

## KHẢO SÁT TẦN SUẤT CÁC ALLEN CÓ LỢI CHO TÍCH LŨY $\beta$ -CAROTENE Ở MỘT SỐ MẪU GIỐNG NGÔ TRỒNG Ở VIỆT NAM

Trần Thị Lương, Nguyễn Đức Thành\*

Viện Công nghệ Sinh học, VAST, Việt Nam

**TÓM TẮT:** Hàm lượng carotenoid tiền vitamin A, trong đó có  $\beta$ -carotene ở hạt ngô rất thấp và thay đổi nhiều ở các mẫu giống ngô. Những kết quả nghiên cứu về vai trò của các allen của gen *crtRBI* và *LycE* trong tích lũy  $\beta$ -carotene ở ngô cho thấy một số allen có thể điều hòa gia tăng hàm lượng  $\beta$ -carotene. Các allen này được gọi là các allen có lợi cho tích lũy  $\beta$ -carotene. Tuy nhiên, tần suất các allen có lợi ở các giống ngô truyền thống là rất thấp. Và vì thế các allen này được biết đến là các allen hiếm. Việc xác định các mẫu giống ngô mang allen có lợi và có hàm lượng  $\beta$ -carotene cao phục vụ cho nghiên cứu cải tạo giống ngô theo hướng gia tăng hàm lượng carotenoid tiền vitamin A, đặc biệt là  $\beta$ -carotene là rất quan trọng. Trong nghiên cứu này, chúng tôi khảo sát tần suất các allen của gen *crtRBI* và *LycE* có lợi cho tích lũy  $\beta$ -carotene ở 20 mẫu giống ngô trồng ở Việt Nam. Kết quả nhận được cho thấy tần suất allen có lợi của *crtRBI* ở các mẫu giống ngô nghiên cứu là 25% và của *LycE* là 5%. Có 4 mẫu giống (H240, H95, H20 và Ngô nâu vàng Lắc, Đắc Lắc) mang allen có lợi và có hàm lượng  $\beta$ -carotene cao (từ 6,100 đến 17,247  $\mu\text{g/g}$ ). Các mẫu giống ngô này là nguồn nguyên liệu quan trọng cho các nghiên cứu cải tạo hàm lượng  $\beta$ -carotene ở ngô.

*Từ khóa:* Allen có lợi,  $\beta$ -carotene, carotenoid tiền vitamin A, cây ngô (*Zea mays* L.), tần suất allen.

### MỞ ĐẦU

Vitamin A là chất dinh dưỡng cần thiết cho con người đặc biệt là đối với hệ thống thị giác, hoạt động tăng trưởng và phát triển, duy trì tính toàn vẹn của tế bào biểu mô, hệ miễn dịch và sinh sản (Burri et al., 1997). Con người và động vật không thể tự tổng hợp được vitamin A, do đó cần phải cung cấp thông qua chất carotenoid tiền vitamin A (TVA) trong chế độ ăn uống. Thiếu vitamin A là vấn đề ảnh hưởng đến sức khỏe trên toàn cầu: làm cho 140 đến 250 triệu người bị nguy cơ mắc nhiều vấn đề về sức khỏe (Harjes et al., 2008); có thể dẫn đến mù lòa và gia tăng bệnh tật cũng như tỷ lệ tử vong ở trẻ em mầm non (WHO, 2010); làm giảm hệ thống miễn dịch ở trẻ em dẫn đến tăng nguy cơ tử vong do các bệnh truyền nhiễm (Tanumihardjo et al., 2016).

Ngô được tiêu thụ bởi hơn một tỷ người trên thế giới, đặc biệt là các vùng tiểu Saharan của châu Phi, Mỹ La Tinh và nhiều vùng châu Á. Hàm lượng carotenoid ở hạt ngô cao hơn so với các cây ngũ cốc khác, tuy nhiên lại rất thấp và thay đổi nhiều ở các giống ngô. Trong ngô vàng, carotenoid TVA ở nội nhũ bao gồm  $\alpha$ -carotene,  $\beta$ -carotene và  $\beta$ -cryptoxanthin, hàm

lượng chỉ thấp từ 0 đến 1,3, 0,13 đến 2,7 và 0,13 đến 1,9 nmol/g tương ứng (Kurilich, Juvik, 1999). Các giống ngô phát triển gần đây đã đạt được hàm lượng  $\beta$ -carotene khoảng 15  $\mu\text{g/g}$  (HarvestPlus, 2007) và thậm chí 25  $\mu\text{g/g}$  (USDA, 2007). Với hàm lượng này có thể hỗ trợ khoảng 57% nhu cầu vitamin A cần thiết hàng ngày cho con người (Pixley, 2010). Điều này mở ra khả năng lớn cho việc cải tiến giống ngô có hàm lượng carotenoid TVA cao, đặc biệt là  $\beta$ -carotene.

