

KẾT QUẢ CHỌN TẠO DÒNG BẤT DỤC ĐƯỢC DI TRUYỀN NHÂN MẮN CẢM NHIỆT ĐỘ (TGMS) VÀ CÓ MÙI THƠM

Nguyễn Văn Mười*, Phạm Thị Ngọc Yến, Trần Văn Quang, Nguyễn Thị Trâm

Viện Nghiên cứu và Phát triển cây trồng, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

Email : nvmuoi198@gmail.com*

Ngày gửi bài: 19.03.2015

Ngày chấp nhận: 01.12.2015

TÓM TẮT

Các dòng bất dục được chọn phân ly từ tổ hợp lai giữa 03 dòng mẹ T1S-96, T7S, T23S và 04 dòng bố Bắc thơm 7 (BT7), Basmati 370, Hoa sữa và Hương cốm (HC) có kiểu bất dục từ không phần đến ít phần. Trong đó, các dòng bất dục lai tạo từ dòng mẹ T1S-96 và T7S với các dòng bố mang gen lặn mẫn cảm nhiệt độ *tms5*, duy nhất dòng AT19 là con lai giữa T23S/Hoa sữa mang cả hai gen lặn mẫn cảm nhiệt độ *tms2* và *tms5*. Qua đánh giá sự chuyển hóa tinh dục đã xác định được các dòng bất dục mới là dòng bất dục được di truyền nhân mẫn cảm với nhiệt độ (TGMS). Thông qua ứng dụng chỉ thị phân tử bằng cặp mồi ESP và IFAP đã xác định được 22 dòng mới chọn mang gen *fgrfgr* đồng hợp tử thơm. Dòng AT30 không mang gen *fgr* nhưng vẫn có mùi thơm theo cảm quan. 5 dòng (AT1, AT5, AT9, AT24 và AT27) có thời gian sinh trưởng ngắn, số lá trên thân chính 14,0 lá, đẻ nhánh gọn, hạt dài, lá và nội nhũ có mùi thơm điểm 4-5, ngưỡng chuyển đổi tính dục 24°C, tỷ lệ nhận phần ngoài cao.

Từ khóa: Ngưỡng chuyển đổi tính dục, mùi thơm, TGMS.

Development of Aromatic Thermo-sensitive Genic Male Sterile (TGMS) Lines

ABSTRACT

The aromatic thermo-sensitive genic sterile lines were selected from segregating populations of crosses between T1S-96 and T7S used as female and pollinators BT7, Basmati 370, Hoa sua and Huongcom using pedigree method of selection. These lines were of sterile type without pollen. All of 23 TGMS lines were genotyped with *tms5* while AT19 line had both *tms2* and *tms5* gene, 22 TGMS lines were genotyped with *fgrfgr* gene. Five lines (AT1, AT5, AT9, AT24 and AT27) had short growth duration and desirable phenotype. These lines showed good tillering capacity, violet stem andawn, and long grain. The leaves and endosperm of these lines possessed aromatic smell. The critical sterility inducing point (CSIP) of these line are 24°C with high outcrossing rate.

Keywords: Aroma, critical sterility Inducing point (CSIP), Thermo-sensitive genic male sterile (TGMS).

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Sau hơn 24 năm nghiên cứu, các nhà khoa học Việt Nam đã chọn tạo thành công 26 dòng bất dục (CMS, TGMS) và đã tạo được nhiều tổ hợp lai phục vụ cho sản xuất. Một số dòng TGMS đã được khai thác để phát triển lúa lai hai dòng như: dòng mẹ T1S-96 (mẹ của các tổ hợp lai TH3-3, TH3-4, TH3-5), dòng 103S (mẹ tổ hợp lai VL20, VL24), dòng T7S (mẹ của các tổ hợp lai TH7-2, TH8-3, TH7-5)...(Nguyễn Thị Trâm,

2010). Tuy nhiên, các giống lúa lai hai dòng được chọn tạo theo hướng chất lượng cao, đặc biệt là gạo có mùi thơm còn ít do số lượng dòng TGMS cũng như dòng cho phần (R) chất lượng cao và có mùi thơm còn hạn chế.

Fitzgerald et al. (2008) khẳng định 2-AP (2-acetyl-1- pyroline) đều có ở cả gạo và cơm của các giống lúa thơm. Theo Bai De-lang et al. (2008), cải tiến chất lượng hạt lúa lai liên quan đến tính thơm là một vấn đề khó trong chương trình chọn tạo giống lúa vì đa phần tính thơm

đều do gen lặn qui định và hạt gạo thương phẩm là hạt F2. Do vậy để có giống lúa lai thơm cần tạo ra các dòng bố mẹ thơm. Li CunLong et al. (2008) cho rằng để chọn tạo được giống lúa lai thơm có năng suất cao, hạt mềm, có mùi thơm cần đánh giá, chọn lọc bố mẹ thơm vì mùi thơm được điều khiển bởi đơn gen lặn.

Bradbury et al. (2005a) đã phát hiện ở các giống lúa thơm như Basmati và Jasmine có gen mã hoá cho enzyme Betaine aldehyde dehydrogenase 2 (BAD2) nằm trên NST số 8. Gen này bị đột biến mất 8 bp và có sự đa hình nucleotide đơn (SNPs) tại 3 vị trí trên Exon 7, dẫn đến dịch chuyển khung đọc mở và làm thay đổi chức năng của BAD2. Theo đó các giống lúa thơm đều có BAD2 bị mất chức năng và các giống lúa không thơm thì có gen mã hoá BAD2 hoạt động bình thường. Bằng việc sử dụng một số chỉ thị SSR liên kết như L02, L06, gen *fgr* được xác định nằm trên NST số 8, có độ dài khoảng 69 kb (Chen et al., 2006). Dựa trên thông tin về trình tự của đoạn gen *fgr* đã được đưa ra, Bradbury et al. (2005b) đã thiết kế 4 mỗi ESP, EAP, IFAP và INSP trong phản ứng PCR để khuếch đại trực tiếp vùng gen này. Theo kỹ thuật chỉ thị này, mỗi IFAP khuếch đại vùng gen thơm *fgr* với dải băng 257 bp, mỗi INSP khuếch đại vùng gen không thơm với dải băng là 355 bp, 2 mỗi ESP và EAP khuếch đại cả vùng gen thơm và không thơm với dải băng khoảng 580 bp.

