

NUÔI CÂY BAO PHÂN TẠO DÒNG THUẦN Ở GIỐNG LÚA NẾP ĐẶC SẢN TÚ LỆ

Đặng Thị Minh Lụa, Lê Thị Bích Thủy, Nguyễn Đức Thành

Viện Công nghệ sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam

TÓM TẮT

Nếp Tú Lệ là giống lúa nếp đặc sản ở thung lũng Tú Lệ huyện Văn Chấn tỉnh Yên Bái. Đây là một giống lúa có nhiều đặc tính quý: độ dẻo cao, dẻo lâu, thơm và chịu đựng tốt với các yếu tố bất thuận của môi trường, là nguồn gen quý cần được bảo tồn. Tuy nhiên chúng đang bị thoái hóa dần làm giảm năng suất và chất lượng. Vì vậy, chúng tôi đã nghiên cứu nhằm phục tráng giống lúa nếp này bằng phương pháp nuôi cấy bao phấn tạo dòng thuần. Chúng tôi đã tiến hành nuôi cấy 8640 bao phấn trên 2 loại môi trường tạo mô sẹo CI1 và CI2. Thu được 684 mô sẹo chuyển vào môi trường tái sinh cây PR. Kết quả cho thấy, mô sẹo được tạo ra ở cả hai loại môi trường trên đều cho tỷ lệ tái sinh cây khá cao: môi trường CI1 (60,87%) và CI2 (30,76%). Sáu mươi bảy dòng cây xanh tái sinh được trồng trong xô tại nhà lưới, trong đó có 45 dòng hữu thụ hạt chiếm tỷ lệ 67,16%; còn lại là 22 dòng đơn bội. Những dòng có hạt sau đó được phân tích phân tử với 8 cặp mồi liên quan đến chất lượng lúa gạo. Kết quả cho thấy, chỉ có gen Wx (waxy) quyết định hàm lượng amylose là có sự biến đổi. Những dòng hữu thụ sẽ tiếp tục được duy trì trong các thế hệ tiếp theo để theo dõi về độ thuần và phân tích các chỉ tiêu về nông sinh học và đặc tính sinh lý, sinh hóa.

Từ khóa: Chất lượng, dòng thuần, lúa nếp Tú Lệ, nuôi cấy bao phấn, phục tráng giống

MỞ ĐẦU

Nếp Tú Lệ còn có tên gọi khác là Khẩu Nua Mường Lùng hay nếp Tan Lá là một giống lúa nếp đặc sản ở xã Tú Lệ, huyện Văn Chấn, tỉnh Yên Bái. Xã vùng cao Tú Lệ có 11 thôn bản nhưng chỉ có 7 thôn khi cấy giống lúa nếp thơm này mới đảm bảo chất lượng. Gạo nếp Tú Lệ hạt to, tròn đều, hương thơm quyến rũ, độ dẻo cao, không dính và chịu đựng tốt với các yếu tố bất lợi của môi trường. Tuy nhiên, giống lúa nếp này đang bị thoái hóa dần làm giảm năng suất và chất lượng. Nguyên nhân là do nhân dân tự chọn giống không được kỹ, trong quá trình gieo cấy lại bị lẫn tạp nhiều, hoặc có thể là sự biến đổi di truyền do giao phấn tự nhiên với các giống lúa cải tiến khác... (Hà Đình Tuấn, 2007). Vì vậy, việc phục tráng giống lúa nếp này là nhằm bảo tồn nguồn gen và cung cấp giống siêu nguyên chủng phục vụ nhu cầu sản xuất, tiến tới xây dựng thương hiệu giống lúa nếp thơm Tú Lệ giúp đồng bào nơi đây chuyên canh sản xuất hàng hóa, cải thiện đời sống. Hiện tại, Viện Khoa học kỹ thuật Nông Lâm nghiệp miền núi phía Bắc đã tuyển chọn được hơn 200 cá thể có ưu thế vượt trội về mặt năng suất và chất lượng. Dự án “Phục tráng giống lúa nếp Tú Lệ” đã được Viện Nghiên cứu Lúa Quốc tế IRRI (International Rice Research Institute) cùng Trường Đại học Nông lâm Thái Nguyên phối hợp nghiên cứu vùng nguyên liệu 3000 tấn/năm. Cùng mục đích

