

Hợp chất thứ cấp, hàm lượng anthocyanin và nhận diện kiểu gen quy định sắc tố hạt gạo trên các giống lúa nếp màu

Phạm Thị Bé Tư, Nguyễn Lê Đức Huy, Huỳnh Kỳ, Huỳnh Như Điền,
Chung Trương Quốc Khang, Tống Thị Thùy Trang, Phạm Ý Vy, Châu Thanh Nhã, Nguyễn Lộc Hiền*
Trường Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ

Secondary metabolites, anthocyanin content and identification of genotypes regulating rice grain pigmentation in colored sticky rice varieties

Pham Thi Be Tu, Nguyen Le Duc Huy, Huynh Ky, Huynh Nhu Dien,
Chung Truong Quoc Khang, Tong Thi Thuy Trang, Pham Y Vy, Chau Thanh Nha, Nguyen Loc Hien*
College of Agriculture, Can Tho University
Corresponding author: nlhien@ctu.edu.vn

<https://doi.org/10.55250/jo.vnuf.13.4.2024.059-068>

TÓM TẮT

Mục tiêu của nghiên cứu này nhằm khảo sát hàm lượng polyphenol tổng số (bằng phương pháp Folin-Ciocalteu), hàm lượng flavonoid (bằng phương pháp so màu $AlCl_3$) và hàm lượng anthocyanin bằng sử dụng Cyanidin 3-glucosidase của 12 mẫu gạo nếp lứt màu. Bên cạnh đó, nhận diện gen quy định màu sắc hạt gạo bằng chỉ thị phân tử CAPS-Ra và Indel cũng được thực hiện. Kết quả cho thấy giống có vỏ lụa màu tím có hàm lượng anthocyanin, polyphenol và flavonoid tổng số cao hơn ở các giống có vỏ lụa có màu đỏ và trắng. Đặc biệt giống nếp cẩm có hàm lượng cao nhất ở tất cả 3 hợp chất với anthocyanin là $384,9 \pm 3,73$ mg-Cy 3-glc/g, polyphenol tổng số $260,6 \pm 3,57$ mg GAE/100 g và flavonoid tổng số $998,6 \pm 5,9$ mg GAE/100 g. Kết quả ứng dụng chỉ thị CAPS-Ra có thể phân biệt được giống có vỏ lụa màu tím/đen với màu đỏ. Thêm vào đó chỉ thị Indel cho phép nhận diện và phân biệt nhóm vỏ lụa đỏ (142 bp) và đen/trắng (156 bp). Kết quả nghiên cứu này sẽ tiền đề cho công tác chọn tạo giống nếp màu có chứa các hợp chất tự nhiên tốt cho sức khoẻ bằng cách tích hợp các chỉ thị phân tử và các phương pháp sinh lý-hoá với chọn giống truyền thống.

ABSTRACT

The objective of this study is to determine the total polyphenol content (by Folin-Ciocalteu method), flavonoid content (by $AlCl_3$ colorimetric method) and anthocyanin content using Cyanidin 3-glucosidase of 12 sticky color rice samples. In addition, the identification of genes that regulate rice grain color using molecular markers CAPS-Ra and Indel was also performed. The results showed that varieties with purple pericarp had higher total anthocyanin, polyphenol and flavonoid contents than varieties with red and white pericarp color. In particular, Nep Cam variety has the highest content of all 3 compounds with anthocyanin being 384.9 ± 3.73 mg-Cy 3-glc/g, total polyphenols being 260.6 ± 3.57 mg GAE/100 g and total flavonoids 998.6 ± 5.9 mg GAE/100 g. The results of applying the CAPS-Ra marker can distinguish varieties with purple/black pericarps from red ones. In addition, the Indel marker allows for identifying and distinguishing red (142 bp) and black/white (156 bp) silk bark groups. The results of this research will be a premise for the work of selecting sticky rice varieties containing natural compounds that are good for health by integrating molecular markers and physiological-chemical methods with traditional breeding.

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 15/03/2024

Ngày phản biện: 19/04/2024

Ngày quyết định đăng: 17/05/2024

Từ khóa:

Anthocyanin, CAPS-Ra, Indel, lúa nếp màu, polyphenol.

Keywords:

Anthocyanin, CAPS-Ra, Indel, sticky color rice, polyphenol.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Các nghiên cứu gần đây cho thấy hầu hết các giống lúa được trồng và tiêu thụ trên thế giới đa số có vỏ lụa màu trắng, nhưng một số giống lúa cũng có vỏ lụa màu đỏ, màu tím và màu đen. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng việc sử dụng các loại gạo màu làm giảm stress oxy hóa và đồng thời tăng khả năng kháng oxy hóa, giảm nguy cơ phát triển các bệnh mãn tính như bệnh tim mạch, tiểu đường tuýp 2 và một số bệnh ung thư [1, 2]. Khả năng kháng oxy hóa và các loại bệnh có liên quan chủ yếu do các loại hợp chất có trong gạo bao gồm: δ -oryzanols và polyphenol. Một số hợp chất đã được xác định trong loại ngũ cốc này, chủ yếu là phenolic acid và anthocyanins [1, 3-7]. Sắc tố màu đỏ trong hạt gạo là proanthocyanidin, còn được gọi là tannin [6, 8]. Cyanidin-3-glucoside và peonidin-3-glucoside là hai sắc tố chính lắng đọng trong lớp vỏ lụa hạt gạo đen [9, 10]. Chiết xuất từ hạt gạo sắc tố và cám đã được chứng minh là có hiệu quả ức chế hoạt động enzyme α -amylase nội sinh và enzyme α -glucosidase, do đó ức chế sự chuyển đổi tinh bột thành glucose trong ruột non [11, 12].

