انتاج نباتات أرز محولة وراثياً مقاومة لثاقبة الساق "*Chilo agamemnon*"

رسالة ماجستير
في العلوم الزراعية
(وراثة)

مقدمة من

عطر حسين كامل محمد

بكالوريوس في العلوم الزراعية (تكنولوجيا حيوية)- كلية الزراعة - جامعة القاهرة، ٢٠٠٦

لجنة الإشراف

الدكتور/ سوسن سامى يوسف
أستاذ الوراثة المتفرغ- كلية الزراعة - جامعة القاهرة

الدكتور/ رضا علوانى عبد الحليم مغيب
أستاذ الوراثة المساعد – كلية الزراعة - جامعة القاهرة

الدكتور/ عبد السلام عبيد دراز
رئيس بحوث- معهد بحوث المحاصيل الحقلية- مركز البحوث الزراعية

انتاج نباتات أرز محولة وراثياً مقاومة لثاقبة الساق "*Chilo agamemnon*"

رسالة ماجستير
في العلوم الزراعية
(وراثة)

مقدمة من

عطر حسين كامل محمد

بكالوريوس في العلوم الزراعية (تكنولوجيا حيوية)- كلية الزراعة – جامعة القاهرة ،٢٠٠٦

لجنة الحكم

دكتور/ عفت عبد اللطيف بدر .....
أستاذ الوراثة غير المتفرغ- كلية الزراعة- جامعة الاسكندرية

دكتور/ أحمد نجيب السيد شرف .....
أستاذ الوراثة - كلية الزراعة- جامعة القاهرة

دكتور/ رضا علوانى عبد الحليم مغيب .....
أستاذ الوراثة المساعد – كلية الزراعة – جامعة القاهرة

دكتور/ سوسن سامى يوسف .....
أستاذ الوراثة المتفرغ – كلية الزراعة – جامعة القاهرة

التاريخ / /

انتاج نباتات أرز محولة وراثياً مقاومة لثاقبة الساق"*Chilo agamemnon*"

رسالة مقدمة من

عطر حسين كامل محمد

بكالوريوس في العلوم الزراعية (تكنولوجيا حيوية)- كلية الزراعة – جامعة القاهرة ،٢٠٠٦

للحصول على درجة

الماجستير

في

العلوم الزراعية
(وراثة)

قســـــم الوراثة
كليـــــة الزراعـــة
جـامعـة القـاهرة
مصـــــر

٢٠١٠

اسم الطالب: عطر حسين كامل محمد **الدرجة:** ماجستير

عنوان الرسالة: انتاج نباتات ارز محولة وراثيا مقاومة لثاقبة الساق"*Chilo agamemnon*"

المشرفون : دكتور: سوسن سامى يوسف
دكتور: رضا علوانى عبد الحليم مغيب
دكتور: عبد السلام عبيد دراز

قسم: الوراثة **تاريخ منح الدرجة: ٣ / ٧ /٢٠١٠**

المستخلص العربي

تم تصميم هذه الدراسة لمقارنة القدرة الكامنة على التكشف لسبعة اصناف من الارز المتباينة وراثيا باستخدام الاجنة الناضجة كمستقطع نباتى. تم تكوين كالوس جنينى على المستقطعات النباتية فى خلال ثلاثة اسابيع فى بيئة نمو تحتوى 3 mg/l من 2,4- D ونشأت الاجنة الجسدية مباشرة من الكالوس الجنينى بنقله الى بيئة تحتوى على ال BA بنسبة 3 mg/l و قد اظهر الصنف جيزة ١٧٨ اعلى نسبة تكشف (٣٩%) مقارنة بباقي الاصناف. وأظهرت النتائج المتحصل عليها من اختبار ال RAPD ان عدد الواسمات الكلية المتحصل عليها هو ٤٥ بالنسبة لاصناف الارز السبعة منهم ٢٩ واسم متباين بنسبة تباين 64.4% . ستة عشر واسم من ال 29 واسم المتباين وجد أنها متخصصة للأطقم الوراثية المستخدمة. كما تم دراسة الثبات الوراثى بين النباتات الناتجة من زراعة الانسجة باستخدام طريقة ال RAPD و اوضحت النتائج ان نسبة التماثل الوراثى بين النبات الام و النباتات الناتجة من زراعة الانسجة للصنف جيزة ١٧٨ وصلت الى ٩١%. و تهدف هذه الدراسة الى انتاج نباتات ارز مهندسة وراثيا تشفر لجين *cry1Ia5* لمقاومة الحشرات و تم استخدام الناقل البلازميدى *BPI-121* المحتوى على جين *cry1Ia5* تحت السيطرة الجينية للمشغل 35S والناهى *nos* و تم التأكد من نجاح نقل و ادماج جين ال*cry1Ia5* داخل جينوم النباتات الناتجة باستخدام كل من الاختبارات التالية الPCR و الSouthern blot و الDot blot. ثم اختبار ثلاثة خطوط مهندسة وراثيا تشفر ل*cry1Ia5* بالنسبة لمقاومتها ليرقات ثاقبات الساق *Chilo Agamemnon*. قد وصلت نسبة الموت الى ١٠٠% فى حالة تغذية اليرقات على هذه النباتات لمدة اربعة ايام مقارنة بالكنترول

