PRODUCTION OF WHEAT PLANTS MORE TOLERENT TO ABIOTIC STRESS *VIA* MODERN APPLIED BIOTECHNOLOGY TECHNIQUES

By

HELMY MOHAMED YOUSSEF IBRAHIM

B.Sc., Agric. Science , Fac. Agric., Cairo Univ., Egypt, 1996.
M.Sc., Agric. Science (Plant Physiol.), Fac. Agric., Cairo Univ., Egypt, 2002.

THESIS

Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of

DOCTOR OF PHILOSOPHY

In

Agricultural Sciences

(Plant Physiology)

Dept. Agric . Bot.
Faculty of Agriculture
Cairo University
EGYPT

2008

APPROVAL SHEET

PRODUCTION OF WHEAT PLANTS MORE TOLERENT TO ABIOTIC STRESS *VIA* MODERN APPLIED BIOTECHNOLOGY TECHNIQUES

Ph.D. Thesis
By

HELMY MOHAMED YOUSSEF IBRAHIM
B.Sc., Agric. Science , Fac. Agric., Cairo Univ., Egypt, 1996.
M.Sc., Agric. Science (Plant Physiol.), Fac. Agric., Cairo Univ., Egypt, 2002.

Approved by:

Dr. Moheb Taha Sakr.
Professor of Plant Physiology, Fac. Agric., Mansoura University.

Dr. Eglal Mohamed Zaki Harb
Professor of Plant Physiology, Fac. Agric., Cairo University.

Dr. Osama Mohamed El-Shihy
Professor of Plant Biotechnology, Fac. Agric., Cairo University.

Dr. Abdel Rahman Moursy Ghallab
Professor of Plant Physiology, Fac. Agric., Cairo University.

Date: / /

SUPERVISION SHEET

PRODUCTION OF WHEAT PLANTS MORE TOLERENT TO ABIOTIC STRESS *VIA* MODERN APPLIED BIOTECHNOLOGY TECHNIQUES

Ph.D. Thesis
By

HELMY MOHAMED YOUSSEF IBRAHIM

B.Sc., Agric. Science , Fac. Agric., Cairo Univ., Egypt, 1996.
M.Sc., Agric. Science (Plant Physiol.), Fac. Agric., Cairo Univ., Egypt, 2002.

SUPERVISION COMMITTEE

Dr. Osama Mohamed El-Shihy
Professor of Plant Biotechnology, Fac. Agric., Cairo University.

Dr. Abdel-Rahman Moursy Ghallab
Professor of Plant Physiology, Fac. Agric., Cairo University.

Dr. Salem Mohamed Salem Hammad
Professor of Plant Physiology, Fac. Agric., Cairo University.

ACKNOWLEDGEMENT

Firstly my unlimited thanks to " ALLAH "

The author wishes to express his sincere thanks and deepest gratitude to Dr. Osama Mohamed El-Shihy, Professor of Plant Physiology (Plant Biotechnology), Department of Agricultural Botany "Plant Physiology Division", Faculty of Agriculture, Cairo University for his valuable supervision guidance and encouragement as well as for his sincere help, advice, suggestion and supporting of the biotechnology part of this study during the progress of this work.

The author wishes also, to express his faithful thanks, sincere appreciation and deep gratitude to Dr. Abdel-Rahman Moursy Ghalab Professor of Plant Physiology, at the same department for his suggestion of the physiological problem, drawing the plan of the work, his supervision during the progress of the work and valuable guidance as well as his

useful help, interest and the great efforts in the writing of this thesis.

My deep thanks, my utmost heartfelt gratitude to my parents, my wife Hend, my lovely sons and doughter as well as to my brothers and my sisters.

إنتاج نباتات قمح اكثر تحمل للظروف المعاكسة باستخدام التقنيات التطبيقية الحديثة

رسالة مقدمة من

حلمي محمد يوسف إبراهيم

بكالوريوس فى العلوم الزراعيه- كلية الزراعة – جامعة القاهرة ١٩٩٦

ماجستير في العلوم الزراعية (فسيولوجيا النبات) كلية الزراعة – جامعة القاهرة ٢٠٠٢

للحصول على

درجه دكتوراه الفلسفة

فى

العلوم الزراعيه
(فسيولوجيا النبات)

قسم النبات الزراعي
كليـــــة الزراعـــة
جـامعــة القــاهرة
مصـــــــر

٢٠٠٨

إنتاج نباتات قمح اكثر تحمل للظروف المعاكسة باستخدام التقنيات التطبيقية الحديثة

رسالة دكتوراه الفلسفة
في العلوم الزراعيه
(فسيولوجيا النبات)

