

# NGHIÊN CỨU SÀNG LỌC VẬT LIỆU KHỞI ĐẦU BẰNG KIỂU HÌNH VÀ CHỈ THỊ PHÂN TỬ NHẪM CẢI TIẾN ĐỘ MỎNG VỎ VÀ NGỌT CỦA NGÔ NẾP VIỆT NAM

Vi Lạng Sơn<sup>1,2\*</sup>, Lưu Quý Kông<sup>1,2</sup>, Vũ Thị Hương<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Khoa Công nghệ Sinh học Hóa học và Kỹ thuật môi trường, trường Đại học Phenikaa

<sup>2</sup>Trung tâm nghiên cứu nguồn gene, trường Đại học Phenikaa

\*Tác giả liên hệ: [son.vilang@phenikaa-uni.edu.vn](mailto:son.vilang@phenikaa-uni.edu.vn)

## TÓM TẮT

Việc đánh giá chất lượng ngô nếp hiện nay vẫn chủ yếu dựa vào ăn thử nên độ chính xác không cao, độ lặp lại kém và chủ quan gây khó khăn cho việc chọn lọc kiểu hình và cải tiến giống ngô nếp, đặc biệt ở tính trạng vỏ mỏng và độ ngọt. Trong nghiên cứu này, phương pháp đo vỏ dựa trên cắt lát mỏng và đo bằng kính hiển vi được tối ưu hóa, cho độ chính xác và lặp lại khá, quy trình đơn giản. Áp dụng quy trình, chúng tôi đã chọn lọc được một số giống ngô có độ dày của vỏ hạt mỏng làm vật liệu cho chọn tạo giống, đặc biệt có giống có độ vỏ mỏng 15-20 micromet so với đối chứng HN88 là 70-90 micromet. Về độ ngọt, chúng tôi đã thiết kế chỉ thị phân tử cho allele đột biến của gene *SUGARY1*, và gene *SUGAR ENHANCER 1*, và sàng lọc chọn ra các vật liệu tiềm năng nhằm cải tiến độ ngọt của ngô bằng lai trở lại có kiểm tra các chỉ thị phân tử này (marker-assisted backcrossing). Nghiên cứu tạo ra phương pháp đánh giá và chọn lọc chất lượng của ngô ăn tươi một cách khách quan và có độ chính xác cao, đơn giản có ý nghĩa ứng dụng cho chọn lọc cả ngô nếp và ngô ngọt.

**Từ khóa:** vỏ mỏng, độ ngọt, ngô nếp, *sugar enhancer 1*, *sugary 1*

## SCREENING FOR PERICARP THICKNESS AND SWEETNESS TRAIT USING PHENOTYPE AND MOLECULAR MARKERS IN VIETNAMESE WAXY CORN VARIETIES ABSTRACT

Evaluation of eating quality in waxy corn by tasting is subjective, not robust and can be inaccurate which renders the variety improvement of waxy corn, especially for the pericarp thickness and sweetness trait. In this research, methods of measuring pericarp thickness using sectioning and microscopic measurement were optimized. Using this simple and robust method, we screened and selected several maize varieties that have a very thin pericarp, notably one variety showing only 15-20 micrometer thickness compared to the control variety HN88, which showed 70-90 micrometer. For sweetness trait, we designed molecular markers for mutation alleles of *SUGARY 1* (SU1) and *SUGAR ENHANCER 1* (SE1) genes. We screened and identified potential donor parents with the mutations for using in marker-assisted backcrossing. The optimized method for pericarp thickness measurement and the molecular markers in this study will serve as valuable tools for breeding better tasting waxy and sweet corn.

