

QUY LUẬT DI TRUYỀN GLUTELIN TRONG HẠT LÚA TRỒNG (*ORYZA SATIVA L.*)

Phạm Văn Phượng¹ và Yutaka Hirata²

ABSTRACT

Improving nutritive quality of rice is very important for developing countries. Glutelin is one major component of protein content in rice grain because it contains 80% of storage protein total (Juliano 1972). In 2002 the six crosses were initially carried out to get at least 15 F1 grains, then propagated to get F2 grains for SDS-PAGE protein electrophoresis. 200 F2 grains per cross were analyzed. Results showed that the inheritances of proglutelin and basic glutelin B2 were controlled by a single dominant gene while acidic glutelin A1 was controlled by two independent genes located in two chromosomes. Acidic glutelin A1 was followed by the genetic rule of dominant epistasis (13:3).

Title: Inheritance of Glutelin in cultivated rice species (*Oryza Sativa L.*)

1 MỞ ĐẦU

Theo cách phân loại protein dự trữ của Osborne (1924) thì protein dự trữ trong nội nhũ hạt lúa bao gồm 4 loại protein: Albumin, Globulin, Glutelin, và Prolamin. Protein dự trữ ở hai thể protein (protein body, được viết tắt là PB) bao gồm PBI và PBII. PBI hay prolamin tan trong cồn, kích thước nhỏ (1-2 nm), hình cầu và cấu trúc đồng tâm trong khi PBII hay glutelin không hòa tan được trong dung dịch muối hoặc cồn nhưng hòa tan được trong dung dịch 0.1M acid hoặc kiềm, kích thước lớn hơn (2-3 nm), hình phiến đồng nhất (Krishnan và Okita 1986; Tanaka et al. 1980; Wen và Luthe 1985). Về mặt dinh dưỡng, protein dạng prolamin được xem là loại protein khó tiêu hóa cho con người và động vật (Ogawa et al. 1987). Ngược lại, protein dạng glutelin là thành phần dự trữ quan trọng nhất trong nội nhũ hạt lúa chiếm khoảng 80% protein tổng số (Juliano 1972). Do prolamin và glutelin có mối tương quan nghịch nên các nhà chọn giống lúa muốn tăng hàm lượng glutelin bằng cách giảm hàm lượng prolamin trong hạt gạo (Ogawa et al. 1987).

Vì vậy, nghiên cứu quy luật di truyền của các tiểu đơn vị glutelin là vấn đề cần thiết trong công tác chọn giống lúa có chất lượng dinh dưỡng cao.

2 PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Phương tiện

Các giống/dòng được làm cha mẹ bao gồm Nếp Bè dòng D3 và dòng D4, Tép Hành Đột Biến dòng 2 (THĐB-A2) và dòng 7 (THĐB-A7), Jasmine 85 dòng B3 (Jasmine85-B3), VD20 dòng C1(VD20-C1). Các dòng lúa thuần trên đã được thanh lọc và kiểm tra bằng phương pháp điện di (Võ Công Thành và Dương Thị Rẽ 2001).

Các thiết bị chạy điện di protein SDS-PAGE như bộ nguồn cung cấp điện một chiều, bộ khung loại mini-slab gel (Nhật Bản), máy ly tâm với tốc độ 14.000 vòng/phút.

Các hóa chất như Tris-base, glycine, SDS (Sodium dodecyl sulfate), Ammonium persulfate, Acrylamide; thuốc nhuộm Coomassie Brilliant Blue R250 (CBBR250).

1 Phòng thí nghiệm Di-truyền Chọn-giống và Ứng dụng Công-nghệ Sinh-học Bộ môn Khoa-Học Cây trồng, Khoa Nông Nghiệp, Đại Học Cần Thơ

2 Phòng thí nghiệm Di-truyền Chọn-giống và Ứng dụng Công-nghệ Sinh-học, Đại Học Công Nông Tokyo, Nhật Bản.

2.2 Phương pháp

Các tổ hợp lai đã được tiến hành theo cách phối hợp như sau:

B3 x A2

C1 x A2

D4 x A2

D3 x A7

D3 x B3

D3 x C1

Mỗi tổ hợp lai có ít nhất 15 hạt F1, đem trồng và thu hoạch được hạt F2. Lượng hạt ở thế hệ này đã được đem phân tích điện di ít nhất là 200 hạt.