Cho đến nay, có 9 gen *tms* được xác định bởi các nhà khoa học Trung Quốc, Nhật Bản, IRRI, Việt Nam và Ấn Độ. Gen *tms1* trên NST số 8, *tms2* trên NST số 7, *tms3* trên NST số 6, *tms4-1* trên NST số 2, *tms5* trên NST số 2, *rtms1* trên NST số 10, *ms-h* trên NST số 9, *tms6* trên NST số 5 và *tms8* trên NST số 11 (Wang et al., 1995; Lopez et al., 2003; Subudhi et al., 1997; Dong et al., 2000; Wang et al., 2003; Jia et al., 2001; Koh et al., 1999; Lee et al., 2005; Appibhai et al., 2012; Vu Thi Thu Hien et al., 2015).

Nhóm nghiên cứu đã tiến hành lai một số dòng TGMS đang sử dụng phổ biến ở Việt Nam với một số dòng, giống lúa thuần có mùi thơm, nhằm chọn lọc được ở thế hệ phân ly các dòng

TGMS mang đặc điểm nông sinh học, đặc điểm tính dục tốt và có mùi thơm để tạo giống lúa lai hai dòng chất lượng cao, gạo có mùi thơm. Trong bài báo này, chúng tôi trình bày kết quả chọn tạo một số dòng TGMS thơm, xác định gen điều khiển tính bất dục mã cảm với nhiệt độ và tính thơm của các dòng này.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu nghiên cứu

- Ba dòng TGMS: T1S-96; T7S và T23S, trong đó T1S-96 và T7S không thơm, T23S thơm nhẹ.

- Bốn dòng, giống lúa thuần thơm có nguồn gốc khác nhau: Bắc thơm 7 (BT7, Trung Quốc); Basmati 370 (Ấn Độ), Hoa sữa (Mỹ) và Hương cốm (HC, Viện Nghiên cứu và Phát triển cây trồng chọn tạo).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Lai và chọn lọc: Lai hữu tính thực hiện ở vụ Mùa 2008 và chọn lọc theo qui trình mô tả ở hình 1. Đánh giá, chọn cá thể bất dục đực và thơm gieo ở vụ Mùa. Kiểm tra tính dục bằng phương pháp hiển vi quang học (lấy bao phấn nhuộm trong dung dịch I-KI 1%, soi trên kính hiển vi), chọn những cá thể có phấn bất dục 100% (Yuan et al., 1995). Đánh giá thơm trên lá theo phương pháp của Sood và Siddip (1978) và cho điểm theo thang điểm của IRRI (2002), cụ thể: Điểm 0: Không thơm; Điểm 1: Thơm nhẹ; Điểm 2: Thơm. Đánh giá mùi thơm của nội nhũ và cho điểm theo phương pháp Kibria et al. (2008): Điểm 1: Không thơm, điểm 2: Thơm nhẹ, điểm 3: Thơm, điểm 4: Thơm đậm. Duy trì cây bất dục bằng nhân chết ở vụ Thu đông. Sàng lọc cá thể bất dục có ngưỡng chuyển đổi tính dục ở vụ Xuân 2012. Đánh giá ngưỡng chuyển đổi tính dục trong buồng khí hậu nhân tạo, giai đoạn xử lý khi lúa phân hóa đòng ở bước 5, nhiệt độ xử lý trung bình là 24°C/ngày (Nguyễn Thị Trâm và cs., 2006). Thời gian xử lý là 8 ngày (Mou, 2000). Chế độ xử lý cụ thể như bảng 1.

Thí nghiệm đánh giá tỷ lệ hữu dục hạt phấn của các dòng bất dục đực được bố trí ở vụ Xuân và

vụ Mùa 2012. Thí nghiệm được bố trí theo khối ngẫu nhiên, 3 lần nhắc lại, diện tích ô là 10m²/dòng/thời vụ. Đánh giá tính dục theo Yuan et al. (1995). Công thức thí nghiệm như bảng 2.

Đánh giá đặc điểm nông sinh học, đặc điểm hình thái, sâu bệnh và năng suất theo phương pháp của Viện Nghiên cứu lúa quốc tế (IRRI, 2002).

Bảng 1. Nhiệt độ, ánh sáng và độ ẩm trong xử lý ngưỡng của các dòng TGMS

STT	Thời gian (Bắt đầu-kết thúc)	Nhiệt độ (°C)	Cường độ ánh sáng (lux)	Độ ẩm (%)
1	6h01'-9h00'	21	25.000	80
2	9h01'-12h00'	24	35.000	80
3	12h01'-15h00'	27	35.000	80
4	15h01'-18h00'	30	35.000	80
5	18h01'-21h00'	27	0	80
6	21h01'-24h00'	24	0	80
7	00h01'-3h00'	21	0	80
8	3h01'-6h00'	18	0	80