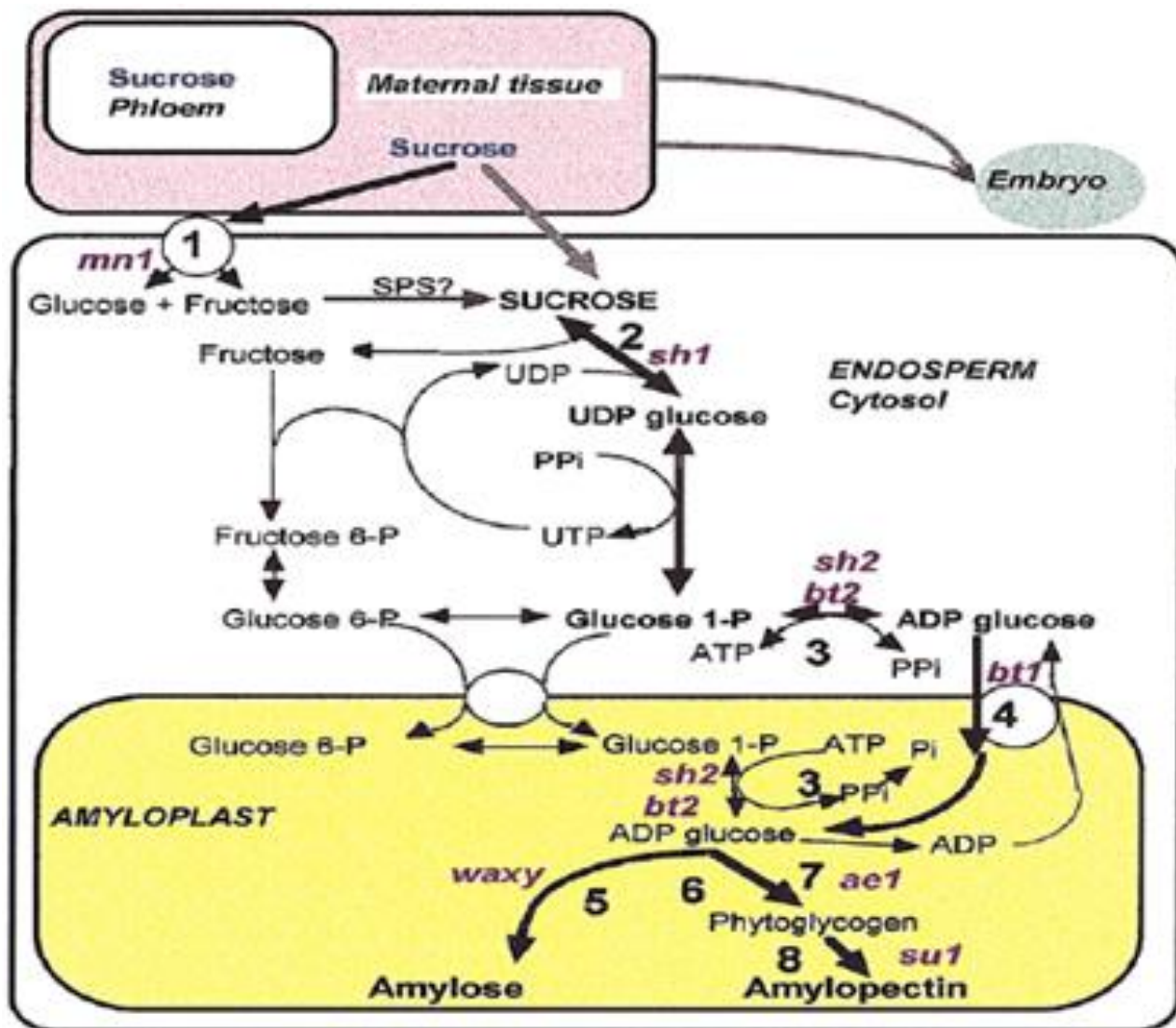
**Keywords:** pericarp thickness, sweetness, waxy corn, *sugar enhancer 1*, *sugary 1*

## 1. GIỚI THIỆU

**Các gene tham gia vào quá trình tổng hợp tinh bột được sử dụng cho chọn tạo ngô nếp (review ở Revilla et al., 2021):**

Sugary1 (SU1) hay còn gọi là Isoamylase ISA1 và shruken seed 2 (sh2) mã hóa cho hai enzyme tham gia vào quá trình tổng hợp tinh bột từ đường ở vùng nội nhũ của hạt, đã được sử dụng rộng rãi trong cải tiến ngô nếp hiện đại. SU1 có mặt trên cánh ngắn của NST số 4 (Bin 4.05) mã hóa cho isoamylase thuộc phức hệ enzym phân nhánh tinh bột (DBEs), tác động tới giai đoạn cuối trong quá trình chuyên hóa tinh bột, amylose và amylopectin. Còn SH2 nằm trên cánh dài của NST số 3 (bin 3.09) mã hóa tiểu đơn vị lớn của adenosine diphosphate glucose pyrophosphorylase (AGPase) của vùng nội nhũ, cùng với các đột biến nội nhũ khác đã được clon và biết đến rộng rãi. Ngô nếp dạng *su1*, hạt khô có độ ít nhão hơn, ăn có độ ngọt kém hơn so với ngô nếp dạng *sh2*. Gene waxy (*wx*) có khả năng mã hóa cho enzyme granule-bound starch synthase (GBSS) I cần thiết để tổng hợp amylose và xác định hàm lượng amylose trong vùng nội nhũ. *sugar enhancer 1* (*se1*) là một alen đột biến tự nhiên có liên quan đến quá trình chuyên hóa tinh bột trong vùng nội nhũ của ngô làm tăng hàm lượng đường trên các giống ngô nếp dạng *su1*, sự kết hợp 2 loại đột biến này cho sản phẩm ngô thu hoạch

có độ mềm, độ đậm vị hơn các loại ngô ngọt khác. Ngoài ra còn một số gene khác cũng tham gia vào quá trình tổng hợp tinh bột ở ngô nhưng không được dùng phổ biến như *su1* và *sh2*, wx như *brittle endosperm 1 (bt1)* (ở Bin 5.04), *brittle endosperm 2 (bt2)* (ở Bin 4.05), *amylose extender 1 (ae1)* (ở Bin 5.04), *sh1 (sus1)* (ở Bin 9.01) **Hình 1**.