Ở ngô có sự khác nhau tự nhiên đáng kể về hàm lượng carotenoid (Harjes et al., 2008). Nhờ sự khác nhau này mà có thể chọn, tạo được các mẫu giống có hàm lượng  $\beta$ -carotene cao. Các nhà nghiên cứu tại Trung tâm Dịch vụ nghiên cứu nông nghiệp của Hoa Kỳ đã xác định trình tự DNA ngô liên kết với hàm lượng  $\beta$ -carotene cao. Và các nhà trồng trọt đã lai tạo một số mẫu giống ngô khác nhau để tạo ra giống ngô có hàm lượng  $\beta$ -carotene tăng gấp 18 lần so với đối chứng (USDA, 2010).

Các kết quả nghiên cứu về vai trò của gen *crtRBI* và *LycE* trong tích lũy  $\beta$ -carotene ở ngô (Yan et al., 2010; Babu et al., 2013; Zhang et al., 2012; Azmach et al., 2013) cho thấy vai trò khác nhau của các allen khác nhau của hai gen

này lên hàm lượng  $\beta$ -carotene trong các mẫu giống ngô nghiên cứu. Yan et al. (2010) khẳng định gen *crtRB1* ( $\beta$ -carotene hydroxylase) là một gen quan trọng liên quan đến hàm lượng  $\beta$ -carotene trong hạt ngô. Thông qua lập bản đồ liên kết, đã xác định được ba vùng của gen *crtRB1* có sự thay đổi liên quan đáng kể với những biến đổi hàm lượng  $\beta$ -carotene đó là: đầu 5'TE (trong khu vực không mã hóa), InDel4 (trong vùng mã hóa) và đầu 3'TE (trái dài từ exon thứ 6 và vùng 3'-UTR không mã hóa). Sự đa hình đầu 3'TE của *crtRB1* tạo ra 3 allen: allele 1 (543 bp không chèn TE), allen 2 (296 bp + 875 bp; với đoạn chèn 325 bp TE) và allen 3 (296 bp + 1221 bp + 1880 bp; với đoạn chèn 1250 bp TE) có liên quan đến thay đổi tích lũy  $\beta$ -carotene (Yan et al., 2010). Allele 1 được biết đến như một allen có lợi cho việc gia tăng  $\beta$ -carotene nhờ sự làm giảm biểu hiện phiên mã gen *crtRB1*, trong khi đó allen 2 và allen 3 là các allen bất lợi. Harjes et al. (2008) thông báo sự hiện diện của 4 allen trong vùng 5'TE của gen *LcyE* (*lycopene epsilon cyclase*) gồm: allen 1 (150 + 280 bp), allen 2 (250 bp), allen 3 (250 bp + 380 bp) và allen 4 (650 bp). Trong số này, allen 1 và allen 4 là hai allen có lợi điều hòa tăng tổng hợp carotenoid qua nhánh  $\beta$ , trong khi đó allen 2 và allen 3 là các allen bất lợi.

Zunjare et al. (2017) nghiên cứu ảnh hưởng của các allen hiếm của gen *crtRB1* và *LcyE* lên sự tích lũy carotenoid TVA ở một số giống ngô cận nhiệt đới đã chỉ ra gen *crtRB1* di truyền không theo Mendel, trong khi gen *LcyE* được di truyền theo Mendel. Kiểu gen với allen có lợi của *crtRB1* (CC) có ảnh hưởng đáng kể đến tích lũy  $\beta$ -carotene (7,9 lần),  $\beta$ -cryptoxanthin (gấp hai lần) và carotenoid TVA (5,5 lần) so với kiểu gen bất lợi (C<sup>+</sup>C<sup>+</sup>). Kiểu gen với allen có lợi của *LcyE* (LL) có sự tăng cường đáng kể 2,1 lần, 1,6 lần và gấp đôi ở  $\beta$ -carotene,  $\beta$ -cryptoxanthin và carotenoid TVA, tương ứng so với kiểu gen bất lợi (L<sup>+</sup>L<sup>+</sup>). Trong 9 kiểu gen, đồng hợp tử kép (CC/LL) có  $\beta$ -carotene trung bình cao nhất (12,60  $\mu$ g/g),  $\beta$ -cryptoxanthin (4,44  $\mu$ g/g) và carotenoid TVA (14,82  $\mu$ g/g), và hiệu quả kết hợp các gen tốt hơn đáng kể so với hiệu ứng từng gen riêng lẻ. Các kết quả này rất hữu ích trong việc xây dựng chiến lược làm giàu carotenoid TVA trong ngô cận nhiệt đới (Zunjare et al., 2017).

Zunjare et al. (2018) nghiên cứu các allen có lợi của gen *LcyE* ở 13 mẫu giống ngô trồng

bản địa và nhập nội đã xác định các kiểu gen giàu carotenoid TVA của CIMMYT-HarvestPlus có allen có lợi thì có hàm lượng TVA cao, trong khi đó các giống Ấn Độ có allen có lợi lại có hàm lượng thấp. Trong 13 kiểu gen thì 8 kiểu gen có allen có lợi còn 5 kiểu gen có allen bất lợi của gen *LcyE*.

