ResearchGate

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: https://www.researchgate.net/publication/319892454

NGHIÊN CỨU ĐA DẠNG PROTEIN DỰ TRỮ Ở MỘT SỐ GIỐNG BƯỞI (Citrus grandis L.) BẰNG KỸ THUẬT ĐIỆN DI SDS

Article · March 2013

DOI: 10.26459/jard.v75i6.3140

CITATIONS
0

READS
31

4 authors, including:

Hoang Tan Quang
Hue University
22 PUBLICATIONS **29** CITATIONS

SEE PROFILE

Nguyen Duc Huy
Hue University
22 PUBLICATIONS **86** CITATIONS

SEE PROFILE

Some of the authors of this publication are also working on these related projects:

Project National Foundation for Science and Technology Development, Vietnam View project

Project Peroxidases production from wood decay fungi using rice straw medium View project

All content following this page was uploaded by Hoang Tan Quang on 18 October 2018.

The user has requested enhancement of the downloaded file.

TẠP CHÍ KHOA HỌC, Đại học Huế, Tập 75B, Số 6, (2012), 125-133

NGHIÊN CỨU ĐA DẠNG PROTEIN DỰ TRỮ Ở MỘT SỐ GIỐNG BƯỞI (*Citrus grandis* L.) BẰNG KỸ THUẬT ĐIỆN DI SDS

Hoàng Tấn Quảng, Lê Thị Thu Hằng, Nguyễn Đức Huy, Cù Lê Nguyên

Viện Tài nguyên, Môi trường và Công nghệ sinh học, Đại học Huế

Tóm tắt. Nghiên cứu đa dạng di truyền của các giống bưởi thu thập tại Thừa Thiên Huế bằng kỹ thuật điện di SDS cho thấy các loại đệm khác nhau đều có khả năng tạo ra các băng protein đa hình trên hình ảnh điện di, đệm Hirata cho phổ điện di có số băng nhiều nhất (từ 17-23 băng tùy theo giống). Trong số 67 băng protein thu được từ 6 đệm khác nhau có 34 băng giống nhau ở tất cả các mẫu nghiên cứu. Phân tích đa dạng di truyền cho thấy giống bưởi Thanh du có giá trị H_0 cao nhất (5,00) còn giống bưởi Thanh trà thấp nhất (1,60). Trong 15 giống bưởi nghiên cứu, bưởi Thanh trà có sự đa dạng di truyền cao nhất, thể hiện qua giá trị H_{EP} (0,93) và SENA (13,10) cao nhất. Các giống bưởi nghiên cứu có hệ số tương đồng Jaccard giao động từ 0,65-0,96. Giản đồ phả hệ của 15 giống được xây dựng nhờ thuật toán UPGMA dựa trên hệ số Jaccard cho thấy bưởi được chia thành 2 nhóm, nhóm A gồm 10 giống (độ tương đồng khoảng 75%) và nhóm B gồm có 5 giống có độ tương đồng cao hơn (khoảng 85%).

Từ khóa: bưởi (*Citrus grandis* L.), đa dạng di truyền, điện di SDS, hệ số tương đồng, Thừa Thiên Huế.

1. Mở đầu

Bưởi (*Citrus grandis* L.) là cây ăn quả có tác dụng bổ dưỡng và có nhiều giá trị về mặt y học. Trên đất nước ta từ lâu đã hình thành những vùng trồng bưởi và những giống bưởi nổi tiếng như bưởi Đoan Hùng (Phú Thọ), bưởi Đường Hương Sơn (Hương Sơn, Hà Tĩnh), bưởi Phúc Trạch (Hương Khê, Hà Tĩnh), bưởi Thanh trà (Huế), bưởi Biên Hòa (Đồng Nai), bưởi Năm roi, bưởi Da xanh (Vĩnh Long)... [1].