Phân tích di truyền chỉ ra rằng hai locus, *Pb* (*Prp-b*) và *Pp* (*Prp-a*), nằm trên nhiễm sắc thể (NST) 4 và 1 quy định cho sắc tố vỏ lụa với anthocyanins của gạo tím. Hạt gạo có màu nâu với sự hiện diện của gen *Pb* nhưng không có gen *Pp*. Bên cạnh đó, màu sắc vỏ lụa của hạt gạo đã được chứng minh do các gen *Ra*, *Rc* và *Rd* điều khiển. Gen *Ra* nằm trên NST số 4 và mất đoạn 2 bp (GT) ở exon thứ 7, xác định có yếu tố phiên mã (TFs) bHLH đóng vai trò quan trọng trong quá trình hình thành vỏ lụa màu tím [13]. Các gen *Kala1*, *Kala3* và *Kala4* được báo cáo là có liên quan đến vỏ lụa màu đen trong một dòng gần isogenic có nguồn gốc từ giống lúa đen Hongxienuo và Koshihikari. Nghiên cứu sâu hơn của T. Oikawa và cộng sự

(2015) [14] báo cáo rằng *Kala4/OsB2* được mã hóa một TF bHLH và việc chèn một đoạn lớn vào vùng điều khiển (promoter) làm tăng rõ rệt mức độ biểu hiện của gen *Kala4/OsB2*, *Rc* và *Rd* đã được đề xuất là các gen chịu trách nhiệm hình thành vỏ lụa màu đỏ. Các alen chức năng của *Rc* và *Rd* cùng nhau tạo ra vỏ lụa đỏ, trong khi alen chức năng của riêng *Rc* tạo ra vỏ lụa màu nâu [15]. Bên cạnh đó, nghiên cứu của [16] cho rằng màu sắc vỏ cám gạo (đỏ, nâu, tím đen) là do 3 cặp gen nằm trên NST số 1 (*Kala1*), NST3 (*Kala3*) và NST4 (*Kala4*) quy định. Các gen này có tương tác với nhau và quyết định màu sắc hạt gạo. Giống lúa có mặt của 3 gen *Kala1*, *Kala3* và *Kala4* gạo có màu đen, có 2 gen *Kala3* và *Kala4* (thiếu *Kala1*) gạo có màu đỏ, có 2 gen *Kala1* và *Kala4* (thiếu *Kala3*) gạo có màu nâu, chỉ có *Kala4* gạo màu nâu nhạt, có một trong 2 kiểu gen *Kala1/Kala3* hoặc cả 2 và thiếu *Kala4* gạo màu trắng. Ở Việt Nam, gạo dực liệu, gạo thực phẩm chức năng hiện đang được nhiều người quan tâm do sự thay đổi mạnh mẽ của nền kinh tế và nhu cầu chăm sóc sức khỏe. Dù là một trong những nước sản xuất và xuất khẩu gạo quan trọng trên toàn thế giới, nhưng rất ít nhà khoa học Việt Nam nghiên cứu chọn giống theo định hướng gạo thực phẩm chức năng, gạo dực liệu so với các lĩnh vực chọn giống khác do áp lực lớn đối với các nghiên cứu về năng suất cao vẫn là ưu tiên.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Bộ giống lúa nếp thí nghiệm có 12 giống bao gồm 10 giống lúa-nếp màu (vỏ lụa có màu sắc khác nhau) và 2 giống RVT và Jasmine 85 là 2 giống có vỏ lụa màu trắng được nhận từ Ngân hàng gen của Trường Đại học Cần Thơ. Danh sách 12 giống lúa nếp màu được trình bày ở Bảng 1.

Bảng 1. Danh sách 12 giống lúa nếp màu được sử dụng trong nghiên cứu

TT	Tên giống	Màu sắc vỏ lụa	TT	Tên giống	Màu sắc vỏ lụa
1	Blầu sáng	Tím	7	Nếp tím thơm	Tím
2	Nếp cẩm	Tím	8	HNOE	Đỏ
3	Pèò du dây	Tím	9	Ngọc đỏ hương dứa	Đỏ
4	Nhỏ đỏ	Đỏ	10	Lúa tím hạt tròn	Tím
5	Mắc cu 1	Đỏ	11	RVT	Trắng
6	Lứt tím 10	Tím	12	Jasmine 85	Trắng



Hình 1. Màu sắc vỏ lụa của các giống lúa nếp màu thí nghiệm

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Xác định hàm lượng anthocyanin tổng số

Hàm lượng anthocyanin được xác định dựa trên phương pháp của A. Ghasemzadeh và cộng sự (2018) [17], và có hiệu chỉnh. Mẫu bột của 12 giống gạo lứt màu được chiết xuất bằng cách cân 50 mg với 5 mL methanol chứa 1% HCL (99:1), ổn định qua đêm ở nhiệt độ 4°C. Hỗn hợp được ly tâm và phần dung dịch nổi trên mặt được thu thập và dùng đo hàm lượng anthocyanin. Giá trị độ hấp thụ được đo tại 2 bước sóng 530 nm và 657 nm (UV-2120 Optizen, Mecays, Korea). Hàm lượng anthocyanin được tính theo công thức:

$TAC = OD_{530nm} - (0,25 \times OD_{657 nm}) \times \text{thể tích chiết xuất (mL)} \times 1/\text{khối lượng mẫu (g)}$.

Cyanidin 3-glucoside được sử dụng như chất đối chứng dương trong xây dựng phương trình đường chuẩn và methanol làm đối chứng âm. Hàm lượng anthocyanin được tính toán dựa trên đường chuẩn và được biểu thị bằng mg cyanidin 3-glucoside (Cy3-GE)/100 g trọng lượng bột.

2.2.2. Xác định hàm lượng polyphenol tổng số

Định lượng polyphenol tổng số (TPC) bằng

thuốc thử Folin-Ciocalteu theo quy trình được mô tả bởi P. J. Cáceres và cộng sự (2014) [18] có hiệu chỉnh. Mẫu bột (90 mg) được chiết xuất với 1,8 mL methanol 80% trong 24 giờ ở nhiệt độ phòng. Hỗn hợp được ly tâm 5.000 vòng/phút trong 5 phút ở 4°C và dịch chiết được sử dụng để phân tích. Rút 20 µL dịch chiết cho vào đĩa 96 giếng với 5 lần lặp lại/mẫu, thêm 50 µL thuốc thử Folin-Ciocalteu 10%, tiếp tục thêm 50 µL nước cất và 80 µL Na₂CO₃ trộn đều và ủ 30 phút ở nhiệt độ phòng. Độ hấp thụ được đo ở bước sóng 765 nm bằng máy đo quang phổ. Gallic acid được sử dụng như chất đối chứng dương trong xây dựng phương trình đường chuẩn và methanol làm đối chứng âm. Hàm lượng polyphenol được tính toán dựa trên đường chuẩn và được biểu thị bằng mg Gallic acid tương đương (mg GAE)/100 g trọng lượng bột.

