ENGINEERING TOMATO PLANTS GENETICALLY TO IMPROVE ITS ECONOMIC TRAITS

By

DINA EL-AMIR ABBAS

B.Sc. Agric. Sci. (Horticulture), Fac. Agric., Menofia Univ., Egypt, 1993
M.Sc. Agric. Sci. (Horticulture), Fac. Agric., Menofia Univ., Egypt, 1999

THESIS

Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of

DOCTOR OF PHILOSOPHY

In

Agricultual Sciences

(Genetics)

Department of Genetics
Faculty of Agriculture
Cairo University
EGYPT

2009

SUPERVISION SHEET

ENGINEERING TOMATO PLANTS GENETICALLY TO IMPROVE ITS ECONOMIC TRAITS

Ph.D. Thesis
In
Agric. Sc. (Genetics)
By

DINA EL-AMIR ABBAS

B.Sc. Agric. Sci. (Horticulture), Fac. Agric., Menofia Univ., Egypt, 1993
M.Sc. Agric. Sci. (Horticulture), Fac. Agric., Menofia Univ., Egypt, 1999

SUPERVISION COMMITTEE

Dr. NAGLAA ABD EL-MONEIM ABD ALLAH
Professor of Genetics, Fac. Agric., Cairo University

Dr. MAGDY AHMED MADKOUR
Professor of Plant Pathology, Fac. Agric., Ain Shams University

APPROVAL SHEET

ENGINEERING TOMATO PLANTS GENETICALLY TO IMPROVE ITS ECONOMIC TRAITS

Ph.D. Thesis
By

DINA EL-AMIR ABBAS

B.Sc. Agric. Sci. (Horticulture), Fac. Agric., Menofia Univ., Egypt, 1993
M.Sc. Agric. Sci. (Horticulture), Fac. Agric., Menofia Univ., Egypt, 1999

Approval committee

Dr. ALI ZAIN EL-ABEDEEN ABD EL-SALAM
Professor of Genetics – Fac. Agric., Ain Shams University

Dr. ABD EL-KADER YOUSEF GAMAL EL-DEEN
Professor of Genetics – Fac. Agric., Cairo University

Dr. NAGLAA ABD EL-MONEIM ABD-ALLAH
Professor of Genetics – Fac. Agric., Cairo University

هندسة نباتات الطماطم وراثيا لتحسين صفاتها الاقتصادية

رسالة مقدمة من

دينـــا الأميـر عبـاس
بكالوريوس فى العلوم الزراعية (البساتين) كلية الزراعه- جامعة المنوفيه (1993)
ماجستير فى العلوم الزراعيه (البساتين) كلية الزراعه- جامعة المنوفيه (1999)

للحصول على درجة

دكتـوراه الفلسفة

فى

العلوم الزراعية
الوراثه

قســـــم الوراثـــــة
كليـــة الزراعـــة
جامعة القاهرة
مصـر

2009

هندسة نباتات الطماطم وراثيا لتحسين صفاتها الاقتصادية

رسالة دكتــوراة الفلسفة
فى العلوم الزراعية
(وراثة)

مقدمة من

دينــا الأميـر عبـاس
بكالوريوس فى العلوم الزراعية (البساتين) كلية الزراعه- جامعة المنوفيه (1993)
ماجستير فى العلوم الزراعيه (البساتين) كلية الزراعة - جامعة المنوفية (1999)

لجنة الاشراف

دكتور/ نجـلاء عبد المنـعم عبد الله
أستاذ الوراثة- كلية الزراعة- جامعة القاهرة

دكتور/ مجـدى أحـمد مدكـور
أستاذ أمراض النبات - كلية الزراعة- جامعة عين شمس

هندسة نباتات الطماطم وراثيا لتحسين صفاتها الاقتصادية

رسالة دكتــوراة الفلسفة
فى العلوم الزراعية
(وراثة)

مقدمة من

دينـــا الأميـر عبـاس
بكالوريوس فى العلوم الزراعية (البساتين) كلية الزراعه- جامعة المنوفيه (1993)
ماجستير فى العلوم الزراعيه (البساتين) كلية الزراعة - جامعة المنوفية (1999)

لجنة الحكم

دكتور/ على زين العابدين عبد السلام .....
أستاذ الوراثة- قسم الوراثة- كلية الزراعة-جامعة عين شمس

دكتور/ عبد القادر يوسف جمال الدين .....
أستاذ الوراثة- قسم الوراثة- كلية الزراعة-جامعة القاهرة

دكتور/ نجلاء عبد المنعم عبد الله .....
أستاذ الوراثة- قسم الوراثة- كلية الزراعة-جامعة القاهرة