Hiện nay, ở Thừa Thiên Huế bưởi được trồng phổ biến và đem lại thu nhập cao cho bà con nông dân. Bưởi có rất nhiều giống do được trồng từ lâu và có nhiều giống du nhập từ miền Bắc và miền Nam. Để đánh giá mức độ đa dạng di truyền thì việc dựa vào những chỉ thị hình thái là chưa đủ mà cần có những đánh giá sâu hơn về cấu trúc di truyền, cụ thể là hệ gen hoặc hệ protein.

Điện di là kỹ thuật phân chia các phân tử như protein hoặc các đoạn nucleic acid trên cơ sở khối lượng và điện tích thực của chúng bằng sự dịch chuyển khác nhau thông qua agarose hoặc polyarcylamide gel trong điện trường. Ưu điểm của phương pháp điện

di là đơn giản, dễ sử dụng được dùng để xác định thành phần các loại protein cùng với sự thay đổi hàm lượng của chúng. Sử dụng kỹ thuật điện di SDS để nghiên cứu đa dạng di truyền cũng đã được thực hiện trên một số đối tượng như lúa [14], các loài thuộc họ cải [13], cam chanh [7], đậu tương [2],…

Trong bài báo này, chúng tôi khảo sát sự sai khác của các băng protein trên điện di đồ từ đó đưa ra những đánh giá về sự đa dạng protein ở các giống bưởi thu thập tại Thừa Thiên Huế.

2. Đối tượng và phương pháp

2.1. Đối tượng

Đối tượng nghiên cứu của chúng tôi là các giống bưởi thu thập ở Thừa Thiên Huế gồm có 15 giống. Các giống bưởi này về mặt hình thái khác nhau không đáng kể, từ lá, hoa cho đến hình dạng trái. Sự khác nhau thể hiện ở màu sắc của cùi quả, cách sắp xếp múi, màu sắc và mùi vị của tép.

Bảng 1. *Các giống bưởi sử dụng trong nghiên cứu*

Giống	Địa điểm thu mẫu
Bưởi Thanh trà, bưởi Đỏ, bưởi Bành, bưởi Tàu, bưởi Trắng, bưởi Cốm, bưởi Láng	Thủy Biều, Huế
Bưởi Đường lá cam, bưởi trắng Hà Nội, bưởi Năm roi, bưởi Hồng da xanh	Trung tâm Nghiên cứu và phát triển nông nghiệp Huế
Bưởi Nam Đông	Nam Đông, Thừa Thiên Huế
Bưởi Thanh du	Kim Long, Huế
Bưởi đỏ Hà Nội	Bình Điền, Hương Trà, Thừa Thiên Huế
Bưởi Phúc Trạch	Mua từ siêu thị

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Tách chiết protein dự trữ

Protein trong hạt bưởi được tách chiết theo phương pháp của Koltunow và cs (1996). Hạt bưởi tươi sau khi tách bảo quản ở -20°C, bóc vỏ hạt và nghiền mịn bằng nitơ lỏng. Protein hòa tan tổng số của bưởi được chiết với các loại đệm khác nhau theo tỉ lệ 20 mg mẫu: 500 µL đệm, vortex trong 1 phút, sau đó ly tâm 15.000 vòng/phút ở 4°C, trong 15 phút [10]. Dịch ly tâm chứa protein hòa tan tổng số được dùng để chạy điện di.

Các loại đệm được sử dụng để tách chiết protein là đệm PBS [3], đệm Gabriel và Ellingboe (1982) [8], đệm Arakawa [6], đệm theo Kang và cs (2003) [9], đệm Hirata [14], đệm Cammaerts và Jacobs [7]. Hàm lượng protein được xác định bằng phương

pháp Bradford [3], sử dụng albumin huyết thanh bò (lyophilized bovine serum albumin, Bio Rad) để dựng đường chuẩn protein.