2.2.3. Xác định hàm lượng flavonoid tổng số

Hàm lượng flavonoid tổng số trong mỗi dịch chiết pha loãng được xác định bằng phương pháp so màu AlCl₃ được mô tả bởi [19]. Sử dụng 100 µL mẫu đã được chiết xuất bằng mL 80% Methanol-HCl (1000:1). Bơm vào

từng giếng trên đĩa 96 giếng với 5 lần lặp lại, thêm 100 μ L dung dịch $AlCl_3$ 2% trong methanol. Hỗn hợp phản ứng được ủ 15 phút ở nhiệt độ phòng. Độ hấp thụ được đo ở bước sóng 430 nm. Gallic Acid được sử dụng như chất đối chứng dương xây dựng phương trình đường chuẩn và methanol làm đối chứng âm. Hàm lượng flavonoid được tính toán dựa trên phương trình đường chuẩn và được biểu thị bằng mg Galic acid tương đương (mg GAE)/100 g trọng lượng bột.

2.2.4. Nhận diện kiểu gen quy định tính trạng màu sắc hạt gạo

Phương pháp ly trích DNA:

DNA của 12 mẫu giống lúa nếp màu được trích theo phương pháp CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) theo phương pháp [20] có cải tiến để phù hợp cho tách chiết DNA tổng số của các mẫu lúa. Mẫu lá lúa non được thu sau khi gieo 7-10 ngày, sau khi thu tiến hành ly trích ngay. Quy trình ly trích DNA được thực hiện như sau:

Cân khoảng 100 mg mẫu lá cho vào tube 2 mL có sẵn một viên bi, ngâm trong Nitơ lỏng và nghiền mẫu bằng máy lắc. Cho CTAB 2X đã ủ ở 65°C lên vạch 1 mL, thêm vào mỗi tube 10 μ L β -mercaptoethanol. Tiến hành ủ ở nhiệt độ 65°C trong 30 phút, 5 phút lắc đều mẫu 1 lần. Sau khi ủ cho thêm vào mỗi tube 500 μ L chloroform, lắc đều và đem ly tâm 13000/phút vòng trong 5 phút. Rút 750 μ L phần dung dịch bên trên cho vào tube mới, thêm 650 μ L chloroform, trộn đều và đem ly tâm 13000/phút vòng trong 5 phút. Rút 500 μ L lớp dung dịch bên trên và cho vào tube mới và thêm 500 μ L chloroform vào mỗi tube, ly tâm 13000/phút vòng trong 5 phút. Rút 400 μ L lớp dung dịch bên trên cho vào tube mới, thêm

400 μ L Iso-propanol (tỷ lệ 1:1) lắc đều. Đem mẫu đi ly tâm 13000/phút vòng trong 5-10 phút, tiến hành đổ bỏ cẩn thận phần dung dịch bên trên, giữ lại phần kết tủa lắng tụ bên dưới. Thêm 500 μ L ethanol 70% vào mỗi tube và ly tâm 13000 vòng/phút trong 5-10 phút để rửa sạch mẫu, đổ bỏ phần còn và giữ lại kết tủa. Thêm tiếp 500 μ L ethanol 70% vào mỗi tube để rửa sạch mẫu lần hai và ly tâm 13000 vòng/phút trong 5-10 phút. Lướt bỏ phần còn và giữ kết tủa lại. Dùng micropipet hút sạch phần còn sót lại trong mỗi tube và đem mẫu đi phơi khô. Khi mẫu khô thêm vào mỗi tube 30 μ L TE (pH = 8.0) để hòa tan DNA và trữ lạnh ở nhiệt độ -20°C.

Phương pháp xét nghiệm PCR:

Phản ứng PCR của 12 mẫu gạo nếp lứt màu được thực hiện để nhận diện gen quy màu sắc hạt gạo. Khi đã ly trích DNA, tiến hành phân tích PCR mẫu với các thành phần cho 1 phản ứng như sau: PCR được thực hiện với thể tích 20 μ L chứa khoảng 50 ng DNA mẫu phân tích, bộ đệm 1 \times PCR, 400 nmol/L mỗi mồi, 200 μ mol/L mỗi dNTP, 2 mmol/L Enzyme $MgCl_2$ và 1U Taq. Đối với các điểm đánh dấu InDel và điểm đánh dấu CAPSRa, phản ứng được thực hiện như sau: biến tính ở 94°C trong 5 phút, ở 37 chu kỳ tiếp theo được thực hiện ở 94°C trong 45 giây giai đoạn tách sợi đôi thành sợi đơn, giai đoạn kế tiếp là thời gian gắn mồi ở 55°C trong 45 giây, kế tiếp là giai đoạn kéo dài chuỗi ở 72°C trong 90 giây. Sau đó ở nhiệt độ 72°C trong 10 phút là nhiệt độ ổn định sản phẩm PCR. Cặp mồi CAPS-Ra, sản phẩm PCR được phân hủy bằng enzyme giới hạn tương ứng theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sản phẩm PCR của chỉ thị SSR và chỉ thị InDel được chạy trên gel polyacrylamide 8%.

Bảng 2. Danh sách các cặp mồi sử dụng trong nghiên cứu

TT	Tên mồi	NST	Trình tự mồi	Tài liệu tham khảo
1	CAPSRa F	4	CGTCCATTACAGGGTA	[13]
2	CAPSRa R		CAGCAGATGAGGCAAAC	
3	Indel-Rc F	4	CAGGCACCACACAGAGAATG	[21]
4	Indel-Rc R		GGTTGGCACTGAAATCACCT	

Phương pháp chạy điện di:

Sản phẩm PCR được điện di với gel polyacrylamide 8%. Lắp khuôn điện di, sau đó đổ gel vào khuôn và chờ gel đặc lại khoảng 30-40 phút. Sau khi gel đặc, tiến hành tháo lược, đặt gel vào khay điện di, trong khay chứa dung dịch đệm TAE 0,5X sau cho vừa ngập miệng giếng. Chuẩn bị mẫu PCR, loading dye, thang chuẩn (1 kb plus), micropipet. Bơm 2 μ L thang chuẩn vào giếng đầu tiên, rồi bơm 5 μ L dung dịch (gồm 1 μ L và 4 μ L sản phẩm PCR, trộn đều) lần lượt vào giếng theo thứ tự. Sau khi bơm xong đây nắp điện di và bắt đầu tiến hành điện di với dòng điện 24V trong vòng 35 phút. Sau khi hoàn thành quá trình điện di, gel