Khảo sát trên 300 mẫu giống ngô, Muthusamy et al. (2015) đã nhận thấy tần suất các allen có lợi của gen *crtRB1* và *LcyE* ở các mẫu giống ngô truyền thống là rất thấp, trong đó 3,38% số mẫu giống có allen có lợi (650 bp) của *LcyE*, 3,90% có allen có lợi (543 bp) của gen *crtRB1* và 1,30% có allen có lợi của cả hai gen (Muthusamy et al., 2015). Một số nghiên cứu khác cũng có kết quả tương tự (Selvi et al., 2014). Chính vì vậy, các allen này được ghi nhận trong các công trình nghiên cứu là các allen hiếm. Selvi et al. (2014) nghiên cứu đa hình gen *crtRB1* trong 210 mẫu giống ngô chỉ xác định được mẫu giống ngô UMI 176 mang allen có lợi có thể sử dụng làm vật liệu cho chọn tạo mẫu giống ngô có hàm lượng  $\beta$ -carotene cao.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi khảo sát tần suất các allen có lợi cho sự tích lũy  $\beta$ -carotene của gen *crtRB1* và *LcyE* ở một số mẫu giống ngô trồng ở Việt Nam với mục đích tìm các mẫu giống ngô mang allen có lợi và có hàm lượng  $\beta$ -carotene phù hợp phục vụ cho nghiên cứu cải tạo giống ngô theo hướng gia tăng hàm lượng carotenoid TVA, đặc biệt là  $\beta$ -carotene.

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

20 mẫu giống ngô được nhận từ Viện Nghiên cứu Ngô, thị trấn Phùng, Đan Phượng, Hà Nội (bảng 1).

Để nhân bản các allen *crtRB1-3'TE*, mỗi xuôi: *crtRB1.3'TE-F*: 5'-ACACCAC ATGGACAAGTTCG-3, mỗi ngược: *crtRB1.3'TE-R1*: 5'-ACACTCTGGCCCATGA ACAC-3' và *crtRB1.3'TE-R2*: 5'-ACAGCAATACAGGGGACCAG-3' (Yan et al., 2010) được sử dụng. Các allen *crtRB1-5'TE* được nhân bản bằng cặp mỗi *crtRB1-5'TE-2F*: 5'-TTAGAGCCTCGACCCTCTGTG-3' và *crtRB1-5'TE-2R*: 5'-AATCCC TTTCCATGTACGC-3' (Liu et al., 2015).

Các allen *LcyE-5'TE* được nhân bản bằng cặp mỗi *LcyE-5'TE-F*: 5'-AAGCA GGAAGACATTCCAG-3'; *LcyE-5'TE-R*: 5'-GAGAGGGAGACGACGAGACAC-3' (Babu et al., 2013).

Hoá chất tách chiết DNA genome bao gồm: Nitor lỏng, tris-HCl, EDTA, SDS, NaCl, CTAB, chloroform, isopropanol, isoamyl alcohol, ethanol, phenol, RNase của các hãng Sigma, Merck và Labscan.

Hóa chất dùng cho PCR gồm bộ Kit PCR master mix được đặt mua của hãng Thermo Scientific.

Hóa chất sử dụng cho phân tích  $\beta$ -carotene bao gồm: Nitor lỏng, Ethanol 96%, Petroluem ether, Acetone, Acetonitrile, Methanol, 2,6-bis (1,1 dimethylethyl)-4-methylphenol (BHT), Celite 545, tất cả được mua từ Merck (Merck Ltd., Vietnam). Chất chuẩn:  $\beta$ -carotene mua từ (Sigma-Aldrich Fine Chemicals, St. Louis, MO, USA).

#### PCR với môi cho các allen của các gen nghiên cứu

DNA genome được tách chiết theo phương pháp CTAB của Saghai Maroof et al. (1984). Nhân bản các allen của gen *crtRB1* sử dụng các môi crtRB1.3'TE-F, crtRB1.3'TE-R1, crtRB1.3'TE-R2 và cặp môi crtRB1-5'TE-2F, crtRB1-5'TE-2R. Phản ứng PCR được tiến hành theo các nhiệt độ bắt cặp môi khác nhau, chu trình nhiệt gồm: 94°C trong 5 phút, biến tính 94°C trong 1 phút, bắt cặp môi 64°C trong 1 phút (19 chu kỳ, mỗi chu kỳ giảm 0,5°C), bước kéo dài ở 68°C trong 1 phút, giai đoạn tiếp theo là biến tính 94°C trong 1 phút, bắt cặp môi 55°C trong 1 phút, kéo dài ở 68°C trong 1 phút với 19 chu kỳ và kết thúc chu kỳ ở 68°C trong 10 phút; giữ ở 4°C; thành phần PCR gồm đệm 10 x PCR: 2,5  $\mu$ L; MgCl<sub>2</sub> (25 mM): 1,5  $\mu$ L; dNTP (1 mM): 1  $\mu$ L; môi xuôi (50 ng/ $\mu$ L): 1  $\mu$ L; môi ngược (50 ng/ $\mu$ L): 1  $\mu$ L; Taq DNA polymerase (5 U/ $\mu$ L): 1  $\mu$ L; DNA (50 ng/  $\mu$ L): 1  $\mu$ L và nước cất vô trùng: 12  $\mu$ L.

