’’	VBt2426		1			
6	Hà Nội	Hạ Hồi, Thường Tín	$20^0$51’39,0’’	$105^0$52’49,7’’	VBt2429	1				
7	**Vĩnh Phúc**	Đạo Đức, Bình Xuyên	$21^0$14’54,5’’	$105^0$40’28,2’’	VBt2112					
8	Vĩnh Phúc	Cầu Lò Cang	$21^0$16’27,5’’	$105^0$38’31,4’’	VBt2113	1				
9	Vĩnh Phúc	Thanh Trà, Vĩnh Yên	$21^0$16’40,9’’	$105^0$36’48,0’’	VBt2115	1				

STT	ĐỊA ĐIỂM		VĨ ĐỘ	KINH ĐỘ	MÃ HÓA	Gen độc tố				
	TỈNH, TP	HUYỆN, XÃ				Cry 1	Cry 2	Cry4	Cry 9	Vip3A
10	Vĩnh Phúc	Phước Lưu, Vĩnh Yên	$21^0$16’56,0’’	$105^0$37’28,3’’	VBt2116					
11	Vĩnh Phúc	Đạo Đức, Bình Xuyên	$21^0$15’16,1’’	$105^0$39’59,0’’	VBt2119	1	1			1
12	Vĩnh Phúc	Thị Xã Phúc Yên	$21^0$13’40,6’’	$105^0$42’48,0’’	VBt21110	1	1			1
13	**Thái Bình**	Khu cầu Bo, TP Thái Bình	$20^0$27’12,7’’	$106^0$20’55,2’’	VBt2272					
14	Thái Bình	Ngã Ba Đông Mỹ	$20^0$27’43,2’’	$106^0$21’3,33’’	VBt2274	1				
15	Thái Bình	Xã Phú Lương, Đông Hưng	$20^0$34’13,8’’	$106^0$20’34’’	VBt2277					
16	Thái Bình	Xã Đông Hải, Quỳnh Phụ	$20^0$36’22,2’’	$106^0$22’48,7’’	VBt2279	1				
17	Thái Bình	Tả Sông Hồng, Vũ Thư	$20^0$26’30,10’’	$106^0$13’16,20’’	VBt22713	1	1			
18	**Hà Nam**	Xã Thanh Tuyền, Thanh Liêm	$20^0$29’51,7’’	$105^0$55’02,5’’	VBt2263					
19	Hà Nam	Liêm Chung, Phú Lý	$20^0$31’33,4’’	$105^0$55’46,80’’	VBt22616	1				

STT	ĐỊA ĐIỂM		VĨ ĐỘ	KINH ĐỘ	MÃ HÓA	Gen độc tố				
	TỈNH, TP	HUYỆN, XÃ				Cry 1	Cry 2	Cry4	Cry 9	Vip3A
20	**Nam Định**	Đê Sông Hồng, Mỹ Tân, Mỹ Lộc	$20^0$26’42,30’’	$106^0$12’06,10’’	VBt22811	1				
21	Nam Định	Hiền Khánh, Vũ Bản	$20^0$26’35,1’’	$106^0$03’58,10’’	VBt2284	1				
22	**Hưng Yên**	Nam Dương, Nhật Tân, Tiên Lữ	$20^0$41’17,1’’	$106^0$05’34,0’’	VBt2214					
23	Hưng Yên	Toàn Thắng, Kim Động	$20^0$47’53,9’’	$106^0$02’27,5’’	VBt2219	1				
24	Hưng Yên	Lục Điền, Minh Châu, Yên Mỹ	$20^0$51’34,0’’	$106^0$01’17,04’’	VBt2219	1	1			
25	**Bắc Ninh**	Tân Chí, Tiên Du	$21^0$04’30,6’’	$106^0$05’37,6’’	VBt2228					
26	Bắc Ninh	Tương Giang, Từ Sơn	$21^0$07’22,8’’	$105^0$59’24,6’’	VBt22210	1				
27	**Hải Dương**	Ninh Thành, Ninh Giang	$20^0$45’31,3’’	$106^0$22’28,3’’	VBt22014					
28	Hải Dương	Cao Thắng, Thanh Miện	$20^0$45’54,8’’	$106^0$13’18,13’’	VBt22019	1				
29	**Hải Phòng**	Địa phận An Hòa, Vĩnh Bảo	$20^0$40’13,9’’	$106^0$28’04,6’’	VBt2254					