Hạt F2 được phân tích điện di theo quy trình protein SDS-PAGE (Laemmli, 1970), gel có 5% và gel phân tách 12% Acrylamide. Gel được nhuộm trong dung dịch 0.2% CBBR250 trong dung dịch methanol, acetic acid và nước cất theo tỷ lệ 44: 6: 50 theo thứ tự. Gel được rửa trong dung dịch acetic acid, methanol, và nước cất theo tỷ lệ 5: 28: 67 theo thứ tự.

2.3 Phương pháp xử lý số liệu

Bảng protein được phân loại dựa theo mức độ ăn màu Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBBR-250), hàm lượng nhiều biểu hiện mức độ ăn màu đậm, hàm lượng thấp biểu hiện mức độ ăn màu CBBR-250 trung bình, và hàm lượng protein ít thì biểu hiện mức độ ăn màu nhạt. Mức độ ăn màu được ghi nhận bằng mắt thường (Davies C.S, 1985; Hajika M., M. Takahashi, S. Sakai and K. Igita, 1996; Harada K., Y. Toyokawa and K. Kitamura, 1983; Phan T. H., 1996). Kết quả ghi nhận được kiểm định theo phương pháp kiểm định χ^2 , nhằm xác định các quy luật phân ly di truyền cho từng loại tiểu đơn vị glutelin.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Quy luật di truyền của protein dạng proglutelin

Proglutelin là tiền chất tạo ra protein dạng glutelin, nó tích trữ bên trong hạt với trọng lượng phân tử 57 KDa, được tổng hợp ở lưới nội chất và vận chuyển vào lưới nội chất lumen (Sacker et al. 1986, Wang 2000, Takemoto et al. 2002) và được cắt nối bởi enzyme disulfite isomerase tạo thành hai tiểu đơn vị β -glutelin (basic glutelin) có trọng lượng phân tử 22-23 KDa, và α -glutelin (acidic glutelin) có trọng lượng phân tử 37-39 KDa (Yamagata et al. 1982, Subodh et al. 1986, Takaiwa et al. 1986, Krishnan et al. 1986, Masumura et al. 1989).

Kết quả ghi nhận hàm lượng proglutelin (Bảng 1) chúng tôi có một số nhận xét như sau:

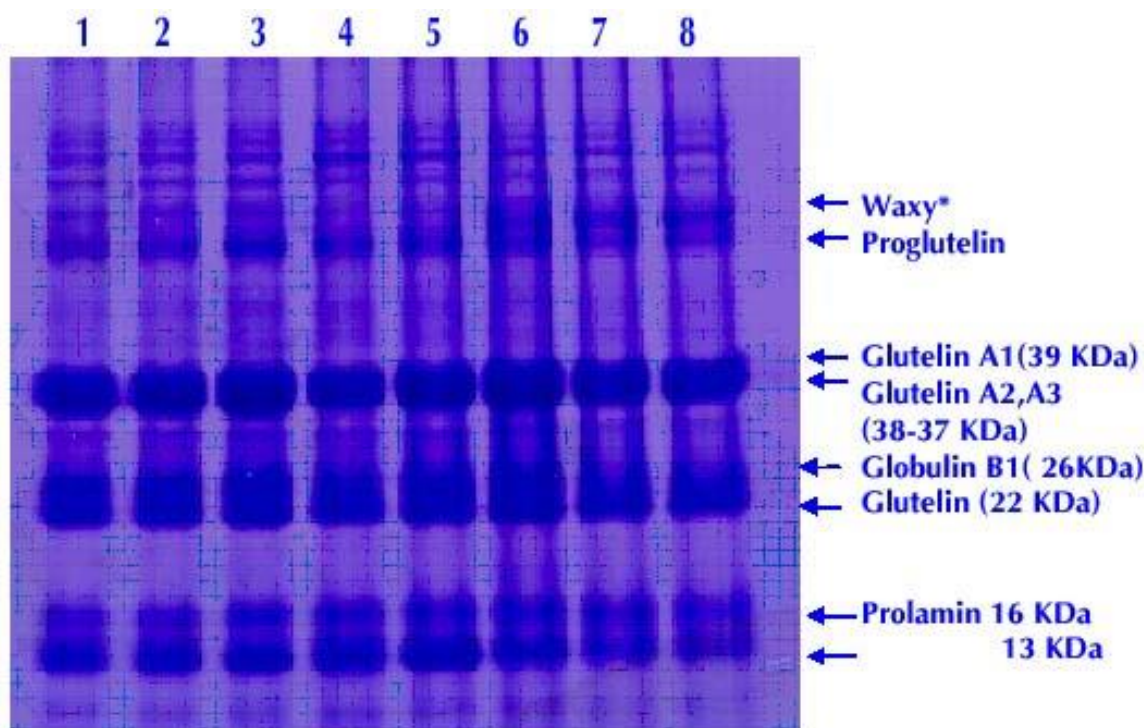
- Các dòng thuần làm cha mẹ như dòng NB-D3 và NB-D4 có hàm lượng proglutelin nhiều, dòng VĐ20-C1 và dòng Jasmine85-B3 có hàm lượng proglutelin trung bình, và dòng THĐB-A2 và THĐB-A7 có hàm lượng proglutelin ít (Hình 1)
- Đối với nhóm có hàm lượng proglutelin ít lai với nhóm proglutelin trung bình (Bảng 1, tổ hợp lai 1 và 2), thế hệ hạt F2 sẽ có hạt mang kiểu gen protein dự trữ dạng proglutelin theo kiểu quy luật di truyền Mendel, tỷ lệ 3:1; kiểu gen ít hàm lượng proglutelin trội so với kiểu gen lặn điều khiển protein proglutelin trung bình. Tương tự, các tổ hợp lai có cha mẹ mang kiểu gen có proglutelin hàm lượng ít lai với kiểu