TB = 24°C

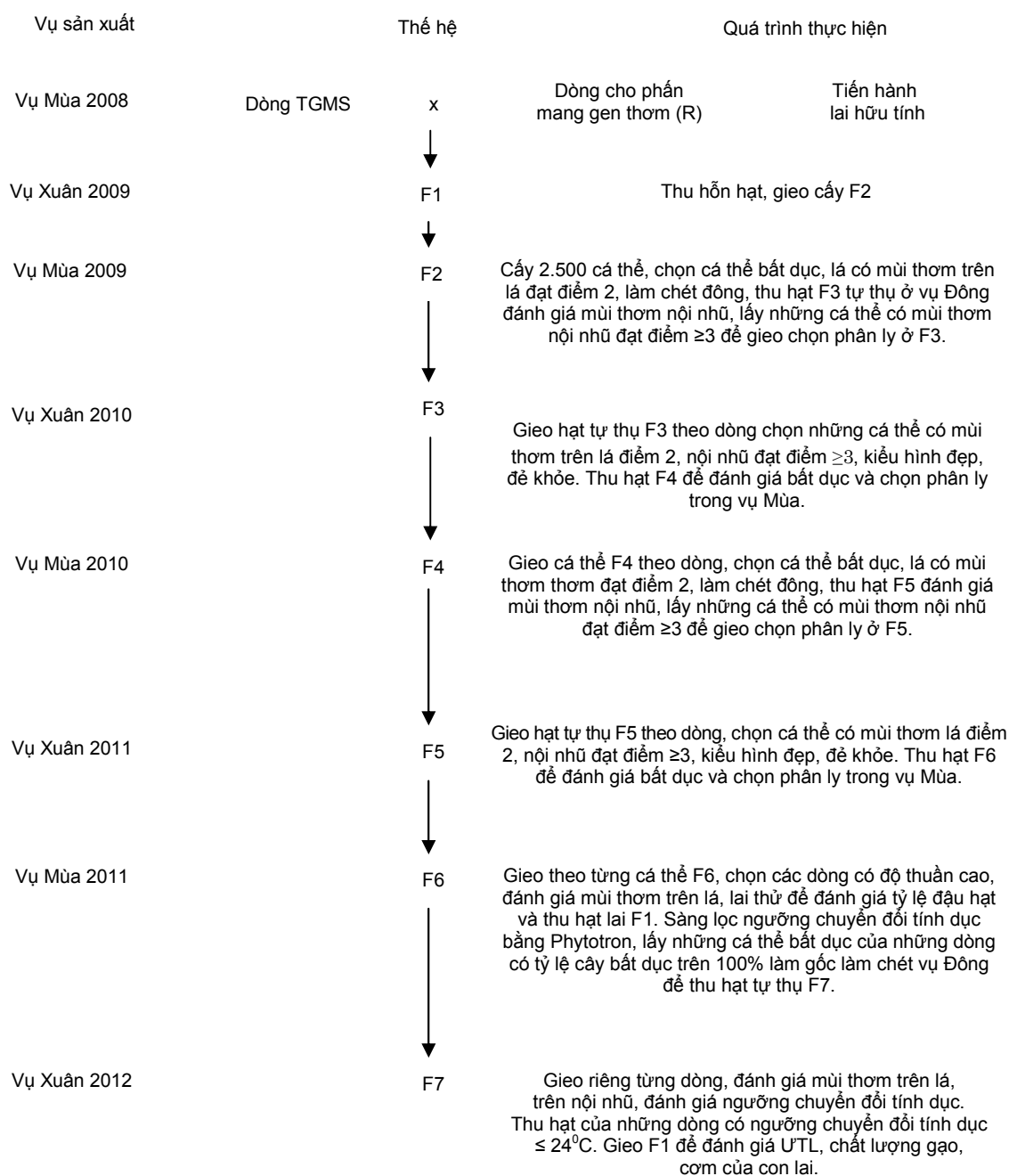
Bảng 2. Công thức thí nghiệm trong nghiên cứu

STT	Vụ Xuân		STT	Vụ Mùa	
	Thời vụ	Ngày gieo		Thời vụ	Ngày gieo
1	TV1	7/12	6	TV6	16/6
2	TV2	14/12	7	TV7	21/6
3	TV3	21/12	8	TV8	26/6
4	TV4	28/12	9	TV9	1/7
5	TV5	4/1	10	TV10	6/7

Bảng 3. Nguồn gốc các dòng TGMS trong nghiên cứu

TT	Tên dòng	Nguồn gốc (mẹ/bố)	TT	Tên dòng	Nguồn gốc (mẹ/bố)
1	AT1	T1S-96/BT7	14	AT17	T7S/Hoa sữa
2	AT2	T1S-96/BT7	15	AT18	T7S/Hoa sữa
3	AT3	T1S-96/BT7	16	AT19	T23S/Hoa sữa
4	AT5	T7S/BT7	17	AT21	T1S-96/HC
5	AT6	T7S/BT7	18	AT23	T1S-96/HC
6	AT7	T1S-96/Basmati	19	AT24	T1S-96/HC
7	AT8	T1S-96/Basmati	20	AT25	T1S-96/HC
8	AT9	T1S-96/Basmati	21	AT27	T7S/HC
9	AT10	T7S/Basmati	22	AT29	T7S/HC
10	AT11	T7S/Basmati	23	AT30	T7S/HC
11	AT12	T7S/Basmati	24	T1S-96	TGMS-24/Japonica 5
12	AT15	T1S-96/Hoa sữa	25	T7S	T1S-96/Hương 125S
13	AT16	T1S-96/Hoa sữa	26	T23S	T2S/Hương 125S

Kết quả chọn tạo dòng bất dục đực di truyền nhân mã cảm nhiệt độ (TGMS) và có mùi thơm



Hình 1. Quá trình lai tạo chọn lọc dòng TGMS thơm

Quy trình PCR phát hiện gen thơm: ADN được tách chiết theo phương pháp CTAB của Doyle and Doyle (1990) có cải tiến. Nghiền 0,5 g lá với 800 μl CTAB buffer bằng chày cối sứ đến khi dung dịch có màu xanh xuất hiện. Chuyển dung dịch sang ống eppendorf, bổ sung thêm 56 μl SDS 10%, lắc đều. Ủ mẫu ở 65°C trong bể ổn

nhiệt 60 phút, để nguội ở nhiệt độ phòng. Bổ sung 800 μl hỗn hợp chloroform: isoamylalcohol (24:1), lắc nhẹ tới khi thành dạng nhũ sữa, ly tâm ở 13.000 vòng/phút, 5 phút, 4°C . Hút dịch nổi chuyển sang ống eppendorf mới, bổ sung 800 μl hỗn hợp chloroform: isoamylalcohol (24:1), ly tâm ở 13.000 vòng/phút, trong 5 phút, 4°C . Thu