phục tráng giống lúa nếp Tú Lệ chúng tôi đã sử dụng phương pháp nuôi cấy bao phấn tạo dòng thuần. Ưu điểm của phương pháp này là tiết kiệm được thời gian. Vì bằng con đường tự phối phải mất từ 5 - 7 thế hệ, còn bằng con đường nuôi cấy bao phấn tạo những dòng đơn bội sau đó đa bội hóa các dòng này để tạo dòng đồng hợp tử tuyệt đối thì chỉ cần 1 thế hệ là đủ.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu

Bao phấn giống lúa nếp Tú Lệ, xã Nghĩa Lợi 1 vụ, tỉnh Yên Bái.

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp thu và xử lý dòng

Lấy dòng khi khoảng cách giữa tai lá dòng và tai lá thứ nhất là 1 - 5 cm. Dòng được lấy vào buổi sáng (từ 8 - 10 h) và được cắm vào bình nước nếu cây ngay hoặc bọc trong túi polyethylene rồi cắm vào bình nước để tủ lạnh 10°C và cấy trong vòng 4 ngày.

Khử trùng dòng và cấy bao phấn

Dùng bông sạch có tăm cotton 70° lau kỹ toàn bộ bề mặt dòng, nhẹ nhàng tách bỏ lớp bẹ lá bên ngoài. Khi còn lớp vỏ lụa bên trong dùng dao cắt vô trùng

ạch theo chiều dài đồng và dùng panh kéo đồng ra. Cắt bỏ các hoa lúa quá già hoặc quá non chỉ lấy những hoa chứa hạt phấn ở giai đoạn đơn nhân. Tách lấy bao phấn và cấy vào ống nghiệm nhỏ kích thước 2×20 cm chứa môi trường thạch nghiêng tạo mô sẹo CI1 bao gồm: môi trường cơ bản MS (Murashige, Skoog, 1962) cộng thêm 2 mg/l 2,4D; 100 ml/l nước dừa; 30 g/l saccharose; 30 g/l mantose; 8 g/l agar; pH 5,8. Môi trường CI2 bao gồm: môi trường cơ bản N6 (Chu *et al.*, 1975) cộng thêm 2 mg/l 2,4D; 0,5 mg/l kinetin; 30 g/l manitol; 30 g/l saccharose; 10 mg/l AgNO₃; 8 g/l agar; pH 5,8. Những bao phấn này được nuôi trong tối ở nhiệt độ $26^\circ \pm 2^\circ\text{C}$.

Phương pháp tái sinh cây

Sau 5 - 7 tuần nuôi cấy trên môi trường tạo mô sẹo, từ một số bao phấn xuất hiện những khối mô sẹo nhỏ màu trắng. Khi mô sẹo đạt đường kính từ 1 - 2 mm thì cấy chuyển sang môi trường tái sinh cây PR với số lượng 6 mô sẹo trong một bình tam giác 250 ml. Thành phần môi trường PR bao gồm: môi trường cơ bản MS bổ sung 0,2 mg/l NAA; 1 mg/l BAP; 2 mg/l kinetin; 100 ml/l nước dừa; 8 g/l agar; 30 g/l saccharose; pH 5,6 - 5,8. Nuôi cấy trong điều kiện ánh sáng đèn huỳnh quang, cường độ chiếu sáng 2000 lux, thời gian chiếu sáng 16 h/ngày, nhiệt độ $26^\circ \pm 2^\circ\text{C}$. Các cụm chồi xuất hiện sau 4 - 6 tuần nuôi cấy. Tách chồi thành từng dòng riêng biệt dựa vào mức độ liên kết giữa các chồi trong cụm và cấy vào môi trường nhân chồi là môi trường MS nước có chứa 0,5 mg/l BAP để bảo đảm sự sống khi đưa ra đồng ruộng.

Tạo cây hoàn chỉnh

Các chồi sau khi nhân, được cấy vào môi trường MS nước không có chất kích thích sinh trưởng để tạo rễ. Sau 3 - 4 tuần hệ rễ và chồi đã phát triển mạnh mẽ thì đưa ra trồng trong xô tại nhà lưới.