STT	ĐỊA ĐIỂM		VĨ ĐỘ	KINH ĐỘ	MÃ HÓA	Gen độc tố				
	TỈNH, TP	HUYỆN, XÃ				Cry 1	Cry 2	Cry4	Cry 9	Vip3A
30	Hải Phòng	Xã Nguyên Giáp, Tú Kỳ	$20^0$45’30,5’’	$106^0$29’34,7’’	VBt22511	1				
31	Hải Phòng	Bảo An, An Lão	$20^0$50’05’’	$106^0$33’19,7’’	VBt22515	1				
1	**Đà Nẵng**	Biển Thanh Khê	$16^0$04’42,10’’	$108^0$10’23,8’’	VBt2361					
2	Đà Nẵng	Hòa Khánh, Đà Nẵng	$16^0$04’40,7’’	$108^0$10’28,9’’	VBt2362	1				
3	Đà Nẵng	Ngũ Hành Sơn	$16^0$00’21,0’’	$108^0$15’50,6’’	VBt2367	1				
4	**Quảng Nam**	Bình Quí, Thăng Bình	$15^0$42’55,7’’	$108^0$21’26,0’’	VBt2351					
5	Quảng Nam	Quế Phú, Quế Sơn	$15^0$47’54,4’’	$108^0$20’25,1’’	VBt2357	1				
6	Quảng Nam	Bình Minh, Thăng Bình	$15^0$46’27,2’’	$108^0$25’59,0’’	VBt2358					
7	Quảng Nam	S. Trường Giang Bình Giang, Thăng Bình	$15^0$48’29,8’’	$108^0$21’00,8’’	VBt23511	1				
8	**Bình Thuận**	Núi Tà Cú	$10^0$49’34,1''	$107^0$52’56,9''	VBt2522	1	1			
9	Bình Thuận	Mũi Né, Phan Thiết	$10^0$56’22,6''	$108^0$9’25,7''	VBt2527					

STT	ĐỊA ĐIỂM		VĨ ĐỘ	KINH ĐỘ	MÃ HÓA	Gen độc tố				
	TỈNH, TP	HUYỆN, XÃ				Cry 1	Cry 2	Cry4	Cry 9	Vip3A
10	Bình Thuận	Long Hải, huyện Phú Quí	$10^0$32’77,8''	$108^0$56’84,4''	VBt2528	1				
11	Bình Thuận	Mỹ Khê, phuyện Phú Quí	$10^0$30’90,7''	$108^0$55’90,0''	VBt25211	1	1			
12	Bình Thuận	Tam Thanh, huyện Phú Quí	$10^0$30’80,9''	$108^0$56’39,4''	VBt25212					
	Đông Nam bộ (4 tỉnh - 33/196)									
1	**TPHCM**	Lý Nhơn, Cần Giờ	$10^0$33’25,1’’	$106^0$45’30,1’’	VBt281	1				
2	TPHCM	An Thới Đông, Cần Giờ	$10^0$30’25,1’’	$106^0$51’45,8’’	VBt283	1				
3	TPHCM	An Thới Đông, Cần Giờ	$10^0$30’51,3’’	$106^0$51’41,5’’	VBt285					
4	TPHCM	An Thới Đông, Cần Giờ	$10^0$30’01,6’’	$106^0$51’52,6’’	VBt287					
5	TPHCM	NĐ, Củ Chi	$11^0$02’17,7''	$106^0$28’47,2’’	VBt2836	1	1			
6	TPHCM	NĐ, Củ Chi	$11^0$02’32,2''	$106^0$29’34,9’’	VBt2847	1	1			
7	TPHCM	TLT, Củ Chi	$11^0$04’42,5''	$106^0$25’50,4’’	VBt2857	1	1	1		
8	TPHCM	Thạnh Xuân, Q12	$10^0$53’17,7''	$106^0$40’23,7’’	VBt2874	1	1			
9	TPHCM	Nhị Bình, Hóc Môn	$10^0$55’6,7''	$106^0$41’6,8’’	VBt2881	1				
10	TPHCM	Đông Thạnh, Hóc Môn	$10^0$53’58,1''	$106^0$38’34,5''	VBt28105	1	1			

STT	ĐỊA ĐIỂM		VĨ ĐỘ	KINH ĐỘ	MÃ HÓA	Gen độc tố				
	TỈNH, TP	HUYỆN, XÃ				Cry 1	Cry 2	Cry4	Cry 9	Vip3A
11	TPHCM	Thới Tam Thôn, Hóc Môn	$10^0$53’13,0’’	$106^0$37’22,0’’	VBt28117					
12	**Tây Ninh**	Suối Đá, Dương Minh Châu	$11^0$24’1,3’’	$106^0$19’42,8’’	VBt2762	1	1			
13	Tây Ninh	Suối Đá, Dương Minh Châu	$11^0$22’40,6’’	$106^0$11’38,7’’	VBt2767	1	1			
14	Tây Ninh	Sông Vàm Cỏ Đông	$11^0$7’24,3’’	$106^0$13’57,7’’	VBt27611	1	1			
15	Tây Ninh	Phước Lưu, Trảng Bàng	$11^0$1’59,8’’	$106^0$13’44,0’’	VBt27614	1				
16	Tây Ninh	Thành Điền, Châu Thành	$11^0$13’10,4’’	$106^0$5’24,3’’	VBt27618	1	1	1		
17	**Đồng Nai**	Thống Nhất	$10^0$58’07,3’’	$107^0$08’37”	VBt2511					
18	Đồng Nai	Định Quán	$11^0$08’54,8”	$107^0$14’4,0”	VBt2519	1				
19	Đồng Nai	Trảng Bom	$11^0$0’34,69”	$107^0$3’2,0”	VBt25114	1				
20	Đồng Nai	Tân Phú	$11^0$24’13,46”	$107^0$23’43,42”	VBt25120	1				
21	**Lâm Đồng**	Phường 9, Đà Lạt	$11^0$57’37”	$108^0$28’23”	VBt2639	1			1	
22	Lâm Đồng	Phường Xuân Thọ	$11^0$56’46”	$108^0$30’58”	VBt26310			1		
23	Lâm Đồng	Phường 4, Đà Lạt	$11^0$54’46”	$108^0$25’12”	VBt26311	1				
24	Lâm Đồng	Phường 7, Đà Lạt	$11^0$58’38”	$108^0$25'13”	VBt26312		1			
25	Lâm Đồng	Hồ lắng, Hồ Xuân Hương	$11^0$57’04.6”	$108^0$27’07.6”	VBt26313					
26	Lâm Đồng	Xã Đạ Sar, Lạc Dương	$12^0$5’20”	$108^0$31’47”	VBt26314	1	1			
27	Lâm Đồng	Xã Đạ Sar, Lạc Dương	$12^0$0’49”	$108^0$29’49”	VBt26315	1				