2.2.2. Điện di protein

Protein được điện di trên polyacrylamide gel 12% theo khối lượng phân tử bằng hệ điện di đứng Mini PROTEAN 3 (Bio Rad) ở điện áp 50 V trong 3 giờ. Protein chuẩn có khối lượng phân tử từ 14,4-97 kD (Pharmacia). Sau khi điện di, gel được nhuộm bằng Coomassie Brilliant Blue R250 0,1% trong methanol, acetic acid và nước cất với tỷ lệ 44:5:50 trong 15 phút. Tiếp đó rửa gel bằng dung dịch rửa là acetic acid: methanol: nước cất theo tỷ lệ 1:3:6 từ 2-3 lần, mỗi lần 15 phút. Khi nhuộm và rửa gel đặt trên máy lắc nhẹ 45 vòng/phút [2].

2.2.3. Xác định hệ số đa dạng di truyền

Để xác định tính đa dạng di truyền, chúng tôi sử dụng các hệ số như sau [13, 14]:

- Hệ số đa dạng kiểu hình Shannon's: $H_0 = -\Sigma f_i \ln f_i$ (*fi* là tần số xuất hiện kiểu hình thứ *i*)

- Giá trị đa dạng về kiểu gen được tính theo công thức: $H_{EP} = 1-\Sigma f_i^2$

- Tổng số allele có hiệu quả *SENA* được tính theo công thức: $SENA = (1/\Sigma f_i^2)-1$

2.2.4. Xử lý kết quả thí nghiệm

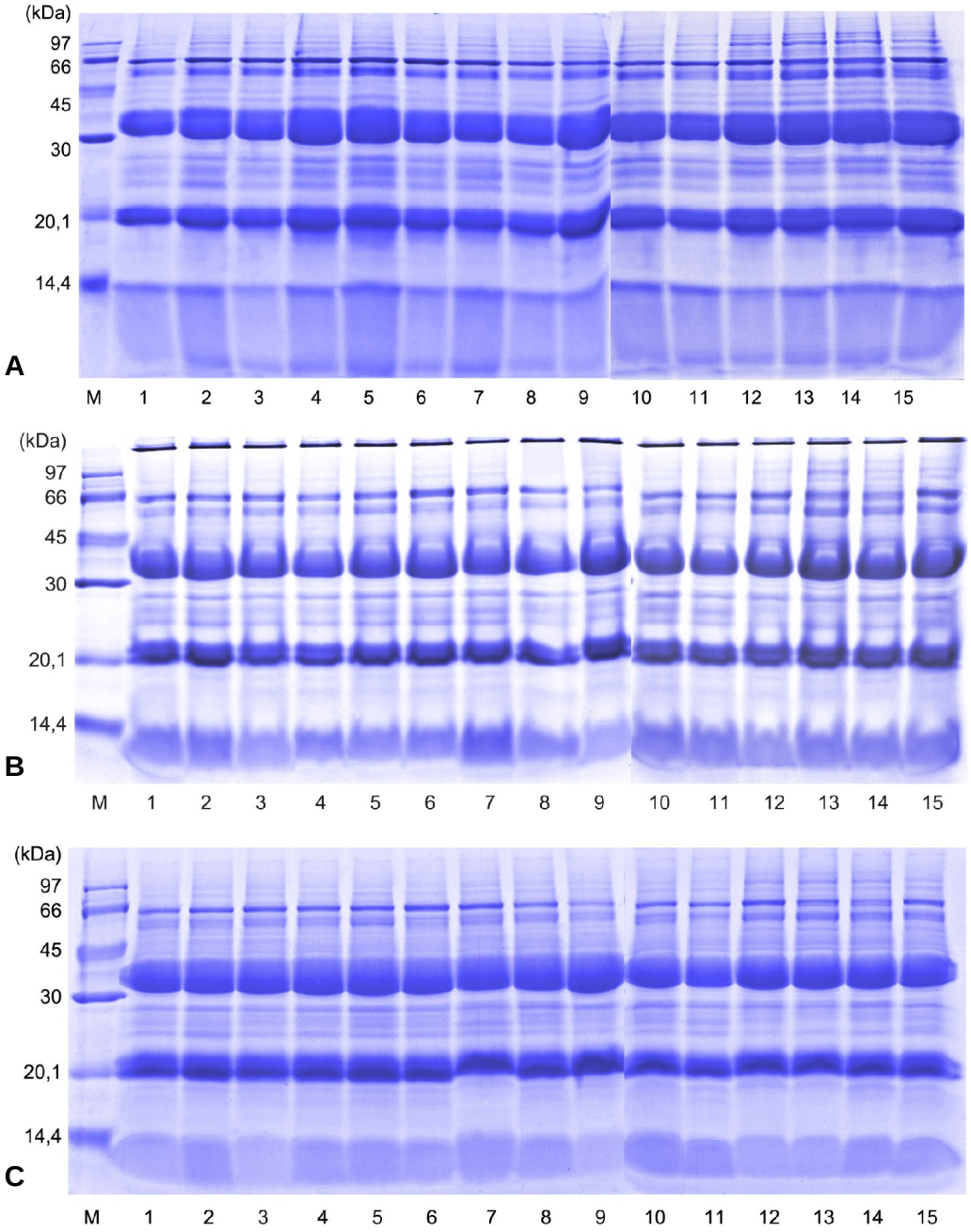
Hình ảnh điện di được thu nhận bằng hệ thống máy quét và phân tích hình ảnh GS-800 Calibrated Densitometer (Bio Rad), sử dụng chương trình Quantity One (version 4.4.1) (Bio Rad) để phân tích phổ điện di.