Phương pháp phân tích phân tử

Những dòng cây xanh có hạt nhận được từ nuôi cấy bao phấn được phân tích về phân tử với 8 cặp mồi liên quan đến chất lượng lúa gạo bao gồm:

Wx liên kết với gen mã hóa cho enzyme tổng hợp amylose (Bao *et al.*, 2002).

Sbe liên kết với gen mã hóa cho enzyme tổng hợp amylopectin (Bao *et al.*, 2002).

RM223 và RG28 liên kết với gen fgr điều khiển

tính trạng mùi thơm (Nguyen Thi Lang, Bui Chi Bui, 2002). Cùng với 4 microsatellites khác RM252, RM72, RM238, RM302 liên quan đến chất lượng (Lanceras *et al.*, 2000; Toojinda *et al.*, 2004).

DNA của những dòng lúa này được tách chiết theo phương pháp CTAB của Saghai Maroof (1994). Phản ứng PCR được thực hiện trong 20 μl chứa 1,0 μl DNA (25 ng/ μl); 2,0 μl 10xPCR buffer; 1 μl MgCl₂ (50 mM); 2,5 μl dNTP (1 mM); 0,5 μl primer F (50 ng/ μl); 0,5 μl primer R (50 ng/ μl); 0,5 μl Taq-polymerase (5 UI/ μl). Chu kỳ của PCR như sau: 94°C trong 5 phút; tiếp theo là 34 chu kỳ với các bước 94°C trong 1 phút, 55°C trong 30 giây, 72°C trong 1 phút; cuối cùng là bước kéo dài 72°C trong 5 phút. Sản phẩm PCR sau đó được điện di trên gel polyacrylamide 5% và nhuộm bạc theo phương pháp của Promega.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Khả năng tạo mô sẹo từ phấn lúa

Đồng lấy về được cấy ngay trong vòng 4 ngày, vì nếu bao phấn để lạnh quá lâu thì hạt phấn sẽ bị giảm sức sống và cho tỷ lệ tạo mô sẹo thấp (Nghiem Như Vân, 2002). Đối với giống lúa nếp Tú Lệ thì sự phát sinh mô sẹo chậm hơn bình thường, sau 6 tuần mới bắt đầu hình thành những mô sẹo nhỏ li ti và sau 8 tuần thì mô sẹo mới đạt kích thước 2 - 3 mm.

Kết quả cho thấy, tỷ lệ tạo mô sẹo ở môi trường CI2 có cao hơn môi trường CI1 nhưng không nhiều (Bảng 1). Xét về mặt hình thái thì mô sẹo trên môi trường CI1 sần chắc, còn trên môi trường CI2 mô sẹo tạo thành là những khối nhỏ rời rạc.

Bảng 1. Kết quả tạo mô sẹo từ bao phấn lúa nếp Tú Lệ.

Môi trường	Số bao phấn cấy	Số bao phấn tạo mô sẹo	Tỷ lệ tạo mô sẹo (%)
CI1	1920	138	7,18
CI2	6720	546	8,12

Khả năng tái sinh cây

Sau 4 - 6 tuần nuôi cấy trên môi trường tái sinh thì xác định tỷ lệ tái sinh cây (cả cây xanh và cây bạch tạng) từ mô sẹo và tỷ lệ cây xanh trong quần thể cây tái sinh. Kết quả được thể hiện trong bảng 2.