مقدمة من

حلمي محمد يوسف إبراهيم

بكالوريوس فى العلوم الزراعيه- كلية الزراعة – جامعة القاهرة - ١٩٩٦
ماجستير في العلوم الزراعية (فسيولوجيا النبات) كلية الزراعة – جامعة القاهرة - ٢٠٠٢

لجنة الإشراف

الدكتور/ اسامه محمد عبد الحميد الشيحي
أستاذ فسيولوجيا النبات - كلية الزراعة - جامعة القاهرة

الدكتور/ عبد الرحمن مرسي غلاب
أستاذ فسيولوجيا النبات - كلية الزراعة - جامعة القاهرة

المرحوم الدكتور/ سالم محمد سالم حماد
أستاذ فسيولوجيا النبات - كلية الزراعة - جامعة القاهرة

إنتاج نباتات قمح اكثر تحمل للظروف المعاكسة باستخدام التقنيات التطبيقية الحديثة

رسالة دكتوراه الفلسفة
في العلوم الزراعيه
(فسيولوجيا النبات)

مقدمة من

حلمي محمد يوسف إبراهيم

بكالوريوس فى العلوم الزراعيه- كلية الزراعة – جامعة القاهرة - ١٩٩٦
ماجستير في العلوم الزراعية (فسيولوجيا النبات) كلية الزراعة – جامعة القاهرة - ٢٠٠٢

لجنة إجازة الرسالة:

د.محب طه صقر.
استاذ فسيولوجيا النبات - كلية الزراعة - جامعة المنصورة

د. إجلال محمد زكي حرب
استاذ فسيولوجيا النبات – كلية الزراعة – جامعة القاهرة

د. اسامه محمد الشيحي
استاذ بيوتكنولوجيا النبات – كلية الزراعة – جامعة القاهرة

د. عبد الرحمن مرسي غلاب
استاذ فسيولوجيا النبات – كلية الزراعة – جامعة القاهرة

Name of Candidate: Helmy Mohamed Youssef. **Degree: Ph.D.**
Title of Thesis: Production of wheat plants more tolerant to abiotic stress via modern applied biotechnology techniques.
Supervisors: Prof. Dr. Osama Mohamed El-Shihy, Prof. Dr. Abdel-Rahman Moursy Ghallab and Prof. Dr. Salem Mohamed Salem.
Department: Agricultural Botany.
Branch: Plant Physiology. **Approval: / /**

ABSTRACT

Two pot experiments were carried out in the wire house of the Plant Physiology Division, Faculty of Agriculture, Cairo University, during 2004-2005 and 2006-2007 seasons under different irrigation salinity levels (0.0%, 16%, 32% and 48% sea water). The aim of this study was to investigate the effect of salinity on growth, yield and chemical composition of wheat (*Triticum aestivum* L.) Gimmeza 9 and Sids 1 cultivars. The obtained results indicated that, the absolute superiority of weekly spraying with 15 mM GB and 6 ppm TiCl4 in inducing the highest significant increases over the salt-tolerant Sids 1 control at the all applied salinity levels, except the highest one; 48% sea water level. The treatments of weekly spraying either with 10 mM GB or 3 ppm TiCl4 recorded such significant increments up to 32% sea water salinity level and 60 min UV-A rays up to 16% sea water only over the salt-sensitive (Gemmiza 9) plants. in addition to the considerable increases in the chemical constituents, i.e. sugars, proline, amino acids, protein, N, P, K+ , Mg^{+2}, Ca^{+2} and Ti (of both growing plants and the produced grains), endogenous phytohormones, i.e. IAA, GA3, ABA and cytokinin as well as inducing the highest reduction in the invertase activity, Na^{+} level. Moreover, these treated plants were able to approach their optimal productivity, which highly significantly exceeded the comparable productivity of the salt-tolerant cultivar control up to 32% sea water. The second group of experiment aimed to evaluate the genetic diversity of some Egyptian wheat cultivars using microsatellites (SSR) as molecular markers. The four varieties of wheat (*Triticum aestivum* L.) tested were Giza 168, Sids 1, Gemmeza 7 and Gemmeza 9) including Chinese Spring as standard. The 24 microsatellites used revealed a total of 93 alleles. The fragment size ranged from 75 bp in GWM3 to 285 bp in GWM931. The average number of alleles was 3.9 ranging from 2-9 alleles per locus. The average allele number was different for each cultivar. With 66 alleles the number was highest in Giza 168, followed by 33 alleles in Sids 1, then Gemmiza 9 with 32 alleles and the lowest allele number was found in Gimmeza 7 (30 alleles). The polymorphism information content (PIC value) reflecting the gene diversity of the 24 microsatellite loci ranged from 0.48 to 0.82 with an average of 0.66. The genetic similarity level ranged from 0.22 for Chinese Spring with the Egyptian cultivars to 0.58 for Gimmeza 7 and Gimmeza 9. The correlation coefficient between PIC and number of alleles over 24 microsatellites loci was 0.62.