Xây dựng giản đồ phả hệ và phân tích cụm theo thuật toán UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) dựa trên hệ số Jaccard (1908) bằng phần mềm NTSYS 2.1 (Exeter Software, Mỹ) trên cơ sở xuất hiện hay không xuất hiện của các băng trên phổ điện di protein tổng số của các mẫu theo nguyên tắc đánh số "1" nếu có xuất hiện băng và số "0" nếu không xuất hiện băng.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Điện di SDS

Trong thí nghiệm này, chúng tôi tách chiết protein tổng số bằng 6 loại đệm khác nhau, đây là các đệm phổ biến trong nghiên cứu protein hòa tan tổng số của thực vật. Kết quả tổng hợp băng điện di từ 6 đệm cho thấy tổng số băng protein xuất hiện là 81, trong đó thấp nhất là 7 (đệm PBS) và cao nhất là 23 (đệm Hirata), số băng trùng nhau của các mẫu là 49, giao động từ 6-14 tùy loại đệm (Bảng 2). Trong các đệm nghiên cứu, đệm Hirata cho số băng protein nhiều nhất (17-23 băng) (Hình 1A), đệm Cammaerts và Jacobs thu được số băng protein giao động nhiều nhất (7-16 băng). Phần lớn các băng thu được năm trong khoảng 14-97 kDa, chỉ có một số ít băng nằm ngoài phạm vi này.



Hình 1. *Phổ điện di protein hòa tan tổng số của 15 giống bưởi ở các đệm đại diện. A: đệm Hirata; B: đệm Arakawa; C: đệm Gabriel và Ellingboe; M: Chuẩn khối lượng phân tử của protein; 1: bưởi Thanh trà; 2: bưởi Đỏ; 3: bưởi Bành; 4: bưởi Tàu; 5: bưởi Trắng; 6: bưởi Cốm; 7: bưởi Láng; 8: bưởi Đường lá cam; 9: bưởi trắng Hà Nội; 10: bưởi Năm roi; 11: bưởi Hồng da xanh; 12: bưởi Nam Đông; 13: bưởi Thanh du; 14: bưởi đỏ Hà Nội; 15: bưởi Phúc Trạch.*