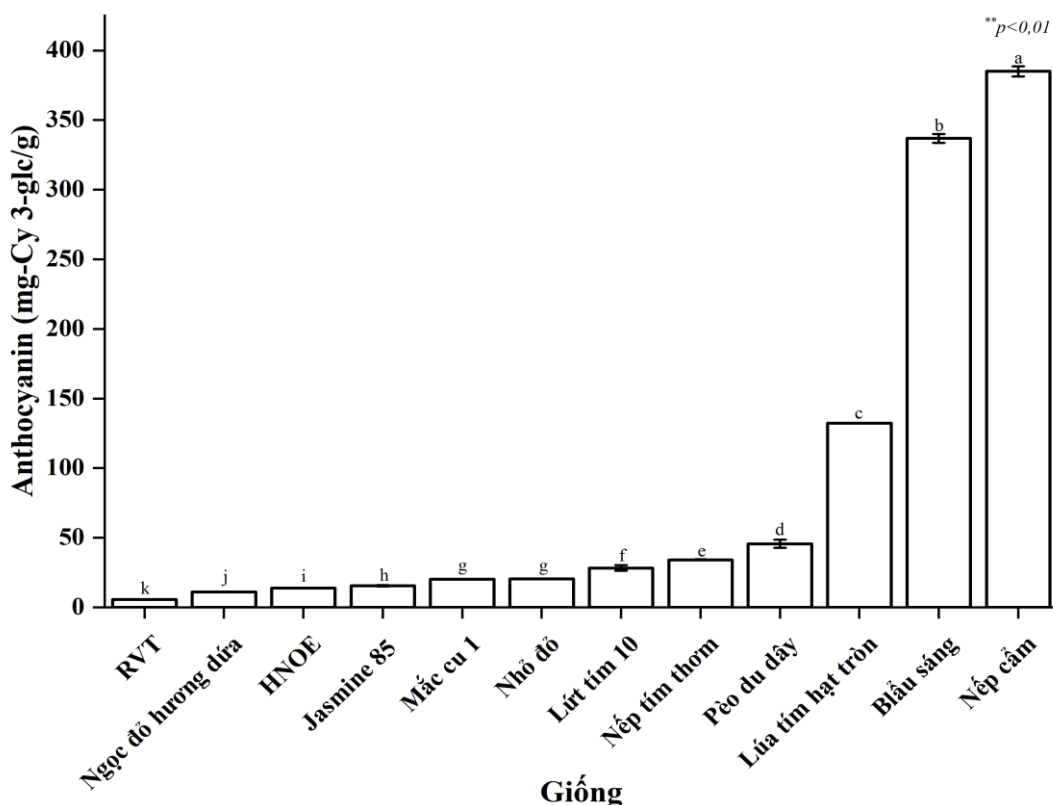
được lấy ra và nhuộm trong Ethidium bromide (10 mg/lít) trong thời gian 10 phút. Kế tiếp, gel rửa trong nước cất trong 5 phút và được chụp với máy đọc gel bằng tia UV. Sự hiện diện của các locus được khuếch đại trên gel polyacrylamide sẽ cho thấy được sự đa hình và đơn hình của các mẫu giống phân tích.

2.2.5. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu được nhập và lưu trữ bằng chương trình Microsoft Office Excel 2013. Phân tích và thống kê số liệu (ANOVA, DUCAN) bằng phần mềm STAR (IRRI, 2013).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Hàm lượng anthocyanin tổng số



Hình 2. Hàm lượng anthocyanin tổng số của 10 giống lúa nếp màu và đối chứng

(Trong cùng đánh giá về số bông/bụi, các trung bình có cùng ký tự a,b,c... theo sau thì không khác biệt giữa các giống/dòng lúa theo kiểm định Tukey HSD ($p > 0,05$))

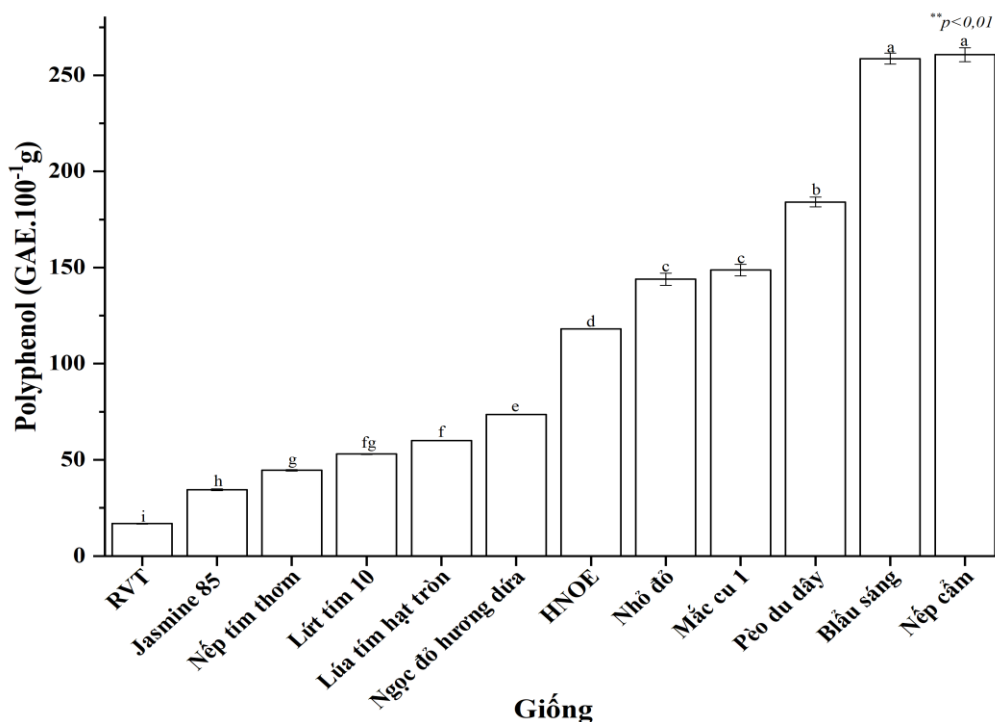
Hàm lượng anthocyanin tổng số của 10 giống lúa nếp màu và 2 giống đối chứng được thể hiện ở Hình 2. Kết quả ghi nhận hàm lượng anthocyanin dao động từ $5,73 \pm 0,24$ mg-Cy 3-glc/g đến $384,9 \pm 3,73$ mg-Cy 3-glc/g, đồng