**Hình 1.** Quá trình chuyển hóa đường thành tinh bột trong hạt ngô dưới sự điều khiển của gene (theo Green et al., 1998).

### Các nghiên cứu về vỏ hạt :

Vỏ của hạt ngô là cấu trúc nằm ở ngoài cùng, chiếm khoảng 5-7% trọng lượng khô của hạt (Garcia – Lara et al., 2019). Lớp vỏ có cấu tạo chủ yếu là từ các lớp tế bào chết chỉ còn lại phần thành của tế bào, được xếp lại theo từng lớp, thực hiện vai trò chính là hàng rào cơ học bảo vệ hạt khỏi các nhân tố như côn trùng hay tác nhân gây bệnh. Vỏ hạt thành phần chủ yếu là cellulose và lignin là phần khó tiêu hóa nhất, lớp vỏ quá dày sẽ làm giảm cảm giác ngon miệng, do đó cấu trúc lớp vỏ hạt mỏng hơn thì được ưa chuộng hơn. Đặc điểm này có giá trị rất lớn đối với hai loại ngô được sử dụng làm thức ăn cho con người.

Ứng dụng di truyền học vào nghiên cứu độ dày vỏ trước đây đã chỉ ra rằng, độ dày của vỏ hạt ngô được kiểm soát bởi nhiều tác động nhỏ từ các QTLs. Kết quả của các nghiên cứu đó đã chỉ ra chức năng của một số QTL chính trên các nhiễm sắc thể khác nhau, giải thích cho sự biến đổi kiểu hình. Có thể kể tới các nghiên cứu trước đây như: Wu et al. (2020) đã sử dụng vật liệu nghiên cứu là ngô ngọt của Trung Quốc và xây dựng được bản đồ QTL dựa trên 3876 chỉ thị phân tử, tìm ra vai trò của QTL trên NST số 10 giải thích cho 8-35% sự biến đổi kiểu hình. Wanlayaporn et al., 2018 đã sử dụng 109 RILs có nguồn gốc từ ngô ngọt của Thái Lan, nghiên cứu về QTL này của họ đã tìm ra 6

QTLs, một trong số đó giải thích cho sự biến đổi kiểu hình 41-73%, nằm trên NST số 5. Choe và Rocheford, 2012 sử dụng nguồn ngô nếp của Hàn Quốc là nguồn vật liệu nghiên cứu lập ra bản đồ QTL, mặc dù họ đã tìm ra được một vài QTL nhưng chúng không có tác động lớn. Park et al., 2012 thực hiện phân tích QTL cho chất lượng ăn tươi với nguồn vật liệu là các giống lai từ ngô nếp của Hàn Quốc và ngô ngọt thương mại của Mỹ, bản đồ di truyền đã được thiết lập dựa trên 295 chi thị SSR, nhóm nghiên cứu đã xác định được 4 QTLs trong đó QTL lớn nhất có mặt trên NST số 4 có thể giải thích cho 10.4% về sự biến đổi kiểu hình. Wang và Brewbaker et al., 2001 xây dựng bản đồ QTL dựa trên 94 RILs, nghiên cứu đã tìm ra 3 QTLs trong đó vai trò của QTL chính giải thích cho 12% sự biến đổi kiểu hình, được nằm trên NST số 1.

Các nghiên cứu này vẫn còn một số vấn đề hạn chế sự hiểu biết về các cơ chế kiểm soát tính trạng vỏ hạt, đặc biệt là tác động của phần lớn các QTL riêng lẻ này lên kiểu hình được tìm thấy còn khá nhỏ, hầu hết là dưới 12%. Do đó đối với mục đích lai tạo dòng, để cải thiện đặc điểm này, những QTL nhỏ này đòi hỏi phải được kết hợp lại, mà điều này sẽ tốn nhiều thời gian và khó khăn về mặt kỹ thuật do có liên quan đến các tương tác di truyền phức tạp. Bên cạnh đó, trước đây tại Việt Nam có một nghiên cứu về chọn lọc dòng ngô nếp vỏ mỏng (Hà et al., 2013) song việc sử dụng chỉ thị phân tử vẫn chưa được ứng dụng rõ ràng, các giống ngô nếp vỏ mỏng sàng lọc được trong nghiên cứu này có độ dày đều từ 51.6 đến 118.6  $\mu\text{m}$ .