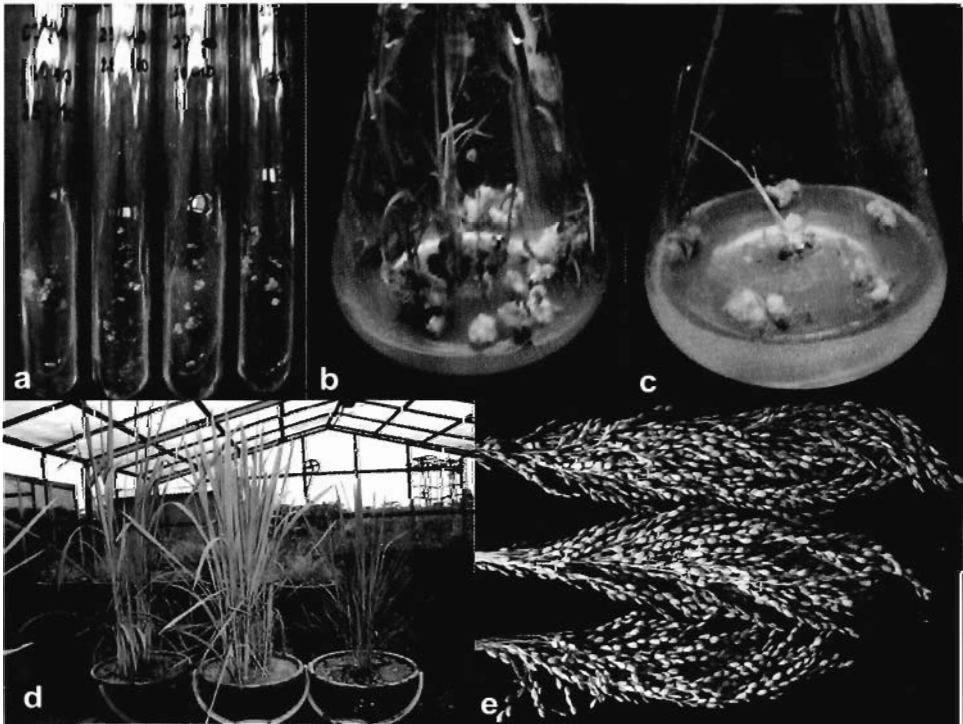
Thông thường tỷ lệ tái sinh cây xanh từ mô sẹo nuôi cấy bao phấn lúa là rất thấp và tỷ lệ cây bạch

tạng cao. Việc tạo thành những dòng đơn bội là thành công đầu tiên, nhờ đó có thể tạo ra dòng đồng hợp tử trong thời gian ngắn trái với phương pháp lai ngược truyền thống (Morrison, Evans; 1988).

Kết quả nghiên cứu cho thấy, tỷ lệ mô sẹo tái sinh cây và tỷ lệ cây xanh trong quần thể tái sinh cây là khá cao ở cả hai loại môi trường tạo mô sẹo, tỷ lệ này ở môi trường CI1 (60,87%) cao hơn hẳn môi trường CI2 (cao hơn gần 2 lần). Môi trường sử dụng để tái sinh cây là như nhau, điều này chứng tỏ mô sẹo tạo ra trên môi trường CI1 cho khả năng tái sinh cây vượt trội so với môi trường CI2. Như vậy nên sử dụng môi trường CI1 để tạo mô sẹo từ bao phần lúa Tú Lệ trong các nghiên cứu tiếp theo.

Sáu mươi bảy dòng cây xanh tái sinh sau đó được đưa ra trồng trong xô tại nhà lưới. Trong đó 45 dòng kết hạt, với độ hữu thụ là 67,16%, còn lại 22 dòng bất thụ hoàn toàn. Dựa theo đặc điểm hình thái của những cây lúa có mức bội thể khác nhau mà Nghiêm Như Vân và đồng tác giả (1999) đã công bố thì những dòng bất thụ này là dòng đơn bội.

Nhiều công trình nghiên cứu cho thấy, những cây tái sinh từ nuôi cấy bao phần lúa chủ yếu là cây lưỡng bội và đơn bội, còn các cây đa bội và lệch bội thường ít gặp và đôi khi không có (Nghiêm Như Vân *et al.*, 1999). Chỉ có những cây lưỡng bội mới có khả năng kết hạt bình thường, các cây đơn bội và đa bội thường bất thụ hạt hoàn toàn. Điều đáng quan tâm là tỷ lệ cây tự lưỡng bội ở lúa khoảng trên 50%. Nguyên nhân là do sự đa bội hóa tự phát có thể xảy ra ở giai đoạn đầu của quá trình hình thành mô sẹo dẫn đến sự có mặt của các tế bào đa bội trong khối mô sẹo đơn bội, mức đơn bội là thấp nhất nên dễ dẫn đến nhân đôi số lượng NST để trở về trạng thái lưỡng bội bình thường (Nghiêm Như Vân *et al.*, 1993). Tuy rất khó phân biệt giữa cây tự lưỡng bội và cây lưỡng bội bình thường tái sinh từ mô sẹo được hình thành từ tế bào soma ở thành bao phần, nhưng theo đặc điểm hình thái thì cây tự lưỡng bội ở thế hệ đầu sau khi được tái sinh từ bao phần thường nhỏ bé hơn cây lưỡng bội bình thường (Nghiêm Như Vân *et al.*, 1999). Những dòng hữu thụ hạt sau đó tiếp tục duy trì trong các thế hệ tiếp theo để xác định độ thuần.