thời hàm lượng anthocyanin tổng số thay đổi theo màu sắc của gạo lứt, các giống lúa nếp có gạo lứt màu trắng có hàm lượng anthocyanin thấp hơn các giống lúa nếp có gạo lứt màu đỏ và màu tím. Giống lúa nếp có hàm lượng

anthocyanin cao nhất là giống nếp cẩm 384,9 ± 3,73 mg-Cy 3-glc/g, kế đến là giống blầu sáng (336,7 mg ± 3,23 Cy 3-glc/g), lúa tím hạt tròn (132,3 ± 0,29 mg Cy 3-glc/g). Giống lúa có hàm lượng anthocyanin tổng số thấp nhất là giống RVT và Jasmine 85 với hàm lượng anthocyanin tổng số lần lượt là 5,73 ± 0,24 mg-Cy 3-glc/g. Kết quả nghiên cứu này cũng tương tự như các nghiên cứu trước đây của [22] cho thấy hàm lượng anthocyanin hiện diện nhiều nhất trên hạt gạo lứt màu tím, màu đỏ và màu trắng. Anthocyanins (TAC) là sắc tố phổ biến trong gạo đen và gạo đỏ. Ngoài ra, các thành phần có lợi cho sức khỏe của gạo thông thường, bao gồm sterol, g-oryzanol, tocopherols, tocotrienol và các hợp chất phenolic, cũng có thể được tìm thấy trong cám gạo màu [23]. Các phenolic acid chính trong gạo bao gồm ferulic acid, p-coumaric acid và diferulate, đặc biệt tồn tại ở lớp ngoài của ngũ cốc như vỏ lụa và nội nhũ. Cả hai dạng, dạng liên kết và dạng tự do, của phenol đều có thể được tìm thấy trong cám gạo.

3.2. Hàm lượng polyphenol tổng số

Hàm lượng polyphenol tổng số của 12 mẫu bột gạo nếp lứt được trình bày theo Hình 3. Kết quả cho thấy hàm lượng polyphenol của 12 mẫu bột dao động từ 16,8 ± 0,26 đến 260,6 ± 3,57 mg GAE/100g và khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 1%. Trong đó, có 6 giống/dòng lúa nếp có hàm lượng polyphenol lớn hơn 100 mg GAE/100 g bao gồm: nếp cẩm, blầu sáng, pèo du đây, nhỏ đỏ, mắc cu 1 và HNOE với hàm lượng polyphenol tổng số lần lượt là 260,6 ± 3,57, 258,6 ± 2,81, 184,5 ± 2,52, 143,9 ± 3,15, 148,6 ± 2,97 và 118,1 ± 3,57 mg GAE/100 g. Các giống lúa nếp còn lại có hàm lượng polyphenol tổng số nhỏ hơn 100 mg GAE/100 g. Nghiên cứu này chỉ ra rằng gạo lứt màu có hàm lượng polyphenol cao hơn so với gạo lứt trắng. Kết quả của nghiên cứu này tương tự với các nghiên cứu trước đây của [24] rằng gạo trắng có các hợp chất phenolic và các hoạt động chống oxy hóa thấp nhất khi so sánh với gạo có sắc tố (gạo màu).

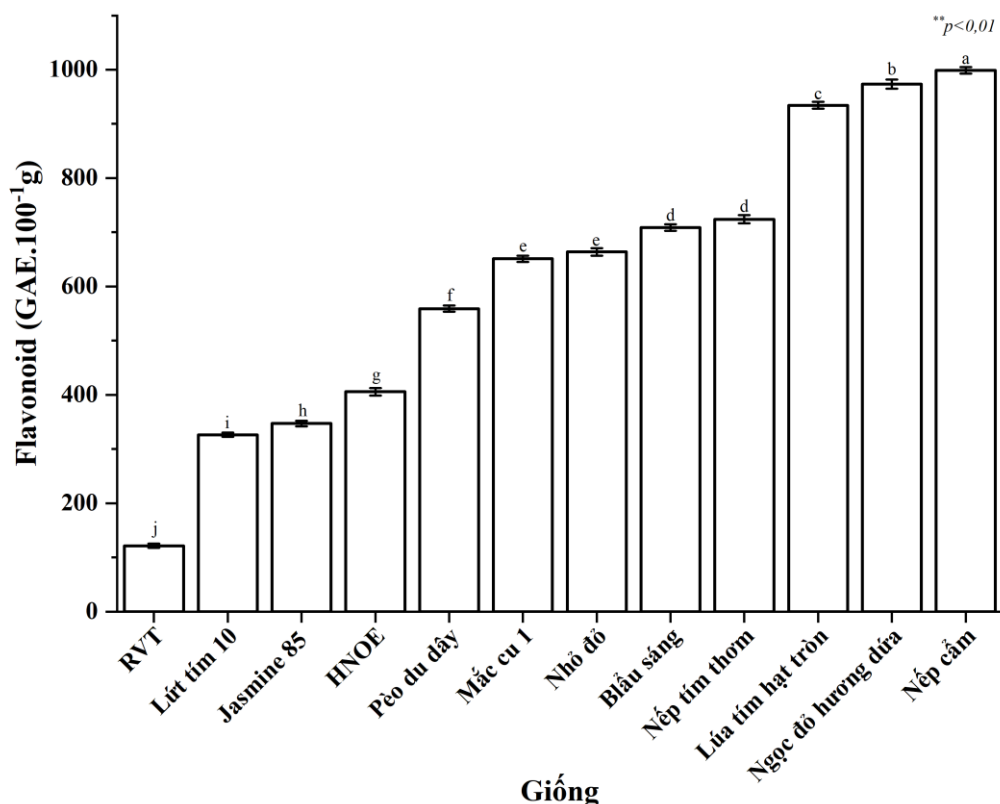


Hình 3. Hàm lượng polyphenol tổng số của 10 giống lúa nếp màu và đối chứng
(Trong cùng đánh giá về số bông/bụi, các trung bình có cùng ký tự a,b,c... theo sau thì không khác biệt giữa các giống/dòng lúa theo kiểm định Tukey HSD ($p > 0,05$))