الكلمات الدالة: جين ال *Cry1Ia5* ، الثبات الوراثى فى الارز، المقاومة للحشرات، اعادة التكشف فى الأرز، التحول الوراثى.

PRODUCTION OF TRANSGENIC RICE PLANTS RESISTANT TO STEM BORER "*Chilo agamemnon*"

By

ETR HUSSEIN KAMEL MOHAMMED
B.Sc. Agric. Sci. (Biotechnology), Fac. Agric., Cairo Univ., 2006

THESIS
Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of

MASTER OF SCIENCE

In

Agricultural Sciences
(Genetics)

Department of Genetics
Faculty of Agriculture
Cairo University
EGYPT

2010

APPROVAL SHEET

PRODUCTION OF TRANSGENIC RICE PLANTS RESISTANT TO STEM BORER "*Chilo agamemnon*"

M.Sc. Thesis
In
Agric. Sci. (Genetics)

By

ETR HUSSEIN KAMEL MOHAMMED
B.Sc. Agric. Sci. (Biotechnology), Fac. Agric., Cairo Univ., 2006

Approval Committee

Dr. EFAT A. BADR ……
Emeritus Professor of Genetics, Fac. Agric., Alexandria University

Dr. AHMED NAGIB SHARAF…….……..….
Professor of Genetics, Fac. Agric., Cairo University

Dr. REDA ELWANY A. MOGHAIEB ……...….....….....…
Assistant Professor of Genetics, Fac. Agric., Cairo University

Dr. SAWSAN SAMY YOUSSEF ……...……
Emeritus Professor of Genetics, Fac. Agric., Cairo University

Date: / /

SUPERVISION SHEET

PRODUCTION OF TRANSGENIC RICE PLANTS RESISTANT TO STEM BORER "*Chilo agamemnon*"

M.Sc. Thesis
In
Agric. Sci. (Genetics)

By

ETR HUSSEIN KAMEL MOHAMMED
B.Sc. Agric. Sci. (Biotechnology), Fac. Agric., Cairo Univ., 2006

SUPERVISION COMMITTEE

Dr. SAWSAN SAMY YOUSSEF
Emeritus Professor of Genetics, Fac. Agric., Cairo University

Dr. REDA ELWANY A. MOGHAIEB
Assistant Professor of Genetics, Fac. Agric., Cairo University

Dr. ABD EL- SALAM EBAID DRAZ
Head of Research, Rice Research Program, Agricultural Research Center

Name of Candidate: Etr Hussein Kamel Mohammed **Degree:** M.Sc.
Name of Thesis: Production of Transgenic Rice Plants Resistant to Stem Borer "*Chilo agamemnon*"
Supervisors: Dr. Sawsan Samy Youssef
Dr. Reda Elwany A. Moghaieb
Dr. Abd El- Salam E. Draz
Department: Genetics **Approval: 3 / 7 / 2010**

ABSTRACT

The present investigation was conducted to compare seven agronomically and genetically different rice (*Oryza sativa* L.) cultivars for their capacity for callus induction and plant regeneration from mature zygotic embryos. White embryonic calli were formed within three weeks in the presence of 3 mg/l 2,4, D . The somatic embryos directly originated from the embryogenic callus in the presence of 3 mg/ l BA. The cultivar Giza 178 showed high regeneration frequency (39%).The data obtained from the random amplified polymorphic DNA analysis showed that a total of 45 DNA markers were detected among the seven rice cultivars of which, 29 bands were polymorphic (64.4%) .