### **Một số phương pháp đo vỏ hạt trong các nghiên cứu trước đây.**

Phương pháp sử dụng kính hiển vi (microscope method Wolf và cộng sự (1969): đầu tiên cho hạt ngô tươi ngâm trong nước từ nửa giờ đến 1 giờ đồng hồ tại nhiệt độ phòng. Giai đoạn tiếp theo được thực hiện trong cryostat, hạt ngô sẽ được cấp đông và cắt theo chiều dọc tạo ra các lát cắt dày chừng 40 $\mu\text{m}$ . Sau đó cho các lát cắt này nhuộm với Oil-Red-O trong propylen glycol, phần vỏ bên ngoài hạt không bắt màu bởi thuốc nhuộm tuy nhiên lipid có trong các lớp tế bào ở vỏ hạt sẽ bắt màu đỏ tươi. Cuối cùng thực hiện phép đo trên lát cắt được xử lý nhuộm màu bằng kính hiển vi có trang bị micrometer đã hiệu chuẩn.

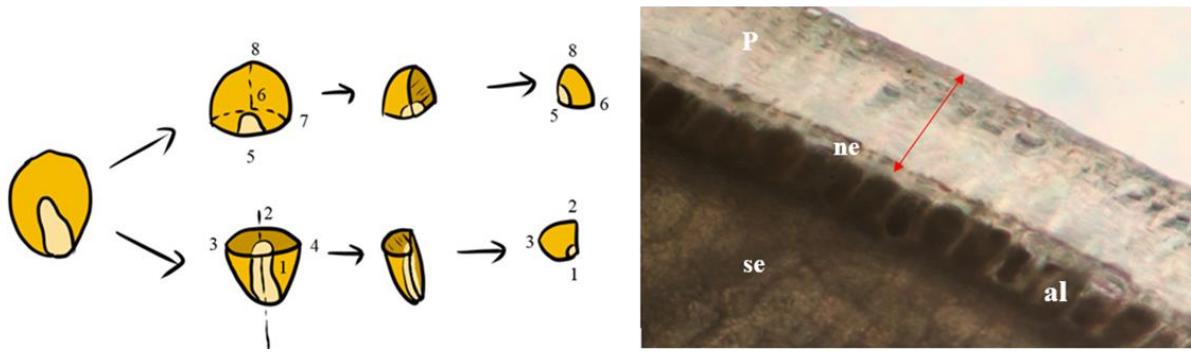
Phương pháp vi trắc kế (micrometer method (Hà et al., 2013): bước đầu đem ngâm hạt ngô ngập trong nước, khoảng 3-4 giờ ở nhiệt độ phòng. Cắt bỏ phần đỉnh hạt và cuống hạt, tách rời phần vỏ ra khỏi hạt. Sau đó cho vỏ đã được tách ngâm trong dung dịch nước glycerol theo tỷ lệ 1 :3, tiếp tục ngâm ở nhiệt độ phòng trong 24 giờ. Bước kế tiếp lấy mảnh vỏ ra khỏi dung dịch, thấm khô, đặt ở nhiệt độ 25C và giữ ở độ ẩm 50% trong 24 giờ.

## **2. NỘI DUNG**

### **Tối ưu hóa phương pháp đo vỏ hạt:**

Để phục vụ cho nghiên cứu độ dày vỏ hạt ngô, cần một phương pháp đo đặc phân tích vỏ hạt nhanh chóng, hiệu quả, đơn giản có độ chính xác cao. Các phương pháp đo vỏ hạt trước đây Wolf et al., 1969; Hà et al., 2013 đòi hỏi phải đông lạnh hạt và xử lý ngâm với glycerol khá phức tạp, ngoài ra quy trình đòi hỏi phải nhuộm các lát cắt hoặc bóc rời vỏ hạt ra rồi mới tiến hành đo, nên thời gian để thực hiện thí nghiệm sẽ bị hạn chế. Trên cơ sở phương pháp kính hiển vi của Wolf et al, 1969, phương pháp sử dụng trong nghiên cứu được tiến hành với một số cải tiến tối ưu phù hợp điều kiện phòng thí nghiệm, trong đó thay vì đông lạnh thì hạt khô được ngâm nước đến khi hạt đủ mềm để cắt lát bằng dao lam.