3.3. Hàm lượng flavonoid tổng số

Tương tự như hàm lượng polyphenol tổng số, hàm lượng flavonoid tồn tại trong tự nhiên cũng có tác dụng hiệu quả đến khả năng kháng oxy hóa. Kết quả đánh giá hàm lượng flavonoid tổng số của 12 giống lúa được thể hiện ở Hình 4. Kết quả cho thấy hàm lượng flavonoid của các giống lúa dao động từ 121,6±3,85 đến 998,6±5,90 mg GAE/100 g và khác biệt có ý nghĩa ở mức 1%. Nhóm có hàm lượng flavonoid thấp nhất bao gồm 2 giống: RVT (121,6±3,85. Mg GAE/100 g) và Jasmine 85 (347 ± 5,15 mg GAE/100 g). Giống lúa có

hàm lượng flavonoid cao nhất là giống Nếp Cẩm (998,6±5,9 mg GAE/100 g), kế đến là giống ngọc đỏ hương dứa (973,2 ± 8,3 mg GAE/100 g), lúa tím hạt tròn (934,2 ± 6,5 mg GAE/100 g). Nghiên cứu của Shen [24], khi so sánh hàm lượng flavonoid tổng số của gạo trắng, đỏ và đen, hàm lượng flavonoid trung bình trong gạo trắng thấp hơn so với gạo đỏ và đen. Kết quả của nghiên cứu này cũng tương tự với các nghiên cứu trước đây, giống gạo có sắc tố càng đậm thì hàm lượng flavonoid càng cao.



Hình 4. Hàm lượng flavonoid tổng số của 10 giống lúa nếp màu và đối chứng

(Trong cùng đánh giá về số bông/bụi, các trung bình có cùng ký tự a,b,c...

theo sau thì không khác biệt giữa các giống/dòng lúa theo kiểm định Tukey HSD ($p>0,05$))

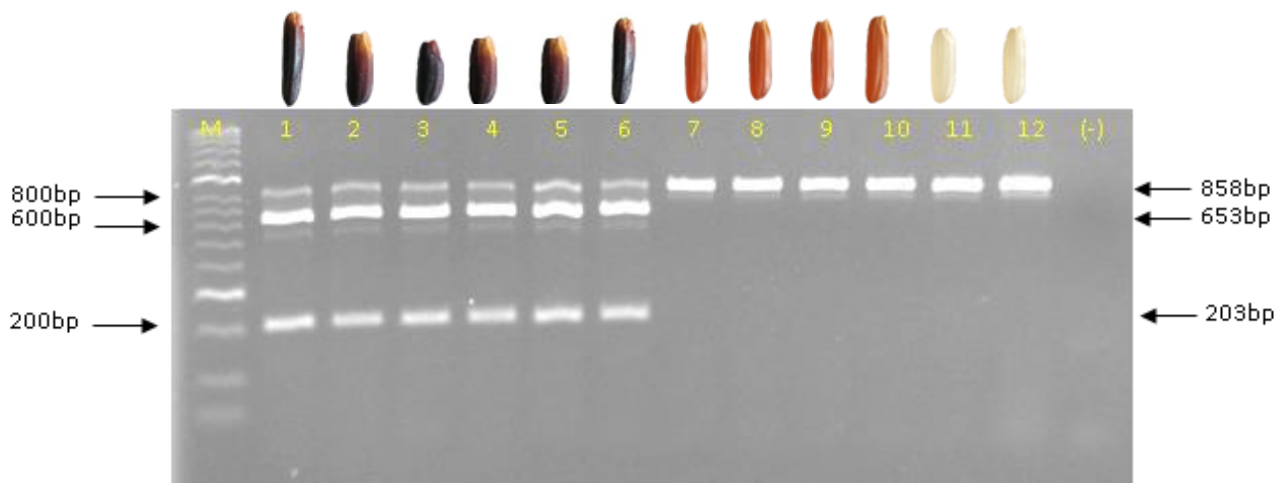
3.4. Nhận diện kiểu gen quy định sắc tố hạt gạo lứt

Màu sắc vỏ lụa của hạt gạo đã được chứng minh do các gen *Ra*, *Rc* và *Rd* điều khiển. *Ra* là một gen *bHLH* nằm trên nhiễm sắc thể số 4 và mất đoạn 2 bp (GT) ở exon thứ 7 được liên kết với kiểu hình vỏ lụa màu tím. Nghiên cứu của

C. Wang và cộng sự (2007) [13] cho thấy dấu chỉ thị phân tử CAPS (Primer *CAPS-Ra*) được sử dụng để nhận diện màu sắc vỏ lụa tím trên hạt gạo. Dấu chỉ thị phân tử CAPS nằm trên exon 7 của gen *Ra*, mỗi *CAPS-Ra* và *indel GT* được thiết kế để xác nhận có tương quan như thế nào đến màu sắc của vỏ lụa. Trong nghiên

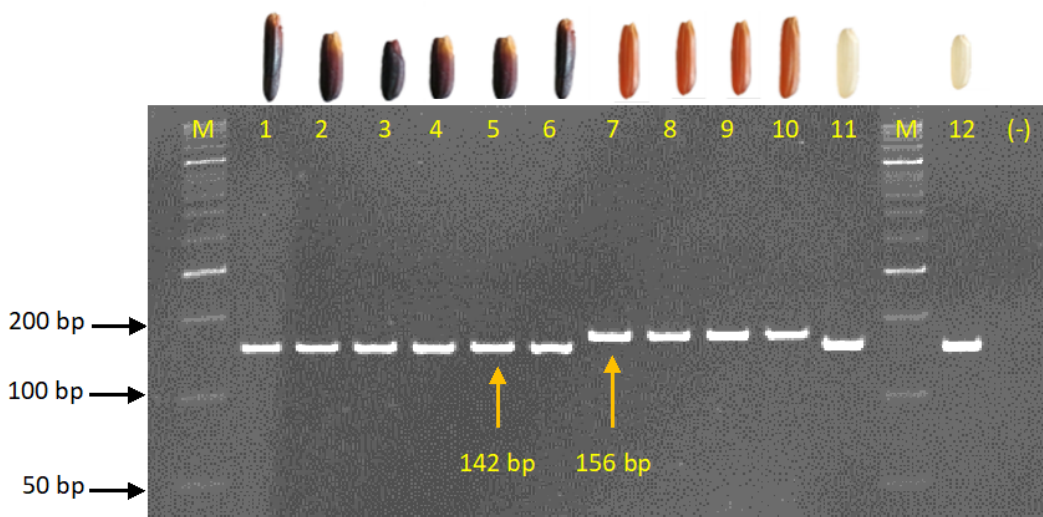
cứu này, mồi *CAPS-Ra* cũng được sử dụng để nhận diện gen quy định sắc tố màu tím (anthocyanin) trên vỏ lụa của hạt gạo. Kết quả sản phẩm PCR của tất cả các mẫu đều xuất hiện band hình tại vị trí 858 bp (vỏ lụa tím, đỏ và trắng), tuy nhiên sử dụng enzyme cắt giới hạn (*Bam*HI), mẫu giống nào có vỏ lụa màu tím xuất hiện band hình tại vị trí 653 và 203