Hình 1. Nuôi cấy bao phần và tái sinh cây ở lúa nếp Tú Lệ. a: mô sẹo tạo thành từ phần lúa trên môi trường CI2; b: sự tái sinh cây trên môi trường PR của mô sẹo hình thành trên môi trường CI1; c: sự tái sinh cây trên môi trường PR của mô sẹo hình thành trên môi trường CI2; d: những dòng lúa có mức bội thể khác nhau được trồng ở nhà lưới; e: bông của một số dòng lúa nhận được từ nuôi cấy bao phần.

Bảng 2. Tỷ lệ cây tái sinh của mô sẹo được nuôi cấy từ bao phần lúa nếp Tú Lệ.

Môi trường		Số mô sẹo cây	Số mô sẹo tái sinh cây	Số mô sẹo tái sinh cây xanh	Số mô sẹo tái sinh cây bạch tạng	Tỷ lệ tái sinh cây (%)	Tỷ lệ cây xanh (%)
Tạo mô sẹo	Tái sinh cây						
CI1	PR	138	84	20	64	60,87	23.8
CI2		546	168	19	149	30,76	11.3

Kết quả phân tích phân tử

Nói đến chất lượng lúa gạo là người ta quan tâm đến độ thơm, độ dẻo, hàm lượng amylose, hàm lượng protein. Nếp Tú Lệ có hương thơm nhẹ, hàm lượng protein trong gạo xát tương đối thấp so với Tám thơm và Nếp cái Hoa vàng, hàm lượng vitamin B1 khá cao. Hàm lượng amylopectin (quyết định độ dẻo) của nếp Tú Lệ khá cao (86 - 89%), độ phá hủy kiềm là 6 nên nếp Tú Lệ có nhiệt độ hồ hóa thấp (Hà Đình Tuấn, 2007).

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã sử dụng những gen liên quan đến chất lượng lúa gạo để phân tích di truyền về mặt phân tử, đồng thời sử dụng 4 giống lúa Tú Lệ được thu thập ở những địa điểm khác nhau để làm đối chứng. Trong đó, đặc biệt quan tâm đến là gen *Wx* (gen *waxy*) nằm trên NST số 6 mã hóa cho enzyme tổng hợp các chuỗi tinh bột, quyết định hàm lượng amylose, cặp mỗi *Wx* nhân đoạn gen *waxy* với kích thước 120 - 126 bp tùy theo số lần lặp lại của trình tự (CT)_n (n = 16, 17, 18, 19). Gen *Sbe* mã hóa cho enzyme phân nhánh tinh bột là enzyme quan trọng tham gia quá trình tổng hợp amylopectin, gen này nằm trên NST số 6, kích thước 191 - 206 bp (Bao *et al.*, 2002). Kết quả phân tích với 45 dòng hữu thụ hạt cho thấy, gen *Wx* cho 2 allele, allele đa hình nằm ở dòng số 40 và 41 (Hình 2) có thể do kết quả của quá trình đột biến trong nuôi cấy bao phần, cần chú ý theo dõi trong các thế hệ tiếp theo. Với gen *Sbe* chỉ cho 1 allele duy nhất, như vậy về mặt phân tử gen *Sbe* không có gì thay đổi (Hình 2).