Nhân bản các allen của gen *LcyE5* sử dụng các môi LcyE-5'TE-F và LcyE-5'TE-R. Chu kỳ phản ứng PCR gồm: 94°C trong 10 s, tiếp theo là 35 chu kỳ (95°C trong 10 s, 58°C trong 35 s, và 72°C 10 s (Harjes et al., 2008).

Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,5%.

#### Tách chiết carotenoid

Carotenoid được chiết xuất từ hạt khô ở 40 DAP (ngày Sau khi tự thụ phấn) bằng sử dụng phương pháp Rivera và Canela (2012) mô tả với một số cải tiến nhỏ. Khoảng 20 đến 25 hạt ngô

được nghiền thành bột mịn bằng cối, chày xù. 100 mg bột nghiền được ủ với 15 mL methanol chứa 0,1 g/L butylat hydroxytoluene (BHT) và khuấy đều trong 20 phút ở 60°C. Carotenoid được chiết xuất bằng cách trộn/lắc mạnh. Hỗn hợp được lọc, chuyển vào một phễu, và thêm vào 15 mL Petroluem ether, sau đó nhẹ nhàng khuấy trong 1 phút. Pha hữu cơ được rửa sạch hai lần với NaCl bão hòa, và loại bỏ pha dung dịch. Các mẫu được làm khô bằng N<sub>2</sub> và được bảo quản ở -80°C.

#### Xác định $\beta$ -carotene

Các mẫu chiết xuất được hòa tan trong acetone. Phân tích HPLC được tiến hành trên hệ thống Hitachi Elite LaChrom HPLC với Diode Array Detector L2450 (Hitachi High-Technologies). Mẫu chiết xuất khô được hòa trong 50  $\mu$ L acetone. Hai mươi microliters mẫu được tiêm vào cột Zorbax Eclipse XDB-C18 (250  $\times$  4,6  $\times$  5; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) với pha động (mobile phase) Acetonitrile: MeOH= 20:80 (v:v). Sử dụng phần mềm EZ Chrome Elite (Agilent Technologies) để ghi nhận và phân tích số liệu.

Dung dịch mẹ  $\beta$ -Carotene chuẩn độ (Sigma-Aldrich Fine Chemicals, St. Louis, MO, USA) được chuẩn bị bằng cách pha 1 mg  $\beta$ -Carotene chuẩn trong 10 mL acetone. Các nồng độ 0,1; 0,25; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10; 20; 30, 40, 50 và 60  $\mu$ g/mL được chuẩn bị bằng cách pha loãng dung dịch mẹ.

Tách chiết, phân tích hàm lượng  $\beta$ -carotene được thực hiện tại Phòng Thử nghiệm hóa thực phẩm, Trung tâm kỹ thuật Tiêu chuẩn đo lường chất lượng 1, Tổng cục Tiêu chuẩn đo lường chất lượng, Số 8 Hoàng Quốc Việt, Hà Nội. Các kết quả là giá trị trung bình của hai lần đo.

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Tần suất allen có lợi của gen *$\beta$ -carotene hydroxylase (crtRB1)* ở các mẫu giống ngô

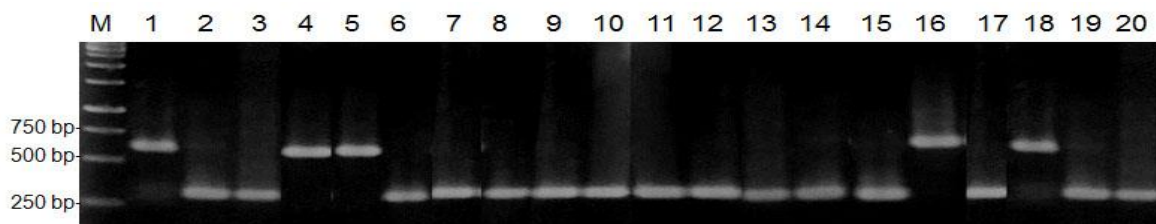
Đối với gen *crtRB1*, đa hình các allen ở đầu 3' (crtRB1-3'TE) và đầu 5' (crtRB1-5'TE) được phân tích. Sự đa hình đầu 3'TE của *crtRB1* tạo ra 3 allen: allele 1 (543 bp không có đoạn chèn TE), allen 2 (296 bp + 875 bp; với đoạn chèn 325 bp TE ) và allen 3 (296 bp + 1221 bp + 1880 bp; với đoạn chèn 1250 bp TE) có liên quan đến thay đổi dự trữ  $\beta$ -carotene (Yan et al., 2010). Allele 1 được biết đến như một allen có lợi cho việc gia tăng  $\beta$ -carotene

nhờ sự làm giảm biểu hiện phiên mã gen *crtRB1*, trong khi đó allen 2 và allen 3 là các allen bất lợi. Kết quả phân tích PCR cho thấy trong 20 mẫu giống ngô nghiên cứu có 5 (25%) mẫu giống (H240, H95, H20, Nếp vàng Phiêng pấn 1 và Nếp vàng Lắc, Đắc Lắc) có allen có lợi (543 bp) cho sự tích lũy  $\beta$ -carotene (bảng 1; hình 1). Thirusendura Selvi và cộng sự (2014), phân tích đa hình các allen ở đầu 3' (*crtRB1*-