Bảng 2. *Kết quả phân tích phổ điện di protein của 15 giống bưởi*

STT	Tên đệm	Số băng tạo thành/mẫu	Số băng giống nhau giữa các mẫu
1	PBS	10-12	7
2	Hirata	17-23	13
3	Arakawa	12-16	10
4	Gabriel và Ellingboe	14-17	14
5	Cammaerts và Jacobs	7-16	6
6	Kang và cs	12-15	9

3.2. Phân tích đa dạng di truyền

Đối với phân tích đa dạng di truyền, việc phân tích phải đảm bảo có từ 50 băng điện di trở lên mới có độ tinh cậy cao [12]. Vì vậy, chúng tôi đã sử dụng 6 đệm khác nhau để tách chiết protein tạo ra 81 băng khác nhau trên hình ảnh điện di và kết quả phân tích đa dạng được đánh giá theo 6 đệm này. Kết quả phân tích cho thấy giá trị trung bình H_0 là 3,24 (Bảng 3); như vậy các giống phân tích rất đa dạng về kiểu hình protein dự trữ. Giống có giá trị H_0 cao nhất là Thanh du (5,00) và giống có giá trị H_0 thấp nhất là Thanh trà (1,60). Nguyễn Thanh Tường (2005) khảo sát tính đa dạng protein dự trữ của các giống lúa ven biển vùng Đồng bằng sông Cửu Long cho thấy giá trị kiểu hình protein rất đa dạng và giá trị H_0 lớn nhất là 2,69 [5].

Hệ số H_{EP} là chỉ tiêu dùng để đánh giá sự phong phú về mặt di truyền ở các giống khác nhau, giá trị này nằm trong khoảng từ 0-1, chỉ số H_{EP} càng tiến gần tới 1, giống càng có giá trị đa dạng kiểu gen cao, $H_{EP} = 0$ khi giống thuần nhất về kiểu gen. Qua phân tích chúng tôi nhận thấy giá trị H_{EP} của các giống bưởi có cao (H_{EP}= 0,68). Trong đó, bưởi Thanh trà có H_{EP} cao nhất (0,93) và bưởi Láng có H_{EP} thấp nhất (0,3).

Tương tự hệ số H_{EP}, hệ số *SENA* cũng là chỉ tiêu đánh giá tính đa dạng về mặt di truyền ở các giống. Giá trị *SENA* phản ánh số allele có tác động kiểm soát protein dự trữ. Đối với một giống thuần giá trị *SENA*=0. Khi giá trị *SENA* càng lớn thì hiệu quả tác động càng lớn làm cho quần thể có tính đa dạng càng cao. Kết quả phân tích cho thấy các giống bưởi có số allele trung bình là 3,23, điều này cho thấy các giống bưởi nghiên cứu có hơn 1 allele trên mỗi locus tác động kiểm soát sự hình thành các tính trạng protein dự trữ. Giống Thanh trà có tính đa dạng di truyền cao nhất (*SENA*=13,10) và thấp là bưởi Láng (*SENA*=0,42).

Nguyễn Thanh Tường (2005) khi đánh tính đa dạng về protein dự trữ của các giống lúa vùng ven biển Đồng bằng sông Cửu Long đã xác định được có khoảng 2-3 allele trên mỗi locus tác động kiểm soát sự hình thành các tính trạng protein dự trữ [5].

Bảng 3. *Các hệ số đa dạng protein ở 15 giống bưởi*

Giống	H_0	H_{EP}	*SENA*
Thanh Trà	1,60	0,93	13.1
Bưởi đỏ	2,49	0,77	3,35
Bưởi bành	2,53	0,8	3,90
Bưởi tàu	2,92	0,78	3,53
Bưởi trắng	3,40	0,68	2,09
Bưởi cốm	3,37	0,5	0,99
Bưởi láng	3,26	0,3	0,42
Bưởi đường lá cam	2,83	0,66	1,97
Bưởi trắng Hà Nội	2,73	0,69	2,28
Bưởi Năm roi	2,58	0,86	6,28
Bưởi da xanh	3,04	0,74	2,83
Bưởi Nam Đông	3,00	0,73	2,64
Thanh du	5,00	0,54	1,15
Bưởi đỏ Hà Nội	4,90	0,62	1,63
Bưởi Phúc Trạch	4,60	0,64	1,83
Tổng	**48,67**	**10,24**	**48,39**
Trung bình	**3,24**	**0,68**	**3,23**