التاريخ: / /

/استمارة معلومات الرسائل التى تمت مناقشتها

الكلية / المعهد : **الزراعة** **القسم الوراثة**

١ - الدرجة العلمية : ماجستير ☐ دكتوراه ☑

٢ - بيانات الرسالة :

عنوان الرسالة باللغة العربية : هندسة نباتات الطماطم وراثياً لتحسين صفاتها الاقتصادية

عنوان الرسالة باللغة الأجنبية : ENGINEERING TOMATO PLANTS GENETICALLY TO IMPROVE ITS ECONOMIC TRAITS

التخصص الدقيق : الوراثة - البيوتكنولجى

تاريخ المناقشة : ٢٠٠٩/٧/٥

٣ - بيانات الطالب :

الاسم : دينا الجنسية : مصرية النوع : أنثى

العنوان : مدينة نصر-الحى الثامن-١ شارع محمود البنانى تليفون: ٢٤٧١٧٨٤٦

جهة العمل :مركز البحوث الزراعية رقم الفاكس : - البريد الإلكترونى: dinaelamir@hotmail.com

٤ - المشرفون على الرسالة :

الاسم	القسم	الكلية	الجامعة
أ.د نجلاء عبدالمنعم عبدالله	الوراثة	الزراعة	القاهرة
أ.د مجدي أحمد مذكور	أمراض النبات	الزراعة	عين شمس

٥ – مستخلص الرسالة (Abstract)

٥-١ تمت هذه الدراسة في معهد بحوث الهندسة الوراثية الزراعية- مركز البحوث الزراعية و ذلك بهدف تحسين صفة المقاومة للأمراض الفطرية لنبات الطماطم من خلال استخدام التكنولوجيا الحيوية وذلك بالنقل المباشر لجين(*chi I I*) و جين (١ *def*). و للوصول لهذا الهدف اشتملت هذه الدراسة على ثلاثة أجزاء الجزء الأول يهدف الى الحصول على بادرات طماطم محولة وراثياً تحمل جين (*chi I I*) و أخرى تحمل جين (١ *def*) و ذلك بطريقة النقل المباشر باستخدام الـ Biolistic Gun. الجزء الثاني يهدف إلى الكشف الجزيئي عن النباتات المحولة وراثياً. الجزء الثالث يهدف الى إجراء اختبار حيوي للنباتات المحولة وراثياً للكشف عن قدرتها على مقاومة الإصابة بالممرضات الفطرية.

الكلمات الداله (tomato- transgenic plants-biolistic-chitinase-definsin)

٥ – ٢ باللغة الأجنبية :

This study was conducted to improve the economic traits of the tomato crop in respect to the resistance against fungal diseases by means of introducing antifungal genes. Both the (*chi I I*) gene and the (*def I*) gene were used to transform tomato explants. The transformation was performed using biolistic delivery system. Putative transgenic plantlets of were confirmed by PCR, Southern and dot blot analysis. Bioassay for transgenic plants was performed using the fungal pathogen *Fusarium oxysporum* to assay for the resistance against fsarium wilt disease.

(Key Words :– transgenic plants-biolistic-chitinase-definsin-tomato)

٦ - <u>أهم النتائج التطبيقية التى تم التوصل إليها</u> :

٦ - ١ استخدام طريقة النقل المباشرbiolistic delivery system لنقل الجينات كان فعالاً للحصول على نباتات طماطم محولة وراثياً تحمل جين (*chi I I*) وأخرى تحمل جين(*def I*).

٦ – ٢ استخدام تكنيكات PCR و dot blot و Southern hybridization analysis للكشف عن وجود الجينات أثبت التحام الجينات داخل المحتوى الكروموسومى لنباتات الطماطم.

٦ – ٣ استخدام جين (*chi I I*) و جين(*def I*) كان فعالاً فى الحصول على نباتات مقاومة للاصابة بالفطريات.

٦ – ٤ استخدام جين (*def I*) كان أكثر فاعلية فى اكساب نباتات الطماطم القدرة على مقاومة الاصـابة بفطر الفيوزاريوم أكثر من جين *chi I I*).

٧ – ما هى الجهات التى يمكن أن تستفيد من هذا البحث :

٧ -١ مراكز البحوث الزراعية.

٧-٢ كليات الزراعة.