3'TE) ở 210 mẫu giống ngô trồng cũng chỉ phát hiện 1 mẫu mang allen có lợi. Muthusamy et al. (2015), khi khảo sát 285 mẫu giống ngô đã xác định được 15 mẫu mang allen có lợi (543 bp) (3,90%). Để xác định các giống ngô giàu  $\beta$ -carotene, Sagare et al. (2015) sàng lọc 70 mẫu giống thuần dựa trên phân tích PCR các allen *crtRB1*-3'TE và đã xác định được bốn mẫu giống (5,71%) có allele có lợi.

**Bảng 1.** Các mẫu giống ngô nghiên cứu và kết quả phản ứng PCR với các cặp mồi cho các allen *crtRB1*-3'TE và *LcyE*-5'TE

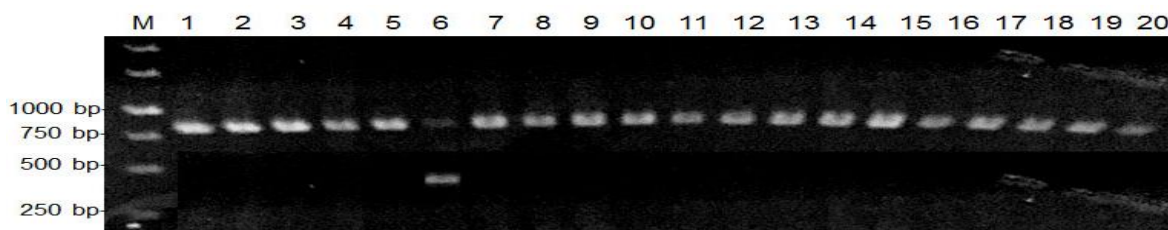
TT	Mẫu giống ngô	<i>crtRB1</i> -3'TE-Allen1: 543 bp = allen có lợi	<i>crtRB1</i> -5'TE 600+206 bp = allen có lợi	<i>LcyE</i> -5'TE Allen 4: 650 bp = allen có lợi
1	H240	543 bp	870 bp	250 bp
2	H145	296 bp	870 bp	250 bp
3	H26	296 bp	870 bp	250 bp
4	H95	543 bp	870 bp	250 bp
5	H20	543 bp	870 bp	250 bp
6	Nếp trắng	296 bp	<b>870 bp, 450 bp</b>	250 bp
7	N618	296 bp	870 bp	250 bp
8	H54	296 bp	870 bp	250 bp
9	H71	296 bp	870 bp	250 bp
10	H171	296 bp	870 bp	250 bp
11	H3014	-	870 bp	250 bp
12	H675	-	870 bp	250 bp
13	H411	296 bp	870 bp	250 bp
14	CML161	296 bp	870 bp	<b>650</b>
15	H4	296 bp	870 bp	250 bp
16	Nếp vàng Phiêng Pấn 1	543	870 bp	250 bp
17	Vàng đậm Miền Nam	296 bp	870 bp	250 bp, 380+bp
18	Ngô nâu vàng Lắc, Đắc Lắc	543	870 bp	250 bp, 380+bp
19	Nếp vàng Nhà Vìn	-	870 bp	250 bp
20	Đá đỏ Đắc Nông	-	870 bp	250 bp



**Hình 1.** Kết quả PCR gen *crtRB1*-3'TE với cặp mồi *crtRB1*-3'TE-F/R2. M. Marker 1.0 bp; 1-20 theo thứ tự các mẫu giống ngô trong bảng 1

Bản chất sự đa hình allen đầu 5' là do thay đổi 397/206 bp indel (Yan et al., 2010). Allen 2 (600 bp + 206 bp) là allen có lợi. Kết quả phân tích 20 mẫu giống ngô cho thấy có sự đa hình giữa các mẫu giống ngô. Tuy nhiên, các

mẫu giống ngô không có băng đặc trưng cho allen có lợi. 19 mẫu giống có băng khoảng 870 bp và một mẫu giống có 2 băng, một băng khoảng 870 bp và một băng khoảng 450 bp (hình 2).