gen có hàm lượng proglutelin nhiều (tổ hợp lai 3 và 4) và hàm lượng proglutelin trung bình với hàm lượng proglutelin nhiều (tổ hợp lai 5 và 6) cũng tuân theo qui luật di truyền Mendel, tỷ lệ 3:1, gen trội biểu hiện ở cha mẹ có hàm lượng ít hơn.

- Kết quả kiểm định về quy luật di truyền này phù hợp với kết quả nghiên cứu đã được công bố trước đây như Kumamaru et al.(1987), Satoh et al. (1994, 1995) cho rằng proglutelin 57 KDa do một gen kiểm soát, hàm lượng proglutelin nhiều thì hàm lượng acidic và basic glutelin ít.

Bảng 1: Kiểm định χ^2 theo quy luật di truyền Mendel (3:1) của protein dạng proglutelin trên 6 tổ hợp lai lúa

Stt	Tổ hợp lai	Tần suất thực tế đậm	Tần suất thực tế nhạt	Tần suất lý thuyết đậm	Tần suất lý thuyết nhạt	Tổng	χ^2	Xác suất (%)
1	B3 x A2	178	24	176.75	25.25	202	0.048	80-95
2	C1 x A2	246	32	243.25	34.75	278	0.232	50-80
3	D4 x A2	214	26	210.00	30.00	240	0.590	20-50
4	D3 x A7	224	29	221.38	31.62	253	0.231	50-80
5	D3 x B3	205	35	210.00	30.00	240	0.933	20-50
6	D3 x C1	212	27	209.13	29.87	239	0.297	50-80



Hình 1: Phổ điện di protein dự trữ của các dòng thuần cha mẹ

Giếng 1, 2:	NB-D3
3:	NB-D4
4:	VD20-C1
5:	Jasmine85-B3
6:	THDB-A2
7,8:	THDB-A7

*: Vị trí các protein thành phần được dựa theo kết quả công bố của Osborne (1924);

Davis C.S (1985); Vo Cong Thanh và Hirata (2002).

3.2 Qui luật di truyền của protein dạng acidic glutelin

Glutelin với 24 gốc amino acid được tạo ra ở hệ võng nội chất (Tanaka, 1997) là thành phần chính đóng góp chủ yếu vào protein tổng số. Dạng acidic glutelin bao gồm ba tiểu đơn vị là A1, A2, và A3; chúng mang điện tích âm, bộ phận cấu thành nên protein dạng glutelin. Khi phân tích bằng phương pháp điện di SDS-PAGE ba tiểu đơn vị này có trọng lượng phân tử tương ứng là 39, 38, và 37 KDa. Chúng dự trữ trong không bào dưới thể protein có cấu trúc nhiều vòng đồng tâm và được gọi PB II. Acidic glutelin được xem là mục tiêu tốt nhất để cải thiện thành phần amino acid (Qu et al. 1998).