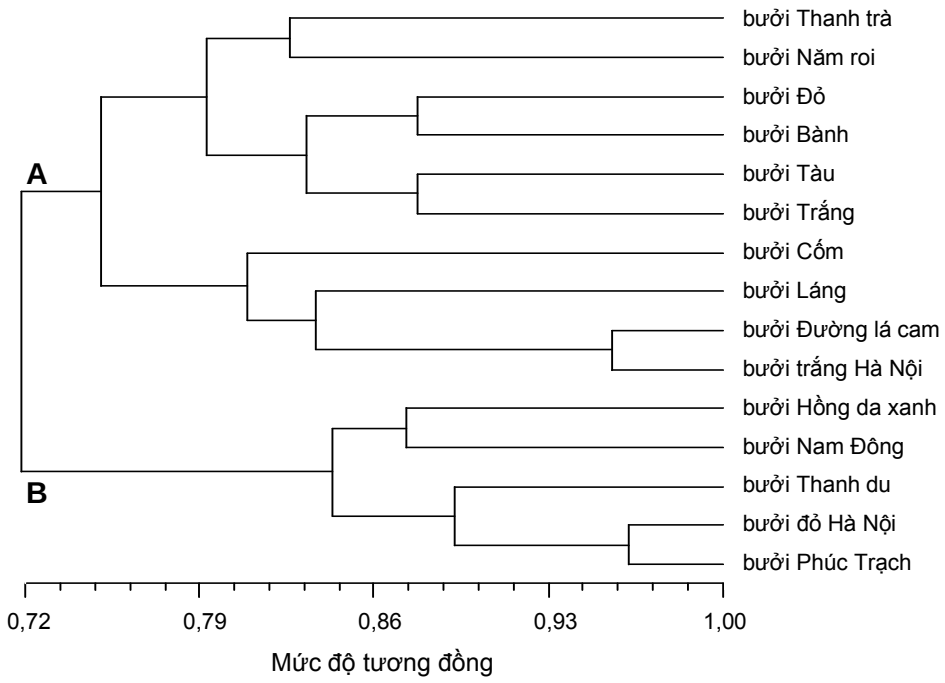
3.3. Phân tích giản đồ phả hệ

Phân tích đa dạng di truyền cho thấy hệ số tương đồng Jaccard giữa các mẫu nghiên cứu giao động từ 0,65-0,96, trong đó thấp nhất là giữa bưởi Trắng và bưởi Nam Đông, giữa bưởi Láng và bưởi Thanh du (tương đồng 65%), cao nhất là giữa bưởi đỏ Hà Nội và bưởi Phúc Trạch (tương đồng 96%).

Giản đồ phả hệ cho thấy 15 giống bưởi được chia thành 2 nhóm (Hình 2), hai nhóm có độ tương đồng 72%. Nhóm A gồm 10 giống, có độ tương đồng khoảng 75%, bao gồm bưởi Thanh trà, bưởi Năm roi, bưởi Đỏ, bưởi Bành, bưởi Tàu, bưởi Trắng, bưởi Cốm, bưởi Láng, bưởi Đường lá cam và bưởi trắng Hà Nội. Nhóm B gồm có 5 giống (bưởi Hồng da xanh, bưởi Nam Đông, bưởi Thanh du, bưởi đỏ Hà Nội và bưởi Phúc Trạch), các giống này có độ tương đồng cao hơn (khoảng 85%).