Về tính trạng mùi thơm, Ahn và đồng tác giả (1992) đã sử dụng chỉ thị RFLP để nghiên cứu gen điều khiển tính trạng mùi thơm cây lúa và xác định được đó là một gen lặn ký hiệu *fgr* nằm trên NST số 8, liên kết chặt với marker RG28 với khoảng cách di truyền là 4,5 cM. Sau đó, nhiều tác giả đã cố gắng thiết kế primer của RG28 để ứng dụng trong chọn lọc giống lúa thơm. Nguyen Thi Lang, Bui Chi Bui

(2002) cũng xác định được 2 marker là RG28 và RM223 nằm trên NST số 8 liên kết với gen *fgr* với khoảng cách di truyền tương đối gần là 1,6 và 1,8 cM. Với 2 chỉ thị RG28 và RM223 mà chúng tôi đã sử dụng kết quả chỉ cho một allele duy nhất và không có sự khác biệt giữa các dòng lúa nghiên cứu. Tuy nhiên tính trạng mùi thơm chịu ảnh hưởng của điều kiện môi trường rất mạnh mẽ, ví dụ như giống Tám thơm chỉ biểu hiện mùi thơm khi được trồng ở đồng bằng sông Hồng và mất mùi thơm khi trồng ở đồng bằng sông Cửu Long, vì vậy cần có những nghiên cứu sâu hơn để đưa ra kết luận chính xác.

Kết quả với các SSR RM72, RM238, RM302, RM252 cũng chỉ cho 1 allele. Như vậy, với một số chỉ thị liên quan đến chất lượng mà chúng tôi sử dụng với những dòng nhận được từ nuôi cấy bao phần thì chỉ có gen *Wx* là cho phân đoạn đa hình, có thể hàm lượng amylose ở những dòng mang phân đoạn đa hình này sẽ thay đổi. Trong các thế hệ tiếp theo cần tiếp tục theo dõi độ thuần, chọn lọc ra những dòng có ưu điểm về mặt hình thái và tiến hành phân tích các chỉ tiêu sinh hóa để chọn được dòng thuần đạt tiêu chuẩn về mặt năng suất và có chất lượng vượt trội.