Kết quả chạy điện di các hạt F2 của các tổ hợp lai cho thấy các tiểu đơn vị polypeptide dạng 38 KDa và 37 KDa không tách biệt rõ với nhau nên rất khó phân biệt. Riêng tiểu đơn vị polypeptide 39 KDa tách biệt rất rõ nên đã được ghi nhận và kiểm định quy luật di truyền. Kết quả kiểm định cho thấy băng 39 KDa này tuân theo quy luật di truyền do 2 gen nằm ở 2 cặp nhiễm sắc thể khác nhau (Bảng 2), chúng tương tác allele với nhau theo kiểu át chế trội, trong đó gen trội kiểm soát hàm lượng nhiều biểu hiện kiểu hình theo tỷ lệ thấp với tỷ lệ 3/16, gen lặn kiểm soát hàm lượng acidic glutelin ít hoặc trung bình với tỷ lệ 13/16. Kết quả này phản ánh rằng trong quần thể lúa lai khá đa dạng và phức tạp; hơn nữa, các giống lúa trồng trong điều kiện tự nhiên lâu đời không chọn lọc có hiện tượng lai lẫn với nhau nên protein dự trữ trong các giống lúa mùa trồng dọc ven biển vùng Đồng Bằng Sông Cửu Long (ĐBSCL) khá đa dạng về kiểu hình protein (H0) cũng như đa dạng về mặt di truyền (HEP) (Vương Hồ 2003, Nguyễn Thanh Tường 2003).

Bảng 2: Kiểm định λ_2 cho quy luật di truyền 13:3 của protein dạng A1-glutelin (39KDa) trên 6 tổ hợp lai lúa

Stt	Tổ hợp lai	Tần suất nhật	thực tế đậm	Tần suất nhật	lý thuyết đậm	Tổng	λ_2	Xác suất (%)
1	B3 x A2	172	30	164.13	37.87	202	1.999	50-80
2	C1 x A2	232	46	225.87	52.13	278	0.874	20-50
3	D3 x A7	203	50	205.56	47.44	253	0.157	50-80
4	D4 x A2	200	40	195.00	45.00	240	0.670	20-50
5	D3 x C1	191	48	194.19	44.81	239	0.265	50-80
6	D3 x B3	196	44	195.00	45.00	240	0.014	80-95

3.3 Qui luật di truyền của protein dạng basic glutelin

Ngược với acidic glutelin, basic glutelin là dạng protein mang điện tích dương, bao gồm hai băng với trọng lượng phân tử là 22 KDa và 23 KDa. Basic glutelin cũng được tổng hợp ở hệ võng nội chất và sau đó được chuyển vào trong không bào kết hợp lại với acidic glutelin và dự trữ dưới dạng thể vòng protein đồng tâm (PBII).