Trong quá trình tối ưu hóa, chúng tôi nhận thấy mỗi giống ngô khác nhau thì hạt sẽ có đặc điểm về độ dày vỏ và cấu tạo vùng nội nhũ khác nhau. Vì vậy để tối ưu hóa phương pháp chúng tôi nhận ra có 3 yếu tố quan trọng cần lưu ý. Thứ nhất, thời gian ngâm hạt để lát cắt đẹp nhất: khoảng từ 15h đến 22h tùy vào kiểu nội nhũ. Thứ hai, về vị trí và chiều hướng lát cắt có lát cắt ngang (1; 2; 3), lát cắt dọc (5; 6; 8) (**Hình 2**); chúng tôi nhận thấy lát cắt tốt nhất (dễ cắt dễ soi kính hiển vi nhìn thấy lớp vỏ và cho độ lặp lại tốt giữa các lát cắt trên cùng một hạt) có thể phân tích được là lát cắt ngang, vị trí đo số 3. Thứ ba, chúng tôi quy ước vị trí đặt phép đo bắt đầu từ vùng nucellar epidermis và kết thúc ở phần mép vỏ (pericarp) để thực hiện các phép đo hiệu quả, đồng nhất giữa các giống ngô phân tích (**Hình 2**).

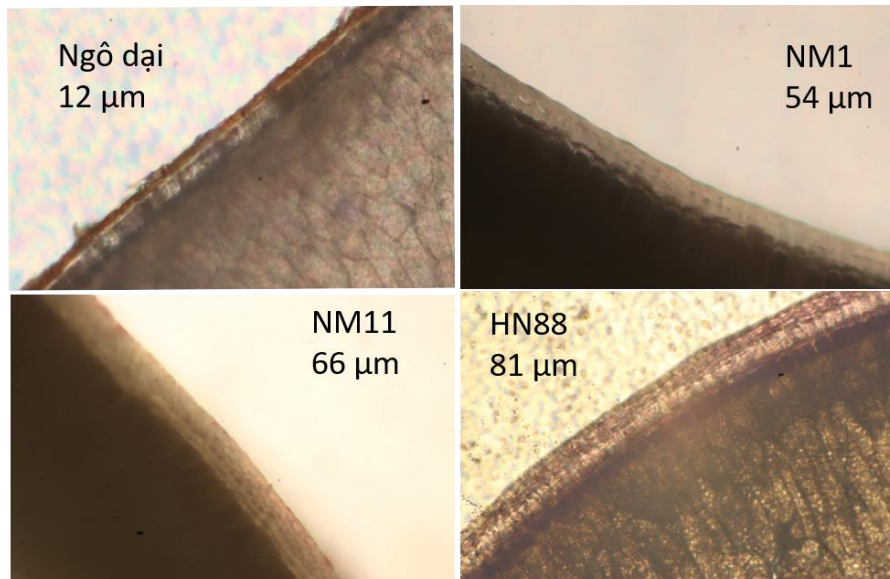
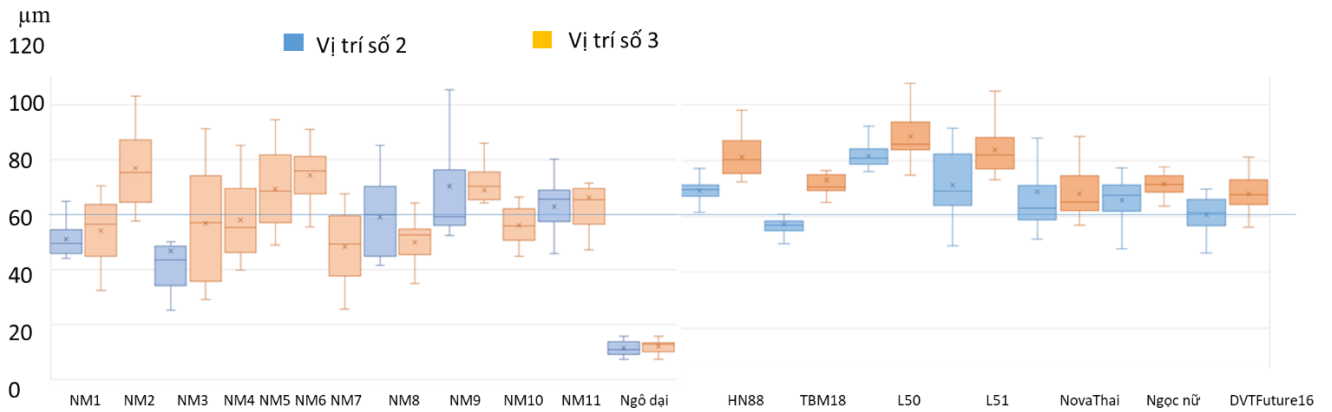


**Hình 2. Vị trí các điểm đo vỏ theo lát cắt và các lớp tế bào vỏ hạt ngô.**

Vị trí 1-8 được minh họa. P: pericarp (vỏ hạt); ne: nucellar epidermis; al: aleurone layer ; se: starchy endosperms (nội nhũ). Vỏ hạt được đo từ mép ngoài của aleurone ra đến hết ngoài cùng.