bp. Kết quả ghi nhận có 6 giống có vỏ lụa tím/đen là Bảu sáng, nếp cẩm, pèo du dây, lứt tím 10, lúa tím hạt tròn và nếp tím thơm cho kích thước band hình tại vị trí 203 và 653 bp, còn lại 6 giống/dòng lúa nếp cho kích thước band hình tại vị trí 858 bp, là vỏ lụa trắng/đỏ (HNOE, ngọc đỏ hương dứa, nhỏ đỏ, mắc cu 1, Jasmine 85 và RVT).



Hình 5. Kết quả PCR của các giống lúa nếp màu và đối chứng sử dụng CAPS-Ra trên gel polyacrylamide 8%

(M: ladder 50 bp; 1: Bảu sáng, 2: Nếp cẩm, 3: Pèo du dây, 4: Lứt tím 10, 5: Lúa tím hạt tròn, 6: Nếp tím thơm, 7: HNOE, 8: Ngọc đỏ hương dứa, 9: Nhỏ đỏ, 10: Mắc cu 1, 11: Jasmine 85, 12: RVT, (-): đối chứng âm v/w: 80 w)



Hình 6. Kết quả PCR của các giống lúa nếp màu và đối chứng sử dụng Indel-Rc trên gel polyacrylamide 8%

(M: ladder 50 bp; 1: Bảu sáng, 2: Nếp cẩm, 3: Pèo du dây, 4: Lứt tím 10, 5: Lúa tím hạt tròn, 6: Nếp tím thơm, 7: HNOE, 8: Ngọc đỏ hương dứa, 9: Nhỏ đỏ, 10: Mắc cu 1, 11: Jasmine 85, 12: RVT, (-): đối chứng âm v/w: 80 w)

Các sắc tố có trong hạt gạo màu liên quan đến việc tích lũy anthocyanin và proanthocyanin, đây là các chất chuyển hóa thứ cấp thuộc nhóm flavonoid có nguồn gốc từ quá trình tổng hợp phenylpropanoid. Con đường sinh tổng hợp các thành phần được thể hiện rõ ràng về mặt di truyền học và hóa sinh [25, 26]. Trong đó gen quy định liên quan đến tổng hợp anthocyanin ở gạo được xác định là Rc, mã hóa cho bHLH DNA liên kết với protein. Đột biến ở gene Rc được phát hiện trên các giống gạo có vỏ lụa trắng, cho thấy khi đột biến sẽ dẫn đến vỏ lụa gạo sẽ có màu đỏ [8, 27]. Dựa trên những nhận định trên, theo [21] sử dụng mồi *Indel-Rc* giúp xác định được màu sắc vỏ lụa đỏ với chiều dài sản phẩm PCR là 156 bp sẽ nhận diện màu sắc vỏ lụa đỏ ở gạo còn 142 bp sẽ nhận diện được các mẫu gạo có vỏ lụa đen/trắng. Trong nghiên cứu này, kết quả ghi nhận có 8 giống/dòng lúa nếp có kích thước band hình 142 bp thể hiện là giống có vỏ lụa màu đen/trắng bao gồm blẩu sáng, nếp cẩm, pèo du đây, lứt tím 10, lúa tím hạt tròn, nếp tím thơm, Jasmine85 và RVT. Bốn giống/dòng lúa nếp còn lại cho kích thước band hình tại vị trí 156 bp là những giống/dòng có vỏ lụa màu đỏ (HNOE, ngọc đỏ hương dứa, nhỏ đỏ và mắc cu 1). Kết quả này cũng tương tự với các nghiên cứu trước đó.

4. KẾT LUẬN

Qua kết quả đánh giá hàm lượng anthocyanin, polyphenol, flavonoid, và nhận diện kiểu gen quy định màu sắc vỏ lụa của 12 giống/dòng lúa nếp có vỏ lụa màu trắng, màu đỏ và màu đen, nhận thấy rằng: Hàm lượng polyphenol cao nhất ở nhóm giống lúa có vỏ lụa màu tím, kể đến là màu đỏ và màu trắng. Giống nếp cẩm, blẩu sáng, pèo du đây, nhỏ đỏ, mắc cu 1 và HNOE với hàm lượng polyphenol tổng số lần lượt là $260,6 \pm 3,57$, $258,6 \pm 2,81$, $184,5 \pm 2,52$, $143,9 \pm 3,15$, $148,6 \pm 2,97$ và $118,1 \pm 3,57$ mg GAE/100 g. Hàm lượng Flavonoid cũng thể hiện cao hơn ở nhóm gạo có vỏ lụa màu tím như nếp cẩm