Kết quả nghiên cứu của chung tôi cũng cho kết quả tương tự với các tác giả khác khi nghiên cứu về quan hệ di truyền giữa các giống bưởi của Việt Nam. Nguyễn Xuân

Thụ và cs (2004) đã xây dựng giản đồ phả hệ của 13 giống bưởi trồng của Việt Nam nhờ vào chỉ thị RAPD. Tác giả nhận thấy hệ số đồng dạng di truyền giữa bưởi Red Pomelo và bưởi Thanh trà đạt cao nhất (0,80); thấp nhất là giữa bưởi Phúc Trạch và bưởi Năm roi (0,57). Trên cây phả hệ, bưởi Phúc Trạch nằm tách biệt trên một nhánh, bưởi JoJoRa Flame cũng chiếm vị trí tách biệt trên cây phát sinh, các giống bưởi thuộc nhóm BC (BC40, BC43, BC39, BC11) và bưởi Năm roi tập hợp trên một nhánh. Các giống bưởi Thanh trà, bưởi đường Lá cam, bưởi Diễn, Da xanh và BC15 nằm trên nhánh còn lại của cây phát sinh [4]. Kyndt và cs (2010) đã nghiên cứu sự phát sinh loài của 69 mẫu thuộc chi *Citrus* và các loài (chi) có liên quan ở Việt Nam dựa trên các trình tự vùng ITS nhận thấy bưởi Thanh trà thuộc về nhóm 1a cùng với bưởi Năm roi, bưởi Phúc Trạch, bưởi Da xanh, bưởi Đoan Hùng,... tách biệt hẳn so với nhóm thanh yên và cam, các giống bưởi này có độ tương đồng từ 64% trở lên [11].



Hình 2. *Giản đồ phả hệ các giống bưởi nghiên cứu dựa trên hệ số Jaccard.*

4. Kết luận

4.1. Các loại đệm khác nhau đều có khả năng tạo ra các băng protein đa hình trên hình ảnh điện di, đệm Hirata cho phổ điện di có số băng nhiều nhất (từ 17-23 băng tùy theo giống bưởi). Trong số 67 băng protein thu được từ 6 đệm khác nhau có 34 băng giống nhau ở tất cả các mẫu nghiên cứu (băng đơn hình).

4.2. Phân tích đa dạng di truyền cho thấy giống bưởi Thanh du có giá trị H_0 cao nhất (5,00) còn giống bưởi Thanh trà là thấp nhất (1,60). Trong 15 giống bưởi nghiên

cứu, bưởi Thanh trà có sự đa dạng di truyền cao nhất, thể hiện qua giá trị H_{EP} (0,93) và *SENA* (13,10) cao nhất.

4.3. Các giống bưởi nghiên cứu có hệ số tương đồng Jaccard giao động từ 0,65-0,96, giản đồ phả hệ cho thấy 15 giống bưởi được chia thành 2 nhóm, nhóm A gồm 10 giống (độ tương đồng khoảng 75%) và nhóm B gồm có 5 giống có độ tương đồng cao hơn (khoảng 85%).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1]. Đoàn Nhân Ái, Nguyễn Thị Dung, Nguyễn Thị Hà, *Tuyển chọn cây đầu dòng của một số cây ăn quả có giá trị cao ở Thừa Thiên Huế*, Báo cáo kết quả nghiên cứu khoa học, Sở Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn Thừa Thiên Huế, 2007.

[2]. Nguyễn Hữu Thuần Anh, Hoàng Tấn Quảng, Nguyễn Đức Huy, *Nghiên cứu đa dạng protein dự trữ của một số giống đậu tương (Glycine max* L.*) bằng kỹ thuật điện di SDS trên polyacrylamide gel*. Tạp chí Khoa học-Đại học Huế 37, (2007), 15-22.

[3]. Nguyễn Văn Mùi, *Thực hành Hóa sinh học*, Nxb Đại học Quốc gia Hà Nội, 2001.