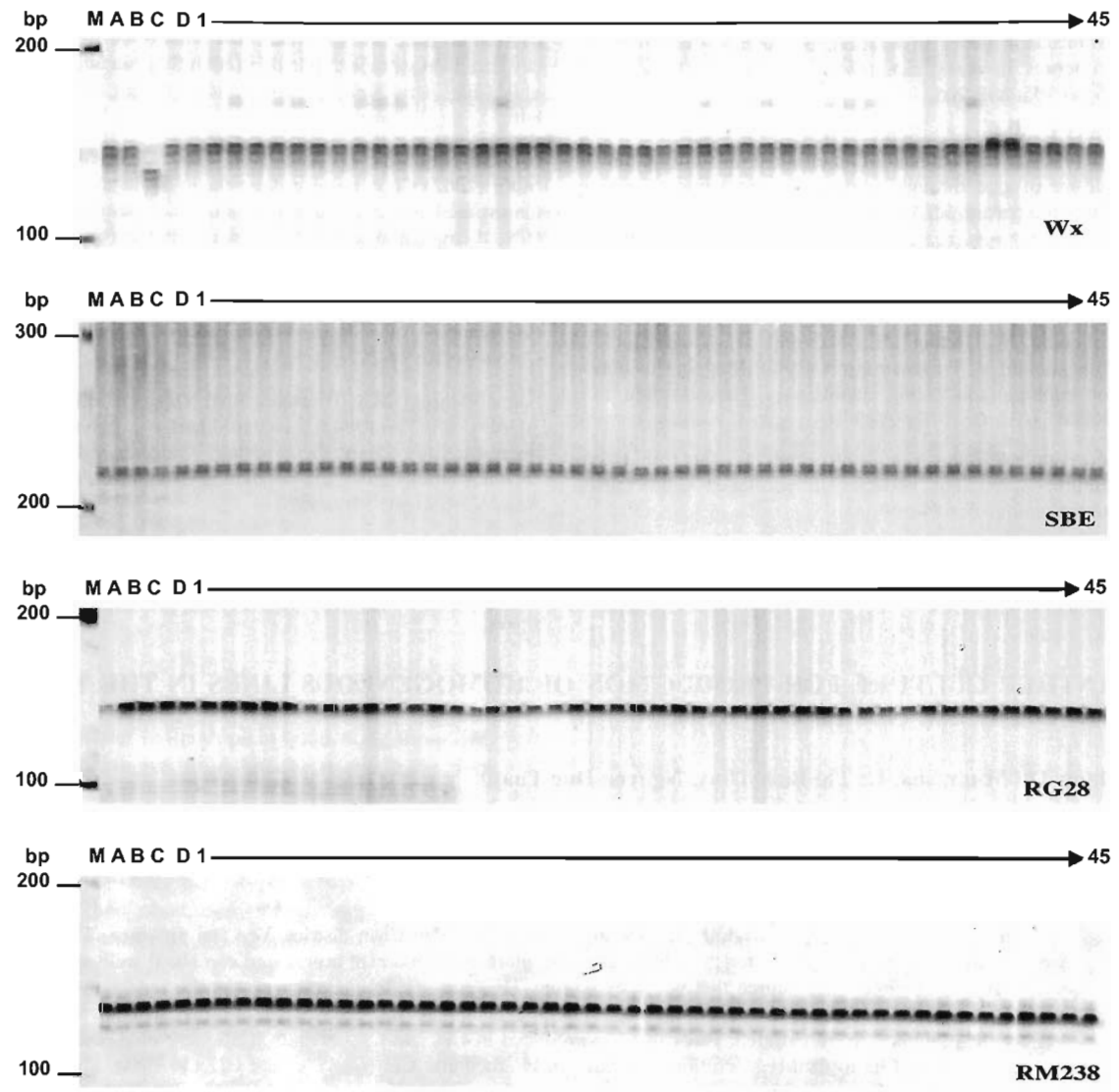
KẾT LUẬN

Chúng tôi đã tiến hành nuôi cấy 8640 bao phần, kết quả tạo được 684 mô sẹo cấy chuyển sang môi trường tái sinh cây, trong đó có 39 dòng mô sẹo tái sinh cây xanh. Kết quả thu được 67 dòng cây xanh (tách ra từ 39 dòng mô sẹo tái sinh cây xanh) trồng tại nhà lưới, 45 dòng hữu thụ chiếm tỷ lệ 67,16%, còn lại 22 dòng đơn bội bất thụ hạt.

Kết quả phân tích phân tử với 45 dòng hữu thụ cho thấy, chỉ có gen *Wx* quyết định hàm lượng amylose cho 2 allele, allele đa hình nằm ở dòng số 40 và 41. Như vậy, các dòng nhận được từ nuôi cấy bao phần không có biến động đáng kể ở các locus kiểm tra

tính trạng chất lượng. Những dòng này sẽ được tiếp tục duy trì để xác định độ thuần, chỉ tiêu nông sinh

học và phân tích đặc tính sinh lý, sinh hóa nhằm chọn ra dòng có ưu điểm về năng suất và chất lượng.



Hình 2. Điện di của một số mồi chất lượng trên gel polyacrylamide 5%. M: marker; A: Nếp Tú Lệ tuổi Nậm Lằng xã Nậm Cồ; B: Nếp Tú Lệ ruộng phục tráng; C: Nếp Tú Lệ xã Nghĩa Lợi 2 vụ; D: Nếp Tú Lệ xã Nghĩa Lợi 1 vụ; 1 - 45: Các dòng lúa hữu thụ hạt nhận được từ nuôi cấy bao phấn.

Lời cảm ơn: Công trình hoàn thành trong khuôn khổ của đề tài cấp Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam (2007 - 2008). Chúng tôi xin chân thành cảm ơn Viện Khoa học và Công nghệ Việt