STT	ĐỊA ĐIỂM		VĨ ĐỘ	KINH ĐỘ	MÃ HÓA	Gen độc tố				
	TỈNH, TP	HUYỆN, XÃ				Cry 1	Cry 2	Cry4	Cry 9	Vip3A
28	Lâm Đồng	Thị Trấn, Lạc Dương	12^{0}02’42”	108^{0}29’17”	VBt26316	1				
29	Lâm Đồng	Xã Đạ Chais, Lạc Dương	12^{0}7’56”	108^{0}37’60”	VBt26317	1	1			
30	Lâm Đồng	Xã Ka Đô, Đơn Dương	11^{0}77’00”	108^{0}51’62”	VBt26318					
31	Lâm Đồng	Xã Lạc Xuân, Đơn Dương	11^{0}78'40”	108^{0}56’65”	VBt26321	1	1	1		
32	Lâm Đồng	Thị trấn Phi Nôm	11^{0}45'59"	108^{0}22’48”	VBt26325					
33	Lâm Đồng	Xã Hiệp Thạnh, Đức Trọng	11^{0}45'08”	108^{0}24’24”	VBt26327	1				
	Đồng bằng sông Cửu Long (5 tỉnh - 17/106)									
1	**Tiền Giang**	Hậu Thuận, Hậu Thành - C.Bè	10^{0}23’05”	105^{0}59’57”	VBt2735	1	1			1
2	Tiền Giang	Hậu Thuận, Hậu Thành - C.Bè	10^{0}23’05”	105^{0}59’57”	VBt2736	1	1			1
3	Tiền Giang	Tân Thành - Gò Công Đông	10^{0}18’49''	106^{0}45’35''	VBt27310		1			
4	Tiền Giang	Tăng Hoà - Gò Công Đông	10^{0}18’38''	106^{0}42’57''	VBt27311	1				
5	Tiền Giang	An Thái - An Cư - Cái Bè	10^{0}22’39''	106^{0}4’48''	VBt27315	1				
6	Tiền Giang	Phú Thạnh, Phú Riềng - Châu Thành	10^{0}22’27''	106^{0}17’53''	VBt27322		1			
7	**Bến Tre**	Bình Thành, Giồng Trôm	10^{0}08’35,5''	106^{0}32’33,8''	VBt2751	1	1			
8	Bến Tre	Tân Thạnh, Giồng Trôm	10^{0}08’19.43''	106^{0}29’54.8''	VBt2752	1	1	1		
9	Bến Tre	Phú Hưng, Giồng Trôm	10^{0}14'21.9''	106^{0}24’18.0''	VBt2753	1				

STT	ĐỊA ĐIỂM		VĨ ĐỘ	KINH ĐỘ	MÃ HÓA	Gen độc tố				
	TỈNH, TP	HUYỆN, XÃ				Cry 1	Cry 2	Cry4	Cry 9	Vip3A
10	Bến Tre	Tân Hào, Giồng Trôm	$10^0$08’29.50’’	$106^0$28’28.23’’	VBt2754	1		1		
11	Bến Tre	Tân Thạnh, Giồng Trôm	$10^0$07’38.11’’	$106^0$29’49.9’’	VBt2755	1	1			
12	Bến Tre	Lương Hòa, Giồng Trôm	$10^0$12’55.13’’	$106^0$21’14.22’’	VBt2756		1			
13	Bến Tre	Thạnh Trị, Bình Đại	$10^0$8’40,1’’	$106^0$38’12,5’’	VBt27510	1				1
14	**An Giang**	Bình Phươc Xuân	$10^0$26’17,9’’	$105^0$33’32,6”	VBt2961					
15	**Đồng Tháp**	Cao Lãnh	$10^0$16’59,5”	$105^0$45’55,4”	VBt2771	1				
16	**Kiên Giang**	Phú Quốc			VBt2971	1				
17	Kiên Giang	Phú Quốc			VBt2975	**1**				