[4]. Nguyễn Xuân Thụ, Nguyễn Hoàng Tỉnh, Lê Trần Vinh, *Xây dựng cây phát sinh của một số giống bưởi trồng của Việt Nam bằng chỉ thị RAPDs*. Những vấn đề nghiên cứu cơ bản trong khoa học sự sống, Nxb Khoa học và Kỹ Thuật, Hà Nội, (2004), 253-256.

[5]. Nguyễn Thanh Tường, Võ Công Thành, Nguyễn Bảo Vệ, *Khả năng chịu mặn và đa dạng di truyền protein dự trữ của một số giống lúa trồng ven biển vùng Đồng bằng sông Cửu long*. TC khoa học, ĐH Cần Thơ, (2005), 49-57.

[6]. Arakawa T, Chong DKX, Merritt JL, Langridge WHR, *Expression of cholera toxin B subunit oligomers in transgenic potato plants*. Trans Res 6, (1997), 403-413.

[7]. Handa T, Ishizawa Y, Oogaki C, *Phylogenetic study of fraction I protein in the genus Citrus and its close related genera*. Jpn J Genet 61, (1986), 15-24.

[8]. Holloway PJ, Arudel PH, *High-resolution two-dimension electrophoresis of plant protein*. Analyt Bioche 172, (1988), 8-15.

[9]. Kang TJ, Loc NH, Jang MO, Jang YS, Kim YS, Seo JE, S YM, *Expression of the B subunit of E. coli heat-labile enterotoxin in the chloroplasts of plants and its characterization*. Trans Res 12, (2003),

[10]. Koltunow AM, Hidaka T, Robinson SP, *Accumulation of seed storage proteins in seeds and in embryos cultured in vitro*. Plant Physiol 110, (1996), 599-609.

[11]. Kyndt T, Dung TN, Goetghebeur P, Toan HT, Gheysen G, *Analysis of ITS of the rDNA to infer phylogenetic relationships among Vietnamese Citrus accessions*. Genet Resour Crop Evol 57, (2010), 183-192.

[12]. Nei M, *Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals*. Genetics 89, (1978), 583-590.

[13]. Rahmanz MM, Hirata Y, *Gentic diversity in Brassica species using SDS-PAGE analysis*. Journal of Biological Sciences 4(2), (2004), 234-238.

[14]. Thanh VC, Hirata Y, *Seed storage protein diversity of three rice species in the Mekong Delta*. Biosphere Conservation 4, (2002), 59-67.

STUDY ON STORAGE PROTEINS DIVERSITY IN SOME PUMMELO (*Citrus grandis* L.) CULTIVARS USING SDS-PAGE TECHNIQUE

Hoang Tan Quang, Le Thi Thu Hang, Nguyen Duc Huy, Cu Le Nguyen
Institute of Resources, Environment and Biotechnology, Hue University

Abstract. Study on genectic diversity based on seed storage proteins of the collected pummelo varieties in Thua Thien Hue using SDS-PAGE technique indicated that protein bands polymorphic were observed by the diffirent extraction buffers. Among of these buffers, Hirata buffer showed highest protein bands number (17 to 23 bands depending on pummelo varieties). Of totals of sixty-seven protein bands analyzed from six diffirent buffers, thirty-four were found to have similarity between these varieties. Genetic diversity analysis showed that Thanh du variety has the highest, whereas, Thanh tra has the lowest H_0 value (5.00 and 1.60, respectively). In fifteen pummelo varieties that were studied, the H_{EP} (0.93) and SENA (13.10) values of Thanh tra were the highest, suggesting that Thanhtra has the highest genetic diversity. Jaccard coefficients of these varieties was from 0.65 to 0.96. Phenogram of 15 pummelo varieties derived using the UPGMA grouping method based on Jaccard coefficients indicated that the pummelo colletion that was studied can be divided into main two groups, group A contains ten varieties with approximately 75% homology, whereas, group B has five varieties with higher homology (approximately 85%).

Keywords: genetic diversity, pummelo (*Citrus grandis* L.), SDS-PAGE, storage proteins, Thua Thien Hue

View publication stats