Bảng 4. Các chỉ thị phân tử ADN liên kết với gen mùi thơm *fgr*

Gene	Chỉ thị	Trình tự môi	Kích cỡ	Tài liệu tham khảo
<i>fgr</i>	BADH2	ESP: 5'-TTGTTTGGAGCTTGCTGATG-3'	580	Bradbury et al., 2005b
		IFAP: 5'CATAGGAGCAGCTGAAATATATACC-3'	257	

Bảng 5. Tên, trình tự và nhiệt độ gắn của các marker sử dụng trong phản ứng PCR

Gene	Chỉ thị	Môi xuôi	Môi ngược	Nhiệt độ gắn môi	Tài liệu tham khảo
<i>tms1</i>	OPB-19 (TGMS1.2)	ACCCCGAAG		33°C	Wang, 1995
<i>tms2</i>	RM11	TCTCCTCTCCCCGATC	ATAGCGGGCGAGGCTTAG	50°C	Lopez, 2003
<i>tms3</i>	F18F/F18RM	TTCCCGGTTCC ACTAGGAT	GCGGACCGTGAAGCTGGGG	53°C	Lang, 1999
<i>tms4</i>	RM257	CCGTGCAACTTAAATCCAAACAGG	GGAATCTATATGAGCCAGTGATGG	52°C	Reddy, 2000
<i>tms5</i>	C365-1	ATTTTGGTTGCGCATTAGAGG	GAATATGCCAAGTACGGAGGAT	52°C	Yang, 2007
<i>tms6</i>	RM3351	GTCGAAACGTAGCCAGGCAATGG	CCATGGAAGGAATGGAGGTGAGG	55°C	Lee, 2005

dịch nổi sang ống eppendorf, kết tủa ADN bằng isopropanol với tỉ lệ 1:1 (v/v). Để trong tủ lạnh sâu trong 1h. Ly tâm 13.000 vòng/phút, 5 phút, 4°C. Rửa kết tủa ADN bằng ethanol 70%. Làm khô ADN ở nhiệt độ phòng. Hòa tan ADN bằng nước cất 2 lần (khoảng 200 µl). ADN đã tách chiết được kiểm tra độ nguyên vẹn trên gel agarose 1%. Phản ứng PCR: Mỗi phản ứng PCR 25 µl bao gồm: 8,2 µl nước cất hai lần khử ion; 1,5 µl đệm PCR 10X + MgCl₂ 25 mM; 0,5 µl dNTPs 10 mM; 0,8 µl Taq DNA polymerase 1 U/µl; 3 µl môi xuôi 5 µM + môi ngược 5 µM; 1,0 µl DNA 10 ng/µl. Chương trình PCR trên máy Bio-rad 9800: 95°C-5 phút; 35 chu kỳ (95°C-30 giây; 58°C-1 phút; 72°C-1,5 phút); 72°C-5 phút; giữ mẫu ở 4°C. Điện di sản phẩm PCR: Sản phẩm PCR được điện di bằng máy điện di mao quản và điện di trên gel agarose 2%, thang chuẩn (ladder) 100 bp với hiệu điện thế 100 V, thời gian 40 phút, bản gel được nhuộm bằng Ethidium bromide 0,5 µg/ml trong 30 phút, hình ảnh được phân tích trên máy chụp hình gel (gel DOC). Chỉ thị BADH2 để kiểm tra gen thơm cụ thể ở bảng 4.

Quy trình PCR để xác định gen *tms* theo De la Cruz, (1997): Tách chiết ADN theo qui trình CTAB rút gọn. Sử dụng các cặp môi (Bảng 5) tương ứng với các gen với IR24 làm đối chứng âm. Chu trình nhiệt cho PCR: 94°C trong 2 phút

và 30 chu kỳ: 94°C trong 5 giây, 33-55°C trong 30 giây, 72°C trong 30 giây và 72°C trong 7 phút. Điện di: sản phẩm chạy PCR được điện di trên gel agarose 4%, 100 V trong 60 phút và nhuộm với Ethidium Bromide 0,5 µg/ml sau đó quan sát bằng máy soi gel UV, thang chuẩn (ladder) 100 bp. Các chỉ thị trong bảng 4 bao gồm: 1 chỉ thị RAPD (OPB19), 1 chỉ thị STS (F18F/F18RM) và 4 chỉ thị SSR (RM11, RM257, C365-1 và RM3351).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Nguồn gốc và đặc điểm của một số dòng bất dục mới chọn tạo

3.1.1. Thời gian từ gieo đến trở, kiểu bất dục và mùi thơm của các dòng TGMS

Sau quá trình chọn lọc và đánh giá đã chọn được 23 dòng bất dục mới có mùi thơm lá điểm 1 (thơm nhẹ) đến điểm 2 (thơm) và nội nhũ từ điểm 2 (thơm nhẹ) đến điểm 4 (thơm đậm) và bất dục rất tốt. Các dòng bất dục mới có thời gian từ gieo đến trở ở vụ Xuân tương đương với các dòng mẹ ban đầu, nhưng vụ Mùa ngắn hơn. Chúng tôi đã tiến hành đánh giá để xác định gen kiểm soát tính thơm (*fgr*) và gen (*tms*) của 23 dòng bất dục mới và 3 dòng mẹ tương ứng. Kết quả được trình bày ở bảng 6.