***Keywords**: Salinity, Wheat, Endogenous hormones, Nutrients, SSR markers*

اسم الطالب: حلمي محمد يوسف **الدرجة: دكتوراه**

عنوان الرسالة: إنتاج نباتات قمح اكثر تحمل للظروف المعاكسة باستخدام التقنيات التطبيقية الحديثة

المشرفون : الأستاذ الدكتور : اسامه محمد عبد الحميد الشيحي
الأستاذ الدكتور : عبد الرحمن مرسي غلاب
الأستاذ الدكتور : سالم محمد سالم حماد

قسم: النبات الزراعي فرع: فسيولوجيا النبات تاريخ منح الدرجة: / /٢٠٠٨

المستخلص العربي

أجرى هذا البحث فى الصوبه السلكيه لفرع فسيولوجيا النبات بكليه الزراعه – جامعة القاهرة خلال الموسمين ٢٠٠٤ - ٢٠٠٥ و ٢٠٠٦- ٢٠٠٧ تحت مستويات مختلفة من الري بالملوحة (٠، ١٦% و ٣٢% و ٤٨ % ماء بحر) بغرض دراسة تأثير مستويات الملوحة المختلفة على كل من النمو ، المحصول و التركيب الكيماوى لنبات القمح اصناف جميزة ٩ و سدس ١. وقد اظهرت النتائج التفوق الواضح لمعاملات الرش الأسبوعي بتركيز ١٥ مللي مولر جليسين بيتاين والرش الأسبوعي بتركيز ٦ جزء في المليون من التيتانيوم تترا كلوريد والتي أظهرت الصفات الخضرية لنباتاتها أعلى القيم للزيادات المعنوية متفوقة بذلك على نباتات المقارنة للصنفين الحساس والمقاوم وذلك حتى مستوى ٣٢٪ ماء بحر. اما المعاملات الثلاث الأخرى فقد سجلت هذه الزيادات المعنوية حتى مستوى ٣٢٪ ماء بحر لكل من الرش الاسبوعي بتركيز ١٠ مللي مولر جليسين بيتاين والرش الأسبوعي بتركيز ٣ جزء في المليون من التيتانيوم تترا كلوريد وحتى ١٦% فقط بالنسبة لمعاملة تشعيع الحبوب قبل الزراعة لمدة ٦٠ دقيقة بالاشعة فوق البنفسيجية متفوقة في ذلك على نباتات الصنف الحساس فقط وذلك في كلا االعينتين وذلك بالاضافة الى الزيادات الواضحة في تراكم السكريات و الأحماض الأمينية و البرولين و البروتين و عناصر النيتروجين و الفسفور و البوتاسيوم والمغنيسيوم والتيتانيوم مع تقليل تركيز الصوديوم إلى أقل مستوي ، و ذلك سواء في النباتات النامية او الحبوب الناتجة ، علاوة علي تسجيل أعلى القيم لتركيزات الهرمونات الداخلية (الاوكسينات و الجبريللينات و السيتوكاينينات و حمض الابسيسيك) في صالح مزيد من المقاومة للملوحة تمثلت في تراكم السيتوكاينينات إضافة إلى السكريات غير المختزلة في جذور تلك النباتات مع تراكم الاوكسينات والجبريللينات وحمض الأبسيسيك في المجموع الخضري لها بصورة فاقت كثيرا مثيلتها في نباتات المعاملات الأخرى ويضاف إلى هذا تقليل نشاط إنزيم الانفرتيز إلى اقل مستوي في صالح تراكم المزيد من السكريات غير المختزلة ، مما مكن نباتات هذه المعاملات الثلاث من الوصول بإنتاجيتها إلى المستوي الأمثل مسجلة أعلي قيم الزيادات المعنوية علي مثيلتها في معاملات المقارنة للصنف المقاوم حتى مستوي ٣٢ ٪ ماء بحر.بينما في الجزء الذي هدف الى تقييم التنوع الوراثي في بعض اصناف القمح المصرية المتداولة باستخدام المعلمات االوراثية احادية الجزيئية حيث اختبرت اربعة اصناف من القمح المصري هي جيزة ١٦٨ ، سدس ١ ، جميزة ٧ و جميزة ٩ مقارنة بصنف القمح الربيعي الصيني ككنترول. استخدم ٢٤ من المعلمات الوراثية احادية الجزيئية وكنتيجة لذلك تم اظهار ٩٣ اليلا. وتراوح حجم الجزيئات الوراثية بين ٧٥ bp في GWM 3 الى ٢٨٥ bp في GWM 931 وكان متوسط عدد الاليلات ٣.٩ وتراوح بين ٢ الى ٩ اليلا لكل موقع. اختلف متوسط عدد الاليلات لكل صنف حيث اعطى اعلى قيمة له (٦٦ اليلا) في صنف جيزة ١٦٨ يتبعه صنف سدس ١ (بـ ٣٣ اليلا) ثم صنف جميزة ٩ (٣٢ اليلا) وكان اقل عدد من الاليلات في صنف جميزة ٧ (٣٠ اليلا) . ووجد ان الاختلافات الوراثية التي تعكس التنوع الجيني من ٢٤ من المعلمات الوراثية احادية الجزيئية المستخدمة تراوح بين ٠.٤٨ الى ٠.٨٢ بمتوسط ٠.٦٦ وتراوح مستوى التماثل الوراثي من ٠.٢٢ لصنف القمح الربيعي الصيني مع الاصناف المصرية المستخدمة الى ٠.٥٨ لصنفي جميزة ٧ و جميزة ٩ ويوجد ارتباط قوي بين التنوع الجيني وعدد الاليلات حيث كان معامل الارتباط ٠.٦٢.