Nam, Viện Công nghệ sinh học và Sở khoa học và Công nghệ tỉnh Yên Bái đã tạo điều kiện cũng như phối hợp hiệu quả trong quá trình thực hiện đề tài.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ahn SW, Bollich CN, Tanksley SD (1992). RFLP tagging of a gene for aroma in rice. *Theor Appl Genet* 87: 27-32.
- Bao JS, Corke H, Sun M (2002) Microsatellites in starch-synthesizing genes in relation to starch physicochemical properties in waxy rice (*Oryza sativa* L.). *Theor Appl Genet* 105: 898-905.
- Chu CC, Wang CC, Sun CS, Hsu C, Yin KC, Chu CY, Bi FY (1975) Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Sci Sin* 18: 659-668.
- Hà Đình Tuấn (2007) Nghiên cứu phục tráng và phát triển giống lúa đặc sản nếp Tú Lệ. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn* 2: 16-20.
- Lanceras JC, Huang ZL, Naivikul O, Vanavichit A, Ruanjaichon V, Tragoonrun S (2000) Mapping of genes for cooking and eating qualities in Thai Jasmine rice (KDML105). *DNA Res* 7: 93-101.
- Morrison RA, Evans DA (1988) Haploid plants from tissue culture: new plant varieties in shortened time frame. *Biotechnology* 6: 684-690.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15: 437-497.
- Nghiêm Như Vân, Lê Trần Bình, Lê Thị Muội, Lê Duy Thành (1993) Nghiên cứu tế bào học trong quá trình tạo cây đơn bội bằng phương pháp nuôi cấy bao phấn lúa *in vitro*. *Tạp chí Di truyền học và Ứng dụng* 2: 8-11.
- Nghiêm Như Vân, Lê Trần Bình, Lê Thị Muội (1999) Các cây lúa có mức bội thể khác nhau nhận được trong nuôi cấy bao phấn và một số đặc điểm hình thái của chúng. *Hội nghị Công nghệ Sinh học Toàn quốc, Hà Nội* 1999: 837-845.
- Nghiêm Như Vân, Lê Xuân Đắc, Lê Trần Bình, Lê Thị Muội (2002) Chọn tạo các dòng thuần ưu tú từ các dòng lúa ưu thế lai bằng phương pháp nuôi cấy bao phấn, Phần I: Nuôi cấy bao phấn các dòng lúa ưu thế lai. *Tạp chí Sinh học* 24: 44-49.
- Nguyen Thi Lang, Bui Chi Buu (2002) Identification and fine mapping of SSR marker linked to fgr gene of rice. *Omonrice* 10: 14-20.
- Saghai Maroof MA, Biyashev RM, Yang GP, Zhang Q, Alard RW (1994) Extraordinarily polymorphic microsatellite DNA in barley; Species diversity, chromosome location and population dynamics. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 5466-5470.
- Toojinda T, Tragoonrun S, Vanavichit A, Jantaboon J, Siangliw M (2004) Breeding super Jasmine rice. *The 1st International Conference on Proceeding: Rice for future* 81-94.

ANTHER CULTURE FOR PRODUCTION OF HOMOGENEOUS LINES IN THE TU LE TRADITIONAL GLUTINOUS RICE

Dang Thi Minh Lua, Le Thi Bich Thuy, Nguyen Duc Thanh*

Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

SUMMARY

Tu Le variety is a traditional glutinous rice in Tu Le valley, Van Chan district, Yen Bai province. This variety has many precious characteristics: high and long glutinosity, pleasant aroma and can stand well with stress. It is a precious gene source that needs exploiting. However its degeneration causes the reduction of quality and productivity. In this paper, the anther culture technique was applied for improvement of this variety. 8640 anthers were cultured, 684 cali were produced in CI1 and CI2 medium. Cali were obtained in both media gave a high plant regeneration frequency in PR medium: CI1 (60.87%) and CI2 (30.76%). Sixty seven green plant lines were transferred to green house. In these lines, 45 were seeded (67.16%) and 22 were haploids based on morphological appearance. The analyses of 45 seeded lines with 8 primer pairs related to amylose content and aroma showed that only waxy gene (*Wx*) encoded granule-bound starch synthase was altered in 2 lines. All 45 lines were homogeneous in 7 loci generated by remained 7 primer pairs. These lines will be maintained for further studies on homogeneity and stable agronomic characteristics.

Keywords: Anther culture, grain quality, homogeneous line, Tu Le glutinous rice, varietal improvement

* Author for correspondence: Tel: 84-4-38363470; E-mail: ndthanh127@yahoo.com