**Độ dày vỏ hạt của một số giống ngô nghiên cứu:**

Chúng tôi dùng phương pháp đã tối ưu hóa đo vỏ hạt của một số giống ngô. Trong đó các giống ngô NM1 đến NM11 là Ngô ngọt F1 đang thương mại ở Mỹ được biết đến với chất lượng rất tốt, vỏ mỏng; tiếp đó là các giống ngô nếp F1 đang thương mại trong nước như HN88, TBM18, Nova Thái, Ngọc Nữ, ĐVT Future 16; và hai dòng ngô nếp thuần L50 và L51. Kết quả thể hiện trong **Hình 3**.



**Hình 3. Chiều dày vỏ hạt của một số giống ngô.**

Trên: Biểu đồ box-plot thể hiện chiều dày vỏ hạt ngô; X: là giá trị trung bình N = 50 (đo 5 hạt, mỗi hạt cắt 2 lát, đo 5 vị trí trên 1 ảnh). Ngô ngọt (kí hiệu NM 1-11) và ngô đại, còn lại là các giống ngô nếp. Vị trí số 2: ở phía sau lưng hạt mặt đối diện với phôi; vị trí số 3: phía bên hông của hạt (xem



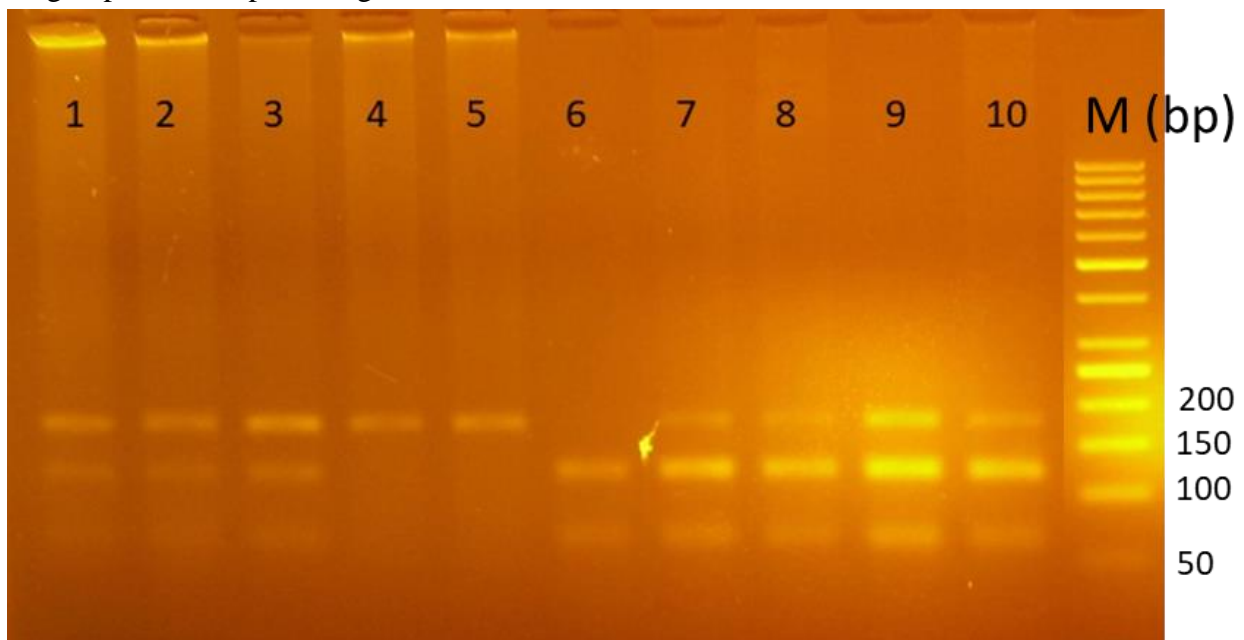
hình 2). Một số giống ngô chỉ đo được ở vị trí số 2 là NM4, NM5, NM6, NM7, NM10. Dưới: Ảnh chụp lát cắt vỏ hạt của một số giống ngô với độ dày vỏ hạt trung bình đo được ( $\mu\text{m}$ ) của chúng.