Kết quả chọn tạo dòng bất dục đực di truyền nhân mãn cảm nhiệt độ (TGMS) và có mùi thơm

Bảng 6. Thời gian từ gieo đến trổ, đặc điểm tính dục và mùi thơm của các dòng TGMS trong vụ Mùa 2011 và Xuân 2012

Tên dòng	Thời gian từ gieo đến trổ (ngày)		Kiểu bất dục (Mùa 2011)	Mùi thơm (Xuân 2012, điểm)	
	Mùa 2011	Xuân 2012		Lá	Nội nhũ
AT1	65	102	Bất dục không phấn	2	4
AT2	72	102	Bất dục không phấn	2	4
AT3	76	105	Bất dục ít phấn	2	4
AT5	68	103	Bất dục không phấn	2	4
AT6	75	101	Bất dục ít phấn	2	3
AT7	71	102	Bất dục ít phấn	2	3
AT8	75	102	Bất dục không phấn	2	2
AT9	81	105	Bất dục không phấn	2	4
AT10	79	103	Bất dục không phấn	2	2
AT11	82	105	Bất dục ít phấn	1	2
AT12	72	102	Bất dục ít phấn	1	3
AT15	81	101	Bất dục không phấn	2	2
AT16	75	101	Bất dục ít phấn	2	2
AT17	78	102	Bất dục không phấn	2	2
AT18	84	105	Bất dục ít phấn	1	3
AT19	74	101	Bất dục không phấn	2	3
AT21	82	102	Bất dục không phấn	2	3
AT23	77	105	Bất dục ít phấn	2	2
AT24	68	101	Bất dục không phấn	2	4
AT25	75	102	Bất dục ít phấn	2	2
AT27	68	101	Bất dục không phấn	2	4
AT29	74	103	Bất dục ít phấn	1	3
AT30	78	100	Bất dục không phấn	1	2
T1S-96	85	102	Bất dục không phấn	0	1
T7S	84	105	Bất dục không phấn	0	1
T23S	76	97	Bất dục ít phấn	1	3

Ghi chú: AT - Aromatic TGMS line - dòng TGMS thơm. Vụ Mùa 2011 là thế hệ F6; vụ Xuân 2012 là thế hệ F7.

3.1.2. Xác định gen quy định tính thơm và tính dục của các dòng TGMS

Chỉ thị BADH2 phát hiện gen *fgr* đồng hợp tử với 2 vạch băng 580 bp + 257 bp, dị hợp tử với 3 vạch băng 580 bp + 355 bp + 257 bp và không có gen *fgr* với 2 vạch băng 355 bp + 580 bp. Kết quả phân tích gen thơm của tập đoàn vật liệu lúa thơm được đưa ra trong bảng 5 cho thấy có 22 dòng mới chọn mang gen *fgrfgr* đồng hợp tử thơm. Dòng AT30 không mang gen *fgr* nhưng vẫn có mùi thơm theo cảm

quan. Dòng mẹ T23S cũng mang gen thơm *fgrfgr* nhưng các con lai chọn tạo và đánh giá có mùi thơm nhẹ. Sử dụng các cặp môi ở bảng 4 để kiểm tra sự hiện diện của gen *tms* ở 23 dòng bất dục đực mới và ba dòng ban đầu nhận thấy: hai dòng T1S-96 và T7S mang gen *tms5* và gen này đã chuyển qua con lai ổn định ở thế hệ F7. Dòng T23S mang hai gen *tms2* và *tms5* và cũng chuyển được qua con lai (T23S/Hoa sữa) ở dòng AT19 (Bảng 7 và Hình 2, 3, 4).

Bảng 7. Kết quả xác định gen kiểm soát tính thơm, gen quy định tính dục của các dòng TGMS

TT	Tên dòng	Kết quả xác định gen thơm		Kết quả xác định gen <i>tms</i>
		Đồng hợp tử <i>fgrfgr</i> (thơm)	Dị hợp tử <i>Fgrfgr</i> (không thơm)	
1	AT1	+	-	<i>tms5</i>
2	AT2	+	-	<i>tms5</i>
3	AT3	+	-	<i>tms5</i>
4	AT5	+	-	<i>tms5</i>
5	AT6	+	-	<i>tms5</i>
6	AT7	+	-	<i>tms5</i>
7	AT8	+	-	<i>tms5</i>
8	AT9	+	-	<i>tms5</i>
9	AT10	+	-	<i>tms5</i>
10	AT11	+	-	<i>tms5</i>
11	AT12	+	-	<i>tms5</i>
12	AT15	+	-	<i>tms5</i>
13	AT16	+	-	<i>tms5</i>
14	AT17	+	-	<i>tms5</i>
15	AT18	+	-	<i>tms5</i>
16	AT19	+	-	<i>tms2; tms5</i>
17	AT21	+	-	<i>tms5</i>
18	AT23	+	-	<i>tms5</i>
19	AT24	+	-	<i>tms5</i>
20	AT25	+	-	<i>tms5</i>
21	AT27	+	-	<i>tms5</i>
22	AT29	+	-	<i>tms5</i>
23	AT30	-	-	<i>tms5</i>
24	T1S-96	-	-	<i>tms5</i>
25	T7S	-	-	<i>tms5</i>
26	T23S	+	-	<i>tms2;tms5</i>



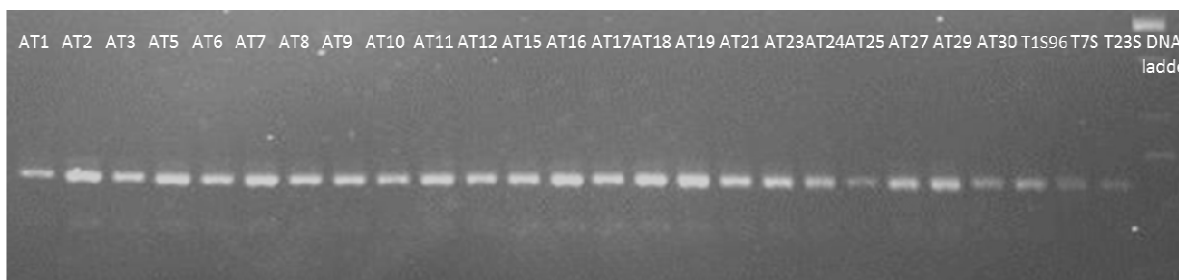
Hình 2. Điện di sản phẩm PCR phát hiện gen thơm *fgr* bằng cặp mồi ESP và IFAP

Ghi chú: Giếng 27: size marker 1.000 bp

Kết quả chọn tạo dòng bất dục đực di truyền nhân mãn cảm nhiệt độ (TGMS) và có mùi thơm