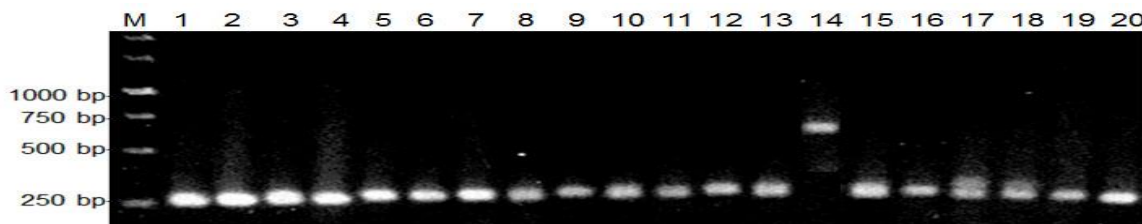
Hình 2. Kết quả PCR gen *rctRB1-5' TE* với cặp mồi *rctRB1-5' TE-F/R2*. M: Marker 1.0 bp; 1-20: theo thứ tự các mẫu giống ngô trong bảng 1

Như vậy, qua phân tích đa hình các allen đầu 3' của gen *crtRB1* ở 20 mẫu giống ngô trồng ở Việt Nam, cho thấy tỷ lệ các mẫu giống mang allen có lợi của *rctRB1-3' TE* khá cao (25%) so với các công bố trước đây (Muthusamy et al., 2015; Sagare et al., 2015). Các mẫu giống ngô này sẽ là vật liệu quan trọng cho chọn tạo giống ngô với hàm lượng  $\beta$ -carotene cao.

#### Tần suất allen có lợi của gen *Lycopene E (LcyE)* ở các mẫu giống ngô

Đa hình các allen *LcyE-5' TE* của gen *LcyE* được phân tích bằng cặp mồi *LcyE-5' TE-F/R* để

xác định kiểu gen của 20 mẫu giống ngô (bảng 1). Với cặp mồi này, 4 allen có thể xuất hiện, trong đó allen 1 (150 bp+280 bp) và allen 4 (650 bp) là các allen có lợi cho tích lũy  $\beta$ -carotene, còn allen 2 (250 bp) và allen 3 (250 bp + 380 bp) là hai allen bất lợi. Kết quả trong bảng 1 và hình 3 cho thấy chỉ có mẫu giống ngô CML161 có allen 4 (650 bp) là allen có lợi. Trong số các mẫu giống mang allen bất lợi, có 17 mẫu giống mang allen 2 (250 bp) và 2 mẫu giống có allen 3 (250 bp + 380 bp). Như vậy, tần suất mang allen có lợi của gen *LcyE-5' TE* ở các mẫu giống ngô nghiên cứu là 5% (1/20 mẫu giống).



Hình 3. Kết quả PCR gen *LcyE-5' TE* với cặp mồi *LcyE-5' TE-F/R*. M: Marker 1 kb; 1-20: Theo thứ tự các mẫu giống ngô trong bảng 1

Nghiên cứu đa hình các allen *LcyE-5' TE* ở 385 mẫu giống ngô trồng, Muthusamy et al. (2015) cũng chỉ phát hiện có 13 mẫu (3,78%) mang allen có lợi (650 bp). Như vậy là tần suất allen có lợi của locus *LcyE-5' TE* là khá thấp.

#### Hàm lượng $\beta$ -carotene trong các mẫu giống ngô

Hàm lượng  $\beta$ -carotene của các mẫu giống ngô được phân tích để xác định các mẫu giống vừa có allen có lợi vừa có hàm lượng  $\beta$ -carotene cao. Kết quả phân tích trong bảng 2 cho thấy các mẫu giống ngô nếp có hàm lượng  $\beta$ -carotene thấp và giao động từ 0  $\mu$ g/g (Nếp trắng) đến 4,346  $\mu$ g/g (Nếp vàng Phiêng Pần 1). Mẫu giống CML161 là mẫu ngô chất lượng protein tốt cũng có hàm lượng  $\beta$ -carotene thấp

(0,610  $\mu$ g/g). Các mẫu giống ngô vàng có hàm lượng  $\beta$ -carotene giao động từ 1,414  $\mu$ g/g (H675) đến 17,274  $\mu$ g/g (H240). Theo Harjes et al. (2008), hàm lượng  $\beta$ -carotene của các giống ngô vàng phổ biến từ 0,5  $\mu$ g/g đến 1,5  $\mu$ g/g, các giống có hàm lượng  $\beta$ -carotene từ 3,0  $\mu$ g/g đến 5,5  $\mu$ g/g là trung bình, còn các giống có hàm lượng cao hơn 5,5  $\mu$ g/g là các giống có hàm lượng  $\beta$ -carotene cao. Trong nghiên cứu này, chúng tôi nhận được 5 mẫu giống có hàm lượng  $\beta$ -carotene cao (từ 6,100 (H95) đến 17,274  $\mu$ g/g (H240)). 4/5 mẫu giống ngô này đều có allen có lợi của gen *crtRB1 (crtRB1-3' TE)*, riêng mẫu giống Nếp vàng Phiêng Pần 1 có allen có lợi của *crtRB1* nhưng hàm lượng  $\beta$ -carotene không cao (4,346  $\mu$ g/g). Mẫu giống CML161 mang allen có lợi của gen