٧-٣

٨ – هل توجد علاقة قائمة بإحدى هذا الجهات : **نعم** ☑ **لا** ☐

فى حالة نعم اذكر هذه الجهات :

٨ – ١ مركز البحوث الزراعية

٨ – ٢

٨ – ٣

ما هى طبيعة العلاقة :

مشروع بحثى ☐

تعاون أكاديمى ☑

مشروع ممول من جهة ثالثة ☐ (اذكر ما هى :)

أخرى ☐ (تذكر)

٩ - هل توافق على التعاون مع جهات مستفيدة من خلال الجامعة :

لا ☐ **(لماذا**)

نعم ☑

(أ) لتطبيق البحث : ☑

(ب) لاستكمال البحث : ☐

(ج) أخرى ☐ **(تذكر**)

١٠ - هل تم نشر بحوث مستخرجة من الرسالة فى مجلات أو مؤتمرات علمية

١٠ – ١ Production of transgenic tomato plants with enhanced resistance against the fungal pathogen *Fusarium oxysporum*

Dina E. Abbas; Naglaa A. Abdallah and Magdy M. Madkour

Arab J. Biotech., Vol. ١٢, No. (١) Jan.

(Received: ٢٠٠٨-٦-٢٠; Accepted: ٢٠٠٨-٧-١)

١٠ – ٢

١٠ – ٣

١١ - هل سبق التقدم لتسجيل براءات اختراع (تذكر مع الجهة و المكان و التاريخ)

لا

١٢ - هل توافق على إعطاء البيانات المذكورة فى هذه الاستمارة لجهات أخرى

نعم ☑ لا ☐

توقيع الطالب : دينا الأمير عباس توقيع المشرفين :

-

-

-

-

وكيل الكلية (المعهد) للدراسات العليا و البحوث : التاريخ

Name of Candidate: Dina El-Amir Abbas **Degree: Ph.D.**
Title of Thesis: Engineering tomato plants genetically to improve its economic traits.
Supervisors: Dr. Naglaa Abd El-Moneim Abd Allah, Dr. Magdy Ahmed Madkour.
Department: Genetics
Branch: **Approval: / / 2009**

ABSTRACT

This study was conducted in attempts to improve the economic traits of the tomato crop in respect to the resistance against fungal diseases. The Fusarium susceptible tomato (*Lycobersicum esculentum* Mill) cultivar Castlerock was used in this study to produce fungal resistant plants by means of introducing antifungal genes. Both the plant vector pGL2 that harbors a class I rice chitinase gene (*chi11*) under the control of the CaMV 35S promoter and hygromycin resistant gene as a plant selectable marker and the plant vector pMON22653 harboring defensin (*def1*) gene derived from the plant specy *Medicago sativa*, under the control of the CaMV 35S promoter were used to transform tomato explants. Hypocotyl with a part of cotyledon (hypocotyledonary) of young tomato seedlings were used as explant material. The transformation was performed using biolistic delivery system. Shoots were regenerated onto selective regeneration medium supplemented with suitable concentration of BA, zeatin ripozide, $AgNO_3$ and hygromycin then subjected to rooting medium for developing roots. Putative transgenic plantlets of R_0 were confirmed by PCR analysis using specific primers for the transgenes and the transformation frequencies obtained were 42.5% and 52.3% for both *chi11* and *def1*-transformed plantlets respectivily . However, PCR, Southern hybridization and dot blot analysis were conducted to R_1 seedlings to confirm the stable integration of transgenes in R_1 progeny. Bioassay for transgenic plants was performed on the transgenic R1 young seedlings and non-transgenic controls by challenging with a vigor isolate of the fungal pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* to assay for the resistance against fsarium wilt disease among individuals. Data from the challenged *chi11*-transgenic plants showed percentage of resistance for transgenic plants under treatment was 43.9% and the degree of resistance varied among the transgenic lines. Three lines (8, 3 and 4) showed very slight symptoms against *F. oxysporum* infection as they did not spread even when the incubation period was extended more and reached to blossoming and fruiting stages. Results also showed that line 8 gave the highest percentage of resistance, as 7 out of 9 were resistant plants with resistance rate of 77.7%, followed by line 3 with 75%, then line 4 with resistance rate of 66.6%. On the other hand bioassay data for the *def1*-transgenic plants showed that the percentage of resistance for transgenic plants under treatment was 52.4% while the degrees of resistance varied among the transgenic lines. Three lines (4, 7 and 3) showed very slight symptoms against *F. oxysporum* infection as they were the most individual plants that exhibit healthy appearance even when the incubation period was extended. Results also showed that line 4 gave the highest percentage of resistance, as it was 81.8%, followed by line 7 with 75%, then line 3 with resistance rate of 71.4%. The obtained results indicated that expression of both the chitinase (*chi11*) and defensin (*def1*) genes into tomato plants acquired them antifungal activity against fusarium pathogen.

Key words: Tomato-transgenic plants-biolistic-chitinase-defensin.

CONTENTS