Hình 3. Điện di sản phẩm PCR phát hiện gen *tms2* bằng chỉ thị RM11



Hình 4. Điện di sản phẩm PCR phát hiện gen *tms5* bằng chỉ thị C365-1

3.1.3. Sàng lọc cá thể của các dòng bất dục đực trong điều kiện nhân tạo

Kết quả đánh giá ngưỡng chuyển đổi tính dục trong Phytotron cho thấy: số lượng cá thể đưa vào xử lý là 50 cá thể trên dòng, thời gian bắt đầu đưa cây vào xử lý cho đến khi trở từ 12-16 ngày. Số lượng cá thể theo dõi là 50 cá thể trên dòng. Có 18/26 dòng TGMS có tỷ lệ cây bất dục 100%, trong đó có 8 dòng đạt tỷ lệ hạt phấn bất dục 100%, kiểu bất dục từ không phấn cho đến ít hạt phấn. Trong 8 dòng này có 5 dòng là các dòng TGMS mới chọn tạo như: AT1; AT5; AT9; AT24 và AT27, 3 dòng còn lại là các dòng đã sử dụng làm vật liệu lai. Cây đối chứng được đánh giá ở điều kiện tự nhiên bất dục hoàn toàn.

3.1.4. Đánh giá sự chuyển đổi tính dục của các dòng TGMS trong điều kiện tự nhiên

Kết quả theo dõi quá trình chuyển đổi tính dục của các dòng TGMS ở bảng 8 cho thấy: Ở vụ Xuân tỷ lệ hạt phấn hữu dục trên 80% từ ngày 2/4 đến ngày 17/4, nhiệt độ trung bình ở thời kỳ cảm ứng từ 17,2-22,3°C. Khi nhiệt độ ở thời kỳ cảm ứng tăng từ 23,8°C đến 24,2°C, có

3 dòng bất dục hoàn toàn, tỷ lệ hạt phấn hữu dục là 0%. Ở vụ Mùa, các dòng TGMS bất dục hoàn toàn từ ngày 23/8 đến 16/9, nhiệt độ ở thời kỳ cảm ứng này biến động từ 26,4°C đến 31,4°C. Như vậy, các dòng TGMS mới có ngưỡng chuyển đổi từ hữu dục sang bất dục là 24°C và bất dục hoàn toàn ở nhiệt độ là 26°C. Điều này minh chứng thêm là 23 dòng bất dục đã chọn là dòng bất dục đực gen nhân mãn cảm với nhiệt độ (TGMS)

3.1.5. Đặc điểm nông sinh học của các dòng TGMS trong điều kiện vụ Xuân 2012

Kết quả đánh giá 5 dòng TGMS mới chọn tạo và 2 dòng mẹ của chúng cho thấy: Thời gian sinh trưởng trong điều kiện nhân dòng (vụ Xuân) từ 129 đến 132 ngày, tương đương với dòng T1S-96, ngắn hơn dòng T7S 3-6 ngày. Số lá trên thân chính của cả 5 dòng TGMS mới đều là 15 lá. Chiều cao cây của các dòng TGMS mới thuộc dạng trung bình, dễ nhánh khá, bông to dài, ít thoái hóa đầu bông, số hạt trên bông từ 159,8 đến 168,3 hạt, hạt thon dài, mủ trắng, mùi thơm trên lá đạt điểm 2, mùi thơm trên nội nhũ đạt điểm 4.

Bảng 8. Kết quả sàng lọc cá thể có ngưỡng nhiệt độ chuyển đổi tính dục $\leq 24^{\circ}\text{C}$ vụ Mùa 2011

Dòng số	Số cá thể xử lý	Cây bắt dục		Tỷ lệ hạt phấn bắt dục (%)	Số ngày từ khi đưa cây vào xử lý đến trở	Tình trạng cây đối chứng
		Số lượng	Tỷ lệ (%)			
AT1	50	50	100	100	13-15	Bắt dục
AT2	50	50	100	96,5	13-15	Bắt dục
AT3	50	50	100	92,8	13-15	Bắt dục
AT5	50	50	100	100	13-16	Bắt dục
AT6	50	50	98	82,7	12-16	Bắt dục
AT7	50	50	100	96,3	13-16	Bắt dục
AT8	50	50	100	94,8	13-16	Bắt dục
AT9	50	50	100	100	12-15	Bắt dục
AT10	50	50	96	90,4	13-16	Bắt dục
AT11	50	50	88	67,3	12-16	Bắt dục
AT12	50	50	92	85,7	13-16	Bắt dục
AT15	50	50	100	96,4	12-16	Bắt dục
AT16	50	50	100	98,2	12-15	Bắt dục
AT17	50	50	94	83,9	12-16	Bắt dục
AT18	50	50	90	71,2	12-16	Bắt dục
AT19	50	50	100	93,9	12-15	Bắt dục
AT21	50	50	100	91,5	12-16	Bắt dục
AT23	50	50	100	94,9	12-15	Bắt dục
AT24	50	50	100	100	13-16	Bắt dục
AT25	50	50	100	92,8	12-16	Bắt dục
AT27	50	50	100	100	13-15	Bắt dục
AT29	50	50	96	87,2	12-16	Bắt dục
AT30	50	50	93	83,8	13-16	Bắt dục
T1S-96	50	50	100	100	12-16	Bắt dục
T7S	50	50	100	100	13-15	Bắt dục
T23S	50	50	100	100	13-16	Bắt dục

Bảng 9. Tỷ lệ hữu dục hạt phấn của các dòng TGMS trong điều kiện vụ Xuân và vụ Mùa 2012

Ngày gieo	Thời kỳ cảm ứng (ngày/tháng)	Nhiệt độ thời kỳ cảm ứng ($^{\circ}\text{C}$)	Ngày theo dõi (trở)	AT1	AT5	AT9	AT24	AT27	T1S-96	T7S
7/12	12/3	17,3								
	13/3	19,7								
	14/3	20,3	24/3	83,7	85,4	76,5	81,3	79,6	85,3	84,8
	15/3	18,5								
	16/3	11,3								
	17/3	9,9	27/3	42,5	51,4	48,9	53,6	55,1	67,3	64,6
	18/3	11,4								
	19/3	14,9								
	20/3	17,9	30/3	58,2	63,4	59,2	68,7	63,2	72,1	69,3
	21/3	20,6								
14/12	22/3	21,0								
	23/3	17,6	2/4	85,9	82,7	85,4	80,7	81,5	83,9	79,2
	24/3	15,4								
	25/3	16,2								