*LcyE* (*LcyE-5' TE*) cũng có hàm lượng  $\beta$ -carotene thấp. Trong khi mẫu giống H171 có hàm lượng  $\beta$ -carotene cao (10,210  $\mu\text{g/g}$ ) lại không có allen có lợi. Theo Muthusamy et al. (2015), hiện tượng này có thể là do ảnh hưởng của nền di truyền lên các allen dẫn đến sự biểu hiện khác nhau về hình thái. Ngoài ra, chu trình tổng hợp carotenoid rất phức tạp và được điều hòa bởi nhiều gen, trong khi các gen có allen có lợi của *crtRB1* hay *LcyE* lại không có allen có lợi của các gen chủ chốt khác (Muthusamy et

al., 2015). Và cũng có thể do sự chuyển đổi các nucleotid đơn (SNP) ở các gen này (Zunjare et al., 2018). Khi so sánh trình tự *LcyE* của các giống ngô Ấn Độ có hàm lượng tiền vitamin A thấp và các giống ngô của CIMMYT có hàm lượng tiền vitamin A cao và chúng đều có allen có lợi của *LcyE* các tác giả đã phát hiện 4 vị trí chuyển đổi nucleotid đơn có thể cho phép xác định các mẫu giống ngô mang allen có lợi nhưng lại có hàm lượng carotenoid thấp hoặc cao (Zunjare et al., 2018).

**Bảng 2.** Hàm lượng  $\beta$ -carotene (mg/g) ở các mẫu giống ngô nghiên cứu

TT	Mẫu giống ngô	$\beta$ -carotene	TT	Mẫu giống ngô	$\beta$ -carotene
1	H240	17,274	11	H3014	2,012
2	H145	2,281	12	H675	1,414
3	H26	3,240	13	H411	2,289
4	H95	6,100	14	CML161	0,610
5	H20	6,496	15	H4	1,457
6	Nếp trắng	0	16	Nếp vàng Phiêng Pần 1	4,346
7	N618	1,770	17	Vàng đậm Miền Nam	1,734
8	H54	3,487	18	Ngô nâu vàng Lắc, Đắc Lắc	10,538
9	H71	3,153	19	Nếp vàng Nà Vìn	2,355
10	H171	10,210	20	Đá đỏ Đắc Nông	3,437

## KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu tần suất allen có lợi cho tích lũy  $\beta$ -carotene của gen *crtRB1* và *LcyE* ở 20 mẫu giống ngô trồng ở Việt Nam cho thấy tần suất allen có lợi của *crtRB1* ở các mẫu giống ngô nghiên cứu là 25% và của *LcyE* là 5%. Có 4 mẫu giống (H240, H95, H20 và Ngô nâu vàng Lắc, Đắc Lắc) vừa mang allen có lợi ở đầu 3' gen *crtRB1* vừa có hàm lượng  $\beta$ -carotene cao (từ 6,100 đến 17,247  $\mu\text{g/g}$ ). Các mẫu giống ngô này là nguồn nguyên liệu quan trọng cho các nghiên cứu cải tạo hàm lượng  $\beta$ -carotene ở ngô.

**Lời cảm ơn:** Công trình được thực hiện trong khuôn khổ Chương trình Hỗ trợ hoạt động nghiên cứu khoa học cho NCVCC năm 2018 của Viện Hàn lâm Khoa học Công nghệ Việt Nam, Mã số: NCVCC08.05/18-18.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Burri B. J., 1997. Beta-carotene and human health: a review of current research. *Nutrition Research*, 17: 547–580.
- Azmach G., Gedil M., Menkir A., Spillane C., 2013. Marker-trait association analysis of functional gene markers for provitamin A

levels across diverse tropical yellow maize inbred lines. *BMC Plant Biology*, 13: 227.

- Babu R., Rojas N. P., Gao S., Yan J., Pixley K., 2013. Validation of the effects of molecular marker polymorphisms in *LcyE* and *crtRB1* on provitamin A concentrations for 26 tropical maize populations. *Theor Appl Genet*, 126: 389–399. Doi: 10.1007/s00122-012-1987-3.
- Harjes C. E., Rocheford T.R., Bai L., Brutnell T. P., Kandianis C. B., Sowinski S. G., Buckler E. S., 2008. Natural genetic variation in lycopene epsilon cyclase tapped for maize biofortification. *Science*, 319: 330–333.
- HarvestPlus, 2007. The biofortification challenge programme. Annual report, HarvestPlus program. Washington DC.
- Kurilich A. C., Juvik J. A., 1999. Quantification of carotenoid and tocopherol antioxidants in *Zea mays*. *J Agric Food Chem*, 47: 1948–1955.
- Muthusamy V., Hossain F., Thirunavukkarasu N., Saha S., Gupta H. S., 2015. Allelic variations for *lycopene- $\epsilon$ -cyclase* and  *$\beta$ -carotene hydroxylase* genes in maize