Có thể nhận thấy hầu hết các giống ngô Ngọt Mỹ (NM) có độ vỏ mỏng hơn ngô nếp thương mại F1 đang bán ở Việt Nam. Đặc biệt dòng ngô NM1, NM3, NM7, NM8, NM10 là những giống ngô vỏ mỏng nhất có độ dày trung bình thấp hơn  $60 \mu\text{m}$ ; trong khi các giống ngô F1 nếp ở Việt Nam hầu hết có độ dày trên  $60 \mu\text{m}$ . Qua đánh giá ăn thử (kết quả chưa công bố) chúng tôi nhận thấy có sự liên hệ khá chặt chẽ giữa độ dày vỏ đo theo phương pháp này và độ dày vỏ cảm nhận qua ăn thử trực tiếp. Kết hợp giữa hai cách sàng lọc này chúng tôi chọn ra được giống NM1 và NM3 làm vật liệu cải tiến vỏ mỏng. Đặc biệt, kết quả cho thấy dòng ngô đại có vỏ rất mỏng trung bình  $12 \mu\text{m}$  cũng là vật liệu tiềm năng để cải tiến tính trạng vỏ mỏng.

#### Chỉ thị phân tử cho đột biến *su1-sv*

Chúng tôi giải trình tự gene *SU1* trong dòng mang allele đột biến ở gene *SUGARY 1* là allele *su1-sv* (nguồn gốc từ ngân hàng maize gdb của Mỹ) và tìm được hai đột biến điểm (Single nucleotide mutation SNP). Đó là đột biến N628K biến đổi mã ACC (Arginine) thành ACG (Lysine) và K662E biến đổi AAA (Lysine) thành GAA (Glutamate).

Chúng tôi thiết kế chỉ thị phân tử dCAPs (derived Cleavage Amplified Polymorphism) để kiểm tra sự có mặt của đột biến K662E (Hình 4). Kết quả cho thấy chỉ thị phân biệt tốt ba dạng kiểu gene đồng hợp lặn, di hợp và dạng đại.

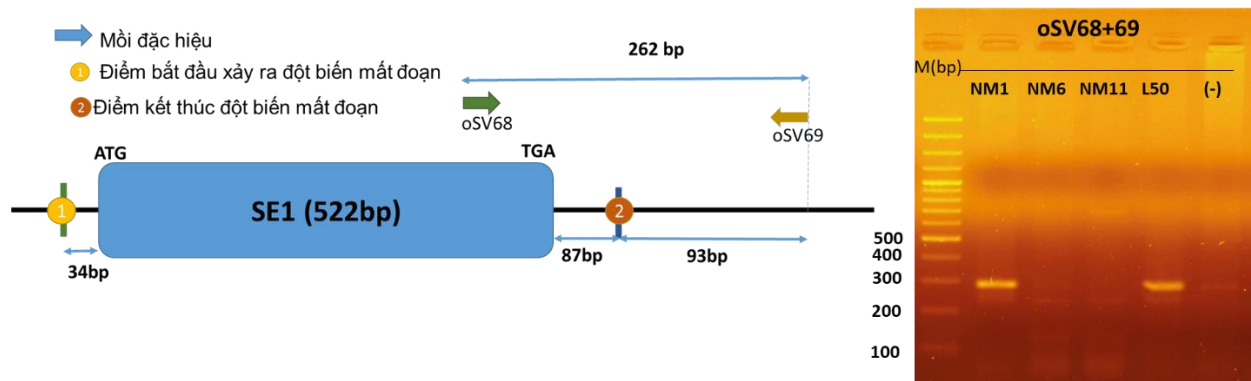


**Hình 4.** Ảnh điện di gene kiểm tra kiểu gene của dòng đang phân li allele *su1-sv* bằng môi dCAPs

Sản phẩm PCR (kích thước 175bp) nhân lên từ allele đột biến sẽ bị cắt bởi enzyme *EcoRI* tạo ra 2 băng với kích thước 60 bp và 115bp, còn dạng đại thì không bị cắt. Cá thể 1,2,3,7,8,9,10 là dị hợp; cá thể 4,5 là dạng đại; cá thể 6 là đồng hợp lặn *su1-sv*.

#### Chỉ thị phân tử cho đột biến *se1*

Căn cứ vào vị trí đột biến mất đoạn trên gen *SE1* đã công bố (Zhang et al., 2019), chúng tôi thiết kế môi để phân biệt giữa allele đột biến (mất đoạn) và allele dạng đại. Cặp môi oSV68 và oSV69 nhân lên đoạn PCR 262bp ở allele dạng đại còn không nhân lên ở allele đột biến (Hình 5). Sàng lọc với cặp môi này với một số mẫu ngô ngọt Mỹ (mà có vỏ mỏng) chúng tôi tìm thấy dòng NM6 và NM11 là đồng hợp về đột biến *se1*. Trong khi đó một dòng ngô nếp L50 và ngọt NM1 là dị hợp hoặc đồng hợp dạng đại cho gene này. Như vậy có thể sử dụng NM11 hoặc NM6 (vỏ mỏng, mang đột biến *se1*) cho lai tạo cải tiến các giống ngô khác.