Kết quả chọn tạo dòng bất dục đực di truyền nhân mãn cảm nhiệt độ (TGMS) và có mùi thơm

	26/3	16,6	5/4	87,3	81,6	83,2	84,5	82,7	85,9	82,9
	27/3	15,6								
21/12	28/3	16,6								
	29/3	16,9	8/4	73,4	69,6	73,5	75,9	71,5	80,6	73,7
	30/3	17,2								
	31/3	19,1								
	1/4	20,1	11/4	86,3	85,7	87,3	82,9	83,5	87,4	83,9
28/12	2/4	21,3								
	3/4	22,1								
	4/4	22,3	14/4	83,9	82,9	85,7	81,2	84,5	83,7	81,5
	5/4	19,9								
	6/4	19,7								
	7/4	20,9	17/4	87,9	86,2	84,9	88,2	81,3	88,7	83,2
	8/4	23,3								
4/1	9/4	23,1								
	10/4	23,0	20/4	44,2	46,1	52,7	40,3	49,8	37,2	52,7
	11/4	22,7								
	12/4	24,4								
	13/4	24,5	23/4	0	5,7	3,6	0	1,2	0	3,5
	14/4	24,2								
	15/4	23,8								
	16/4	24,8	26/4	5,6	11,9	7,2	2,6	2,9	2,4	9,3
	17/4	25,7								
	18/4	24,7								
16/6	19/4	25,0	29/4	0	3,2	4,5	0	0	0	2,6
	8/8	26,8								
	9/8	27,4								
	10/8	27,9	20/8	0	5,4	0	0	2,1	0	2,3
	11/8	29,8								
	12/8	30,1								
	13/8	28,0	23/8	0	0	0	0	0	0	0
	14/8	28,4								
	15/8	28,9								
21/6	16/8	30,5	26/8	0	0	0	0	0	0	0
	17/8	27,9								
	18/8	26,4								
	19/8	28,5	29/8	0	0	0	0	0	0	0
	20/8	29,0								
26/6	21/8	29,4								
	22/8	28,6	1/9	0	0	0	0	0	0	0
	23/8	28,3								
1/7	24/8	28,6								
	25/8	30,0	4/9	0	0	0	0	0	0	0
	26/8	30,9								
	27/8	31,4								
	28/8	30,9	7/9	0	0	0	0	0	0	0
	29/8	31,1								
	30/8	31,0								
6/7	31/8	31,0	10/9	0	0	0	0	0	0	0
	1/9	30,1								
	2/9	29,3								
	3/9	27,7	13/9	0	0	0	0	0	0	0
	4/9	28,3								
	5/9	28,8								
	6/9	26,9	16/9	0	0	0	0	0	0	0
	7/9	26,8								
	8/9	26,9								
	9/9	27,6	19/9	0	6,9	0	0	5,4	0	3,7

Bảng 10. Đặc điểm nông sinh học của các dòng TGMS mới trong điều kiện vụ Xuân 2012

Chỉ tiêu theo dõi	AT1	AT5	AT9	AT24	AT27	T1S-96	T7S
Thời gian sinh trưởng (ngày)	130	130	132	129	129	131	135
Số lá trên thân chính	15	15	15	15	15	15	15
Chiều cao cây (cm)	108,6	112,7	109,5	112,6	109,2	112,4	109,3
Chiều dài bông (cm)	23,5	22,1	26,4	24,2	23,1	24,6	22,3
Số bông hữu hiệu/khóm	5,2	4,6	5,1	5,7	5,3	5,2	5,8
Số hạt trên bông	168,3	159,8	161,5	162,4	164,9	167,3	153,7
KL. 1000 hạt (gam)	23,1	24,5	22,6	24,3	25,1	24,7	25,2
Kiểu đé nhánh	Gọn	Gọn	Gọn	Gọn	Gọn	Gọn	Gọn
Màu sắc thân	Xanh	Xanh	Xanh	Xanh	Xanh	Xanh	Hơi tím
Màu sắc hạt	Vàng rơm	Vàng rơm	Vàng rơm	Vàng rơm	Vàng rơm	Vàng rơm	Vàng rơm
Màu sắc vỏ hạt	Trắng	Trắng	Trắng	Trắng	Trắng	Trắng	Tím
Hình dạng lá	Phẳng	Lòng mo	Phẳng	Phẳng	Phẳng	Phẳng	Lòng mo
Chiều dài hạt gạo (mm)	6,8	6,6	6,7	6,8	6,7	7,0	6,9
Chiều rộng hạt gạo (mm)	2,2	2,3	2,1	2,3	2,2	2,3	2,4
Tỷ lệ D/R	3,1	2,9	3,2	3,0	3,0	3,0	2,9
Mùi thơm trên lá (điểm)	2	2	2	2	2	0	0
Mùi thơm nội nhũ (điểm)	4	4	4	4	4	1	1

4. KẾT LUẬN

23 dòng TGMS được chọn từ tổ hợp lai giữa 3 dòng mẹ T1S-96, T7S, T23S và 4 dòng bố Bắc thơm 7 (BT7), Basmati 370, Hoa sữa và Hương cốm (HC) có kiểu bất dục từ không phấn đến ít phấn. Trong đó, các dòng bất dục lai tạo từ dòng mẹ T1S-96 và T7S với các dòng bố mang gen lặn mẫn cảm nhiệt độ *tms5*, duy nhất dòng AT19 là con lai giữa T23S/Hoa sữa mang cả hai gen lặn mẫn cảm nhiệt độ *tms2* và *tms5* và hầu hết mang gen thơm *fgr*.