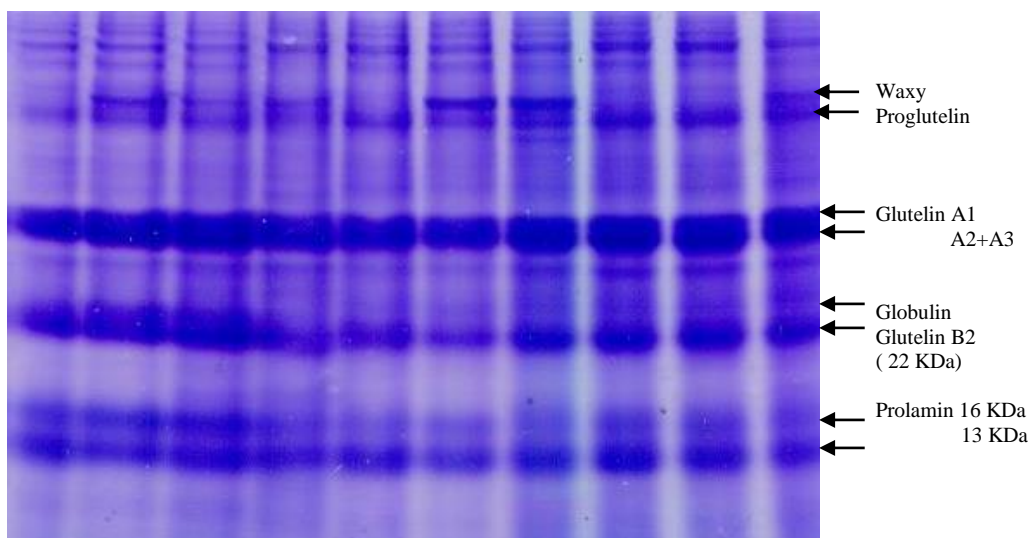
Kết quả phân tích điện di cho thấy các dòng thuần cha mẹ đem lai đều không có băng basic protein dạng 23 KDa ăn màu với thuốc nhuộm CBBR250. Vì vậy, loại hình protein này không được theo dõi quy luật phân ly di truyền. Trái lại, dạng hình basic glutelin 22 KDa biểu hiện hàm lượng khác nhau giữa các cha mẹ đem lai. Dòng THĐB-A2, THĐB-A7 có hàm lượng ít, thứ đến là dòng Jasmine85-B3, VĐ20-C1 có hàm lượng trung bình, và hàm lượng nhiều ở Nếp Bè dòng D3 và Nếp Bè dòng D4.

Kết quả phân tích điện di trên hạt F2, 202 cá thể hạt (THL B3 x A2) đến 278 cá thể hạt (THL C1x A2), cho thấy tất cả các tổ hợp lai đều có polypeptide biểu hiện mức độ ăn màu theo quy luật di truyền Mendel theo tỷ lệ 3:1, một gen kiểm soát, hàm lượng ít hay trung bình là trội hơn so với hàm lượng nhiều.

Bảng 3: Kiểm định λ^2 theo quy luật di truyền Mendel 3: 1 của protein dạng B2-glutelin trên 6 tổ hợp lai lúa

Stt	Tổ hợp lai	Tần suất thực tế		Tần suất lý thuyết		Tổng	λ^2	Xác suất (%)
		nhạt	đậm	nhạt	đậm			
1	B3 x A2	148	54	151.50	50.50	202	0.310	50-80
2	C1 x A2	205	73	208.50	69.50	278	0.225	50-80
3	D4 x A2	186	54	180.00	60.00	240	0.789	20-50
4	D3 x A7	193	60	189.75	63.25	253	0.212	50-80
5	D3 x B3	184	56	180.00	60.00	240	0.344	50-80
6	D3 x C1	181	58	179.25	59.75	239	0.057	80-95

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



Hình 2: Phổ điện di protein dự trữ của tổ hợp lai D3xA7. Hạt F2 (giếng 2-9), hạt cha mẹ (giếng 1 và 10).

4 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

4.1 Kết luận

Kết quả bước đầu khảo sát quy luật di truyền các loại tiểu đơn vị polypeptide của protein glutelin cho phép chúng tôi đi đến kết luận như sau:

- Tiểu đơn vị proglutelin có kiểu phân ly di truyền theo kiểu Mendel, do một gen kiểm soát.
- Tiểu đơn vị polypeptide dạng acidic glutelin A1 (39KDa) tuân theo quy luật di truyền do 2 gen nằm trên 2 nhiễm sắc thể khác nhau cùng kiểm soát hàm lượng protein theo kiểu át chế trội.
- Tiểu đơn vị polypeptide dạng basic glutelin B1 với trọng lượng phân tử 23 KDa không xuất hiện trong tất cả phổ điện di.
- Tiểu đơn vị polypeptide dạng basic glutelin B2 với trọng lượng phân tử 22 KDa tuân theo quy luật di truyền Mendel do một gen kiểm soát. Gen lặn kiểm soát hàm lượng protein nhiều (ăn màu đậm thuốc nhuộm CBBR250).