($998,6 \pm 5,9$ mg GAE/100 g), kể đến là giống ngọc đỏ hương dứa ($973,2 \pm 8,3$ mg GAE/100 g), lúa tím hạt tròn ($934,2 \pm 6,5$ mg GAE/100 g) so với giống lúa có vỏ lụa màu trắng. Hàm lượng anthocyanin thể hiện cao nhất trên nhóm giống lúa có vỏ lụa màu tím, kể đến là màu đỏ và cao hơn màu trắng. Các giống lúa có hàm lượng anthocyanin cao bao gồm: nếp cẩm $384,9 \pm 3,73$ mg-Cy 3-glc/g, kể đến là giống blẩu sáng ($336,7$ mg $\pm 3,23$ Cy 3-glc/g), lúa tím hạt tròn ($132,3 \pm 0,29$ mg Cy 3-glc/g). Đối với chỉ thị CAPS-Ra, kết quả đã phân biệt được nhóm giống/dòng có vỏ lụa màu tím/đen (tại vị trí 203 và 635 bp) và vỏ lụa có màu đỏ (tại vị trí 858 bp). Trong khi đó, chỉ thị Indel cho phép nhận diện và phân biệt nhóm vỏ lụa đỏ (142 bp) và đen/trắng (156 bp).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. A. Francavilla & I.J. Joye (2020). Anthocyanins in whole grain cereals and their potential effect on health. *Nutrients*. 12(10): 2922.
- [2]. C. Garcia & C.N. Blesso (2021). Antioxidant properties of anthocyanins and their mechanism of action in atherosclerosis. *Free Radic Biol and Med*. 172: 152-66.
- [3]. R.M. Bulatao, J.P.A. Samin, R.C. Huliganga, R.P. Tubera, M.A.M. Feliciano & C.V. Ortinero (2020). Phytochemical properties, antioxidant activities, and cytotoxicity of ethanolic bran extracts from Philippine pigmented rice cultivars. *Phillip Agric Scientist*. 103(4): 10.
- [4]. N. Kumar & N. Goel (2019). Phenolic acids: natural versatile molecules with promising therapeutic applications. *Biotechnol Rep (Amst)*. 24: e00370.
- [5]. S.I. Chung & M.Y. Kang (2021). Oral administration of germinated, pigmented, giant embryo rice (*Oryza sativa* L. cv. Keunnunjami) extract improves the lipid and glucose metabolisms in high-fat diet-fed mice. *Oxid Med Cell Longev*. 1-9.
- [6]. S.H. Joo, C. Hahn, H.K. Lim, K.D. Yoon, S.H. Yoon & C.U. Lee (2019). An exploration of the *Oryza sativa* L. Cyanidin-3-glucoside on the cognitive function in older adults with subjective memory impairment. *Psychiatry Investig*. 16(10): 759-65.
- [7]. A. Mazumdar, G.A. Aswin & D. Bhatt (2022). Utilization of black rice and red rice in value added products: A review. *Proteins*. 8: 0-3.
- [8]. M. T. Sweeney, M. J. Thomson, B. E. Pfeil & S. McCouch (2006). Caught red-handed: Rc encodes a basic helix-loop-helix protein conditioning red pericarp

in rice. *The Plant Cell*. 18(2): 283-294.

[9]. V.C. Ito & L.G. Lacerda (2019). Black rice (*Oryza Sativa* L.): A review of its historical aspects, chemical composition, nutritional and functional properties, and applications and processing technologies. *Food Chemistry*. 301.

[10]. F. Zhu, Y.Z. Cai, J. Bao & H. Corke (2010). Effect of γ -irradiation on phenolic compounds in rice grain. *Food chemistry*. 120(1): 74-77.

[11]. S. M. Boue, K. W. Daigle, M.H. Chen, H. Cao & M. L. Heiman (2016). Antidiabetic potential of purple and red rice (*Oryza sativa* L.) bran extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 64(26): 5345-5353.

[12]. S. Y. Chiou, J. Y. Lai, J. A. Liao, J. M. Sung & S. D. Lin (2018). In vitro inhibition of lipase, α -amylase, α -glucosidase, and angiotensin-converting enzyme by defatted rice bran extracts of red-pericarp rice mutant. *Cereal Chemistry*. 95(1): 167-176.

[13]. C. Wang & Q. Shu (2007). Fine mapping and candidate gene analysis of purple pericarp gene Pb in rice (*Oryza sativa* L.). *Chinese science bulletin*. 52: 3097-3104.

[14]. T. Oikawa, H. Maeda, T. Oguchi, T. Yamaguchi, N. Tanabe, K. Eban, M.Yano, T.Ebitani & T. Izawa (2015). The birth of a black rice gene and its local spread by introgression. *The Plant Cell*. 27(9): 2401-2414.

[15]. Y. Shao, L. Jin, G. Zhang, Y. Lu, Y. Shen & J. Bao (2011). Association mapping of grain color, phenolic content, flavonoid content and antioxidant capacity in dehulled rice. *Theoretical and applied genetics*. 122: 1005-1016.

[16]. H. Maeda, T. Yamaguchi, M. Omoteno, T. Takarada, K. Fujita, K. Murata, Y. Lyama, Y. Kojima, M. Morikawa, H. Ozaki, N. Mukaino, Y. Kidani & T. Ebitani (2014). Genetic dissection of black grain rice by the development of a near isogenic line. *Breeding Science*. 64(2): 134-141.

[17]. A. Ghasemzadeh, M. T. Karbalaii, H. Z. Jaafar & A. Rahmat (2018). Phytochemical constituents, antioxidant activity, and antiproliferative properties of black, red, and brown rice bran. *Chemistry Central Journal*. 12: 1-13.

[18]. P. J. Cáceres, C. Martínez-Villaluenga, L. Amigo, & J. Frias (2014). Maximising the phytochemical content and antioxidant activity of Ecuadorian brown rice sprouts through optimal germination conditions. *Food Chemistry*. 152: 407-414.

[19]. A. Djeridane, M. Yousfi, B. Nadjemi, D. Boutassouna, P. Stocker & N. Vidal (2006). Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*. 97(4): 654-660.

[20]. J. J. Doyle (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*. 12: 13-15.

[21]. S. H. Lim & S. H. Ha (2013). Marker development for the identification of rice seed color. *Plant biotechnology reports*. 7: 391-398.

[22]. A. Gunaratne, K. Wu, D. Li, A. Bentota, H. Corke & Y. Z. Cai (2013). Antioxidant activity and nutritional quality of traditional red-grained rice varieties containing proanthocyanidins. *Food chemistry*. 138(2-3): 1153-1161.

[23]. C. Aguilar-Garcia, G. Gavino, M. Baragaño-Mosqueda, P. Hevia & V. C. Gavino (2007). Correlation of tocopherol, tocotrienol, γ -oryzanol and total polyphenol content in rice bran with different antioxidant capacity assays. *Food Chemistry*. 102(4): 1228-1232.

[24]. Y. Shen, L. Jin, P. Xiao, Y. Lu & J. Bao (2009). Total phenolics, flavonoids, antioxidant capacity in rice grain and their relations to grain color, size and weight. *Journal of Cereal Science*. 49(1): 106-111.

[25]. R. Koes, W. Verweij & F. Quattrocchio (2005). Flavonoids: a colorful model for the regulation and evolution of biochemical pathways. *Trends in Plant Science*. 10(5): 236-242.

[26]. E. Grotewold (2006). The genetics and biochemistry of floral pigments. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57: 761-780.

[27]. T. Furukawa, M. Maekawa, T. Oki, I. Suda, S. Iida, H. Shimada, I. Takamura & K. I. Kadowaki (2007). The Rc and Rd genes are involved in proanthocyanidin synthesis in rice pericarp. *The Plant Journal*. 49(1): 91-102.