Trong số 23 dòng TGMS mới chọn tạo, có 5 dòng là AT1, AT5, AT9, AT24 và AT27 có nhiều đặc điểm nông sinh học tốt như: có thời gian sinh trưởng ngắn, số lá trên thân chính 14,0 lá, đé nhánh gọn, hạt dài, nội nhũ có mùi thơm điểm 4, ngưỡng chuyển đổi tính dục 24°C, phù hợp cho chọn tạo giống lúa lai hai dòng chất lượng cao, có mùi thơm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Appibhai J. H., Jauhar A., Ebrahimali A. S., Vidya S.G., Umesh K. R. and Prabhakar K. R. (2012). Mapping of *tms8* gene for temperature-sensitive

genetic male sterility (TGMS) in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Breeding*, 131(1): 42-47.

Bai De-lang, Wei Wei, Wei Yan-ping, Chen Ying-zhi, Li Rong-bai (2008). Status and prospect of aromatic hybrid rice, No. 6, *Guangxi Agricultural Sciences*.

Bradbury L.M.T., Fitzgerald T.L., Henry R.J., Jin Q. and Waters D.L.E. (2005a). The gene for fragrance in rice, *Plant Biotech. J.*, 3: 363-370.

Bradbury L.M.T., Henry R.J., Jin Q.S., Reinke R.F and Waters D.L.E. (2005b). A perfect marker for fragrance genotyping in rice, *Molecular Breeding*, 16: 279-283.

Chen S, Wu J, Yang Y, Shi W, Xu M.L (2006). The *fgr* gene responsible for rice fragrance was restricted within 69bp. *Plant Sci.*, 171(4): 505-511.

Dong NV, Subudhi PK, Luong PN, Quang VD, Quy TD, Zheng HG, Wang B, Nguyen HT. (2000). Molecular mapping of a rice gene conditioning thermosensitive genic male sterility using AFLP, RFLP, and SSR techniques. *Theor. Appl. Genet.*, 100: 27-34.

De la Cruz, Fabiola Ramírez M, Héctor Hernández (1997). DNA isolation and amplification from cacti. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 15: 319-325.

Doyle J.J. and J.L. Doyle (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue, *Focus*, 12: 11-5.

Fitzgerald M.A., Hamilton N.R.S., Calingacion M.N., Verhoeven H.A. and Butardo V.M. (2008). Is there a second fragrance gene in rice? *Plant Biotechnol. J.*, 6: 416-423.

- Gomez, Kwanchai A. and Arturo A. Gomez. (1984). Statistical procedures for agricultural research, 2nd Edition. John Wiley & Sons, Inc.
- IRRI (2002). Standard evaluation system for rice. (IRRI P.O. Box 933. 1099- Manila Philippines).
- Jia J., Zhang D., Li C., Qu X., Wang S., Chamarek V., Nguyen H.T. and Wang B. (2001). Molecular mapping of the reverse thermo-sensitive genic male-sterility gene (*rtms1*) in rice. *Theor. Appl. Genet.*, 103: 607-612.
- Kabria K., Islam M.M. and Begum S.N. (2008). Screening of aromatic rice lines by phenotypic and molecular markers, *Bangladesh J. Bot.*, 37(2): 141-147.
- Koh H., Son Y., Heu M., Lee H. and McCouch S.R. (1999). Molecular mapping of a new genic malesterility gene causing chalky endosperm in rice (*Oryza sativa* L.). *Euphytica*, 106: 57-62.
- Lee DS, Chen LJ, Suh HS (2005). Genetic characterization and fine mapping of a novel thermo-sensitive genic male-sterile gene *tms6* in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.*, 111: 271-277.
- Li CunLong; Yang Fen; Luo Long; Luo TianGang; Liu Na; Lu GuangHui (2008). Germplasm resources of Yunnan aromatic and soft rice and research and utilization in rice breeding. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 21(5): 1450-1455.
- Lopez M.T., Toojinda T, Vanavichit A, Tragoonrung S. (2003). Microsatellite Markers Flanking the *tms2* Gene Facilitated Tropical TGMS Rice Line Development. *Crop sci*, 43(6): 2267-2271.
- Mou T.M. (2000). Methods and procedures for breeding EGMS lines, Training course, Hangzhou, China.
- Nguyễn Thị Trâm (2010). Breeding and developing two-line hybrid rice in Viet Nam, *In: Viet Nam fifty years of rice research and development*, Agricultural publishing house, Hanoi, pp. 203-216.
- Reddy OK, Siddiq EA, Sarma NP, Ali J, Hussain AJ, Nimmakayala P, Ramasamy P, Pammi S, Reddy AS. (2000). Genetic analysis of temperature-sensitive male sterility in rice. *Theor. Appl. Genet.*, 100: 794-801.
- Subudhi PK, Borkakati RP, Virmani SS, Huang N. (1997). Molecular mapping of a thermosensitive genetic male sterility gene in rice using bulked segregant analysis. *Genome*, 40: 188-194.
- Sood B.C. and Siddiq E.A. (1978). A rapid technique for scent determination in rice, *Indian J. Genet. Plant Breed.*, 38: 268-271.
- Vu Thi Thu Hien, Atsushi Yoshimura (2015). Identifying map location and markers linked to thermosensitive genic male sterility gene in 103S line, *J. Sci. & Devel.*, 13(3): 331-336
- Wang B, Wang JZ, Wu W, Zheng HG, Yang ZY, Xu WW, Ray JP, Nguyen HT. (1995). Tagging and mapping the thermosensitive genic male sterile gene in rice (*Oryza sativa* L.) with molecular markers. *Theor. Appl. Genet.*, 91: 1111-1114.
- Wang YG, Xing QH, Deng QY, Liang FS, Yuan LP, Weng ML, Wang B. (2003). Fine mapping of the rice thermo-sensitive genic male sterile gene *tms5*. *Theor. Appl. Genet.*, 107: 917-921.
- Yuan L.P. and Xi Qui Fu (1995). Technology of hybrid rice production, Food and Agriculture Organization of the United Nation, Rome, 84 pages.