4.2 Đề nghị

- Tiếp tục nghiên cứu quy trình điện di để phân tách rõ giữa hai tiểu đơn vị polypeptide dạng A2 và dạng A3 glutelin.
- Cần đánh giá lại tập đoàn giống lúa để phát hiện giống có tiểu đơn vị polypeptide dạng B1 basic glutelin nhằm phục vụ cho công tác lai tạo và tuyển chọn ra giống mới có chất lượng dinh dưỡng (protein) cao.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Cagampang G.B., L.J. Cruz, S. G. Espirifu, R. G. Santiago, and B.O. Juliano, 1966. Studies on the extraction and composition of rice proteins. *Cereal Chem.* 43: 145-155.
- Davis C. S. (1985) Inheritance and biochemical analysis of four electrophoresis variants of beta-conglycinin from soybean. *Theore. Appl. Genet.* 71:351 - 358.
- Hajika M., M. Takahashi, S. Sakai and K. Ijita (1996) A new genotype of 7S globulin (β -conglycinin detwcd in wild soybean (*Glycine soja* Sieb. et Zucc.). *Breed. Sci.* 46: 385-386.
- Harada K., Y. Toyokawa and K. Kitamura (1983) Genetic analysis of the most acidic 11S globulin subunit and related characters in soybean. *Japan. J. Breed.* 33: 23-30.
- Juliano, B.O., 1972. The rice caryopsis and its composition. In the *Rice Chemistry and Technology*. Ed. Houston American assoc. *Cereal Chemistry*. P16-17.
- Krishnan H. B. and T. W. Okita, 1986. Structural relationship among therice glutelin polypeptides. *Plant physiology* 81(3): 748-753.
- Kumamaru, T., H. Satoh, N. Iwata, and M. Ogawa, 1987. Mutant for rice storage proteins III. Genetic analysis of mutants for storage proteins of protein bodies in the starchy endosperm. *Jpn. J. Genet.* 62: 333-339.
- Osborne T. B., 1924. The vegetable proteins. As quoted by Katsube T, N. Kurisaka, M. Ogawa, N. Maruyama, R. Ohtsuka, S. Utsumi, and F. Takaiwa, 1999. Accumulation of soybean glycinin and its assembly with the glutelin in rice. *Plant physiol.* 120 (4):1063-1074.
- Phan T. H (1996) Studies on inheritance of the β -conglycinin and glycinin mutant traits in soybean (*Glycine max* L.) (PhD thesis) Iwate University, 101 pp.
- Qu L. Q., T. Kumamaru, H. Satoh, and M. Ogawa, 1998. Genetic analyses on glutelin mutants in rice, 4: 78-82.
- Satoh H., T. Kumamaru, S. Yoshimura, and M. Ogawa, 1994. New 57 KDa glutelin genes on chromosome 9 in rice. *RGN II*: 158-161.
- Satoh H., T. Kumamaru, S. Yoshimura, M. Ogawa, M. Siraisi, B. G. Im, m. Y. Son, and Y. Takemoto, 1995. Spontaneous 57H mutants in rice. *RGN 12*: 194-196.
- Tanaka K., T. Sugimoto, M. Ogawa, and Z. Kasai, 1980. Isolation and characterization of two types of protein bodies in the rice endosperm. *Agric. Biol. Chem.* 44: 1633-1639.
- Tanaka K., 1987. Purification of protein body I of rice seed and its polypeptide composition. *Plant cell physiol.* 28: 1517-1528.
- Nguyễn Thanh Tường, 2003. Đánh giá phẩm chất gạo, khả năng chịu mặn và đa dạng di truyền protein dự trữ của các giống lúa trồng ven biển vùng Đồng Bằng Sông Cửu long. Luận văn tốt nghiệp cao học. 110 trang.
- Võ Công Thành và Dương Thị Rê, 2001. Kết quả bước đầu áp dụng kỹ thuật điện di vào việc thanh lọc và phục tráng phẩm chất dinh dưỡng giống lúa Nếp Bè Tiền Giang. *Tạp chí Nông Nghiệp và Phát Triển Nông Thôn*, 6: 373 và 375.
- Vo Cong Thanh and Yutaka Hirata, 2002. Seed storage protein diversity of three rice species in the Mekong Delta. *Biosphere Conservation* 4(2): 59-67.
- Vương Hồ, 2003. Đánh giá phẩm chất gạo, khả năng chịu mặn và đa dạng di truyền protein dự trữ của 44 giống lúa trồng phổ biến ở tỉnh Sóc Trăng. Luận văn tốt nghiệp cao học. 99 trang.
- Wen and Luthe, 1985. Biochemical characterization of rice glutelin. *Plant Physio.* 78:172-177.