Sixteen out of the twenty-nine polymorphic RAPD markers generated were found to be genotype specific. Genetic stability in tissue cultured rice plants was examined by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. The genetic similarity between the mother and the regenerated plants was high for Giza 178 (91%).The main objective of the present work was to produce transgenic Egyptian rice plantlets expressing the *cry1Ia5* gene which renders plant insect tolerance. The *pBI-121* plasmid harboring the *cry1Ia5* gene under the control of 35-S promoter and NOS terminator was used. The stable integration of the *cry1Ia5* gene was confirmed using PCR, Southern blot and Dot blot analyses. Three transgenic lines expressing the *cry1Ia5* gene were bioassayed for resistance to neonate larvae of stem borer (*Chilo agamemnon*). Larval mortality of up to 100% was recorded after four days comparing with the control plants.

Key words: *cry1Ia5* gene, Genetic stability, Insect resistance, Rice regeneration, Transformation.

DEDICATION

I dedicate this work to whom my heart felt thanks: to my father, mother, sister and brother and to Professor Sawsan Samy Youssef and Dr. Reda Elwany Moghaieb for all the support and encouragement they continually offered along the period of my post-graduate studies.

ACKNOWLEDGEMENT

At first, I would like to thank ***ALLAH*** *that allowing me to achieve this work, without his bless any great effort is invaluable.*

I wish to express my deep gratitude to ***Dr. Sawsan S. Youssef****, Emeritus Professor of Genetics, Faculty of Agriculture, Cairo University, for supervision, continued assistance, guidance, great interest, encouragement, following the progress of the work with great interest and continuous criticism through the course of study. I would like also to express my deep appreciations and utmost gratitude to* ***Dr. Reda E.A. Moghaeib****, Assistant Professor of Genetics, Faculty of Agriculture, Cairo University for his supervision of this investigation, encouragement, unlimited help, moral support and valuable guidance throughout the achievement of this study.*

My special and deep thanks to ***Dr. Abd El-Salam Draz*** *the deputy director of the Rice Research Program - Agricultural Research Center for his valuable help, and encouragement during this work. Sincere thanks are due to* ***Dr. Ahmed M. EL-Sharkawy*** *Professor of Genetics, Faculty of Agriculture, Cairo University, and* ***Dr. Sanna A. Mohamed****, Senior Researcher of Plant Protection, Plant Protection Research Institute, Agricultural Research Center, for their generous help. Many thanks are due to all the members of the Genetic Engineering Research Center, Faculty of Agriculture, Cairo University and all the members of the Department of Genetics, Cairo University for their continuous help.*

CONTENTS

LIST OF TABLES

LIST OF FIGURES

INTRODUCTION

Rice provides staple diet for more than one third of world's population. It accounts for as much as 75% of the caloric intake of the 2 billion humans living in Asia and as much as 33% of the caloric intake of nearly one billion humans in Africa and Latin America. It is the most important food in that part of the world where population densities are high and overall dietary levels are least adequate (Kinoshita and Mori, 2001).

Rice *(Oryza sativa* L. 2n=2x=24), is an annual grass which belongs to the family Gramineae (Sun *et al*., 1990). There are two cultivated species of rice *Oryza sativa* and *Oryza glaberrima*. *O. glaberrima* is cultivated only in a limited scale in West Africa. *O. sativa* has great variation and distribution and has traditionally been divided into two subspecies, *Indica* and *Japonica* (Goff *et al.*, 2002 and Yu *et al.,* 2002). Rice production in over 1.5 billion hectares of land has an overall worldwide production of 596 million tons per annum (FAO, 1995). because rice occupies approximately 9% of the planet's arable land, it is also a key area of concern and of opportunity in environmental protection. Asia produces more than 90% of this amount, and Latin America produces 5% (Khush and Brar, 2002 and Joshi and Behera, 2006).

In Egypt rice is considered as the second cash-export crop after cotton. Some of the Egyptian rice varieties are susceptible to the rice blast fungal pathogen *Pyricularia grisea* and rice stem borers *Chilo agamemnon* Bleszynski. The rice cultivation area in Egypt is