**Hình 5. Thiết kế môi đặc hiệu kiểm tra sự có mặt của đột biến se1 trong các dòng ngô vật liệu.**

Vị trí mất đoạn của đột biến gene SE1 được thể hiện trên hình (Điểm 1,2). Môi oSV68, oSV69 sẽ nhân lên sản phẩm PCR có kích thước 262bp ở allele dạng dại, và không nhân lên băng ở allele đột biến. NM1, NM6, NM11: các dòng ngô ngọt; L50: dòng ngô nếp; (-) đối chứng âm.

### 3. KẾT LUẬN

Đã tối ưu hóa phương pháp đo vỏ hạt bằng lát cắt mỏng và soi kính hiển vi

Phát hiện được giống ngô NM1, NM3, ngô dại là ba nguồn vật liệu tiềm năng có vỏ mỏng nhất trong các giống đã sàng lọc

Tìm ra hai đột biến ở gene *SUGARY 1* là N628K và K662E; đã thiết kế được chỉ thị phân tử dCAPs đặc hiệu cho đột biến K662E

Thiết kế thành công chỉ thị phân tử cho đột biến *sugar enhancer 1*.

Các kết quả nghiên cứu này làm tiền đề cho việc chọn tạo giống ngô vỏ mỏng và ngọt một cách khách quan và dễ dàng hơn.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Choe, E. and T.R. Rocheford, Genetic and QTL analysis of pericarp thickness and ear architecture traits of Korean waxy corn germplasm. *Euphytica*, 2012. 183(2): p. 243-260.
- García-Lara, S., C. Chuck-Hernandez, and S.O. Serna-Saldivar, Development and structure of the Corn Kernel. *Corn*, 2019: p. 147-163.
- Green, T.W. and L.C. Hannah, Adenosine diphosphate glucose pyrophosphorylase, a rate-limiting step in starch biosynthesis. *Physiologia Plantarum*, 1998. 103(4): p. 574-580.1.
- Hà, T.T.T., et al., Chọn lọc chất liệu có tính trạng vỏ hạt mỏng phục vụ tạo giống ngô nếp ăn tươi chất lượng cao. 2013. *J Sci & Devel Vol*. 11(2): 135-144
- Park, K.J., et al., QTL analysis for eating quality-related traits in an F2: 3 population derived from waxy corn × sweet corn cross. *Breeding science*, 2013. 63(3): p. 325-332.
- Revilla, P., C.M. Anibas, and W.F. Tracy, Sweet Corn Research around the World 2015–2020. *Agronomy*, 2021. 11(3): p. 534.
- Wang, B. and J.L. Brewbaker, Quantitative trait loci affecting pericarp thickness of corn kernels. *Maydica*, 2001. 46: p. 159-165.
- Wanlayaporn, K., et al., QTL mapping of pericarp thickness in immature and mature stages in thai tropical sweet corn (*Zea mays* var. *saccharata*). *Chiang Mai Journal of Science*, 2018. 45: p. 177-187.
- Wolf, M., et al., Measuring thickness of excised mature corn pericarp 1. *Agronomy journal*, 1969. 61(5): p. 777-779.
- Wu, X., et al., QTL mapping and transcriptome analysis identify candidate genes regulating pericarp thickness in sweet corn. *BMC Plant Biology*, 2020. 20(1): p. 1-13.
- Zhang, X., et al., Maize sugary enhancer1 (*se1*) is a gene affecting endosperm starch metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2019. 116(41): p. 20776-20785.

**PHỤ LỤC: CÁC MỒI SỬ DỤNG CHO NGHIÊN CỨU**

<b>STT</b>	<b>Tên mồi</b>	<b>Trình tự</b>	<b>Vị trí</b>
1	oSV88	ACACACTCCACTCGAACGCAC	In1-F
2	oSV89	CTTGGCATAGTTGCAAAACCT	Ex1-R
3	oSV90	CACCCAGGAACTTACATTGGTG	su1_ex4F
4	oSV91	GGCGCAGTTCTCCTGCGCT	su1_in10R
5	oSV92	ATGACCCAATTCTTGGAATGTC	su1_ex10F
6	oSV93	GACCTCCTGCATCCCATG	su1_ex11R
7	oSV94	GTGCTTGATGCTTTTGGGTA	su1_in10F
8	oSV95	GACAGACTTGCAAATTCTCCT	su1_ex14R
9	oSV96	GTGGCAAGTATATACAGATCATCTC	su1_in13F
10	oSV99	CTTTCTCATTACCTTCAGCTG	su1_ex7R
11	oSV100	TCTGGATGTGGTGCCATAAATG	su1_ex6F
12	oSV101	AACTACCGACAACAGAGCAAC	su1_ex6F