- inbreds and their utilization in  $\beta$ -carotene enrichment programme. *Cogent Food & Agriculture* 1: 1033141, <http://dx.doi.org/10.1080/23311932.2015.1033141>
- Pixley K., Babu R., Yan J., Palacios-Rojas N., 2010. Challenges, progress, and state of breeding for pro-vitamin A. First Global Conference on Biofortification: From Discovery to Delivery, 9–11 Nov. 2010. Washington, DC.
- Rivera S., Canela R., 2012. Influence of sample processing on the analysis of carotenoids in maize. *Molecules*, 17: 11255–11268.
- Saghai-Marouf M. A., Soliman K. M., Jorgensen R. A., Allard R. W., 1984. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proc Natl Acad Sci USA*, 81: 8014–8018.
- Selvi T. D., Senthil N., Yuvaraj A., John Joel A., Mahalingam A., Nagarajan P., Vellaikumar S., Srimathi P., Raveendran M., Nepolean T., 2014. Assessment of *crtR1* Polymorphism Associated with Increased  $\beta$ -Carotene Content in Maize (*Zea mays* L.) Seeds, *Food Biotechnology*, 28: 41–49. Doi: 10.1080/08905436.2013.870077.
- Tanumihardjo S. A., Russel R. M., Stephensen C. B., Gannon B. M., Craft N. E., Haskell M. J., Lietz G., Schulze K., Raiten D.J., 2016. Biomarkers of nutrition for development (BOND) - vitamin A review. *J Nutr*, 146: 1816S–1848S.
- US Department of Agriculture (USDA), 2007. USDA Table of Nutrient Retention Factors. Release 6. United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Beltsville, Maryland, USA.
- US Department of Agriculture (USDA), 2010. A new approach that saves eyesight and lives in the developing world <https://www.ars.usda.gov/>.
- World Health Organization, 2010. World health statistics. Geneva, Switzerland: WHO.
- Yan J., Bermudez-Kandianis C. B., Harjes C. E., Bai L., Kim E., Yang X., Skinner D., Fu Z., Mitchell S., Li Q., Salas-Fernandez M., Zaharieva M., Babu R., Fu Y., Palacios N., Li J., DellaPenna D., Brutnell T., Buckler E., Warburton M., Rocherford T., 2010. Rare genetic variation at *Zea mays crtR1* increases  $\beta$ -carotene in maize grain. *Nat Genet*, 42: 322–327.
- Zhang X. et al., 2012. Probability of success of breeding strategies for improving provitamin A content in maize. *Theor Appl Genet*, 125: 235–246.
- Zunjare R. U., Hossain F., Muthusamy V., Baveja A., Chauhan H. S., Thirunavukkarasu N., Saha S., Gupta H. S., 2017. Influence of rare alleles of  $\beta$ -carotene hydroxylase and lycopene epsilon cyclase genes on accumulation of provitamin A carotenoids in maize kernels. *Plant Breeding*, 136(6): 872–880.
- Zunjare R. U., Chhabra R., Hossain F., Baveja A., Muthusamy V., Gupta H. S., 2018. Molecular characterization of 5' UTR of the lycopene epsilon cyclase (*LcyE*) gene among exotic and indigenous inbreds for its utilization in maize biofortification. *3. Biotech* 8: 75, <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1100>.

**INVESTIGATING THE FREQUENCY OF ALLELES OF *crtRB1* AND *LcyE* GENES THAT ARE FAVOABLE FOR  $\beta$ -CAROTENE ACCUMULATION IN SOME MAIZE LINES CULTIVATED IN VIETNAM**

**Tran Thi Luong, Nguyen Duc Thanh\***

Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

**SUMMARY**

Provitamin A carotenoid content, including  $\beta$ -carotene in corn kernels is very low and varies widely in maize lines /varieties. Results of the study on the role of the *crtRB1* and *LcyE* gene alleles in the accumulation of  $\beta$ -carotene in maize showed that some alleles could regulate the increase in  $\beta$ -carotene content. These alleles are called favorable alleles as they are favorable for  $\beta$ -carotene accumulation. However, the frequency of these alleles in traditional maize varieties is very low. And so they are known as rare alleles. The identification of favorable alleles and high  $\beta$ -carotene maize lines for maize improvement in the direction of increased provitamin A carotenoid content, especially  $\beta$ -carotene, is very important. In this study, we investigated the frequency of alleles of the *crtRB1* and *LcyE* genes that are favorable for  $\beta$ -carotene accumulation in 20 maize lines cultivated in Vietnam. The results showed that the favorable allele frequency of *crtRB1* in the studied maize lines was 25% and that of *LcyE* was 5%. Four lines (H240, H95, H20 and Ngô nâu vàng Lắc, Đắk Lắc) carry favorable alleles at 3' end of *crtRB1* gene and have high  $\beta$ -carotene content (from 6,100 to 17,247  $\mu\text{g/g}$ ). These maize lines are an important source for researches in the improvement of  $\beta$ -carotene content in maize.

*Keywords:* Allele frequency,  $\beta$ -carotene, favorable alleles, maize (*Zea mays* L.) pro-vitamin A carotenoid.

*Citation:* Tran Thi Luong, Nguyen Duc Thanh, 2018. Investigating the frequency of alleles of *crtRB1* and *LcyE* genes that are favoable for  $\beta$ -carotene accumulation in some maize lines cultivated in Vietnam. Tap chi Sinh hoc, 40(2): 244–251. <https://doi.org/10.15625/0866-7160/v40n2.13239>.

\*Corresponding author email: [nguyenducthanh\\_pcg@ibt.ac.vn](mailto:nguyenducthanh_pcg@ibt.ac.vn)

Received 29 October 2018, accepted 8 November 2018