القمح ، الملوحة ، الهرمونات النباتية ، التيتانيوم ، الجليسين بيتاين ، SDS, SSR markers

INTRODUCTION

Wheat [*Triticum aestivum* L.] is a highly demanded winter cereal crop in Egypt as the main source of food for the Egyptian people. Unfortunately, the total production from this crop in Egypt is still insufficient to cover the local consumption. Thus, there is a great need to overcome this gap between the local national production and the consumption demand, through the increasing of wheat productivity per unit area which can be achieved through the applying of some specific physiological treatments, in addition to the expansion of wheat cultivation in the newly reclaimed areas which represents the great hope in increasing our cultivated land and consequently the economic agricultural production.

Estimates of the extent worldwide of saline conditions vary, but range as high as one billion hectares (Epstein *et al*. 1980). Given that the land area of the world total 13 billion hectares (Dudal, 1977), about 8% is affected by salt. Not one content is free of salt affected soils (Pessarakli and Szabolcs, 1999). Nevertheless, even these data convey an inadequate impression of the extent of salinity as it affects agriculture. That is because although salinity is a natural phenomenon wherever evaporation exceeds precipitation, the human activity of irrigation hugely contributes to salinization. The irrigation water itself invariably contains dissolved salts, and in addition, inadequate drainage may cause salt accumulation in the soil. Roughly 263 million hectares are irrigated worldwide, and in

most of that 1.34 billion hectares (Evans, 1998), the percentage of irrigated land is nearly 20% of the total land (Sharma and Goyal, 2003).

To all these disturbing statistics, we have to add yet more:

1. The number of mouths to feed will rise from current 6.3 billion humans to, say, 10 billion in 2050 (Evans, 1998).
2. Urbanization and industrialization will heighten competition for high quality water (Evans, 1998 and Rains and Goyal, 2003).
3. Water pumped for irrigated agriculture near the sea coast is increasing the intrusion of sea water into wells (Vengosh and Rosenthal, 1994).
4. Cultural and political factors such as war fare and mismanagement (Hillel, 1994 and National academy of Sciences, 1999).

Conventional approaches to the problems of salinity in agriculture have been based on the proposition that if the medium to which roots are exposed is impaired. Namely, a) reclaims salt-affected soils by leaching the salt below the root zone with high quality water, b) uses superior irrigation techniques to minimize the build-up of salt, and c) adds amendments such as calcium sulfate (gypsum) to displace sodium adsorbed on the soil cation exchange complex. Also, under salinity conditions, using some specific physiological treatments (such as irradiation treatments with gamma, fast neutrons and laser rays as well as ultra-violet radiation,

foliar fertilization, applying of the specific growth regulators and/or amino acids) involves changes in the plant behavior and expression of properties that were not evident before the treatment. A plant is considered “adapted to salinity “when the increase in the mean relative growth rate of the salt-treated plant occurs so that the growth is restored to a value more or less similar to that of the control plant, or when the plant has acquired the capacity to complete its life cycle in saline environment in which the non-adapted plant is not able to do so. Essentially, one alters the salt-affected medium to fit the salt-sensitive crop. Such endeavors amount to a huge enterprise and an immense investment in time, effort, material and monetary resources. Environmental, social, economic and even legal factors now pose ever more daunting challenges to irrigation agriculture (National Research Council, 1989).

Due to the restricted resources of the fresh water from the River Nile, the use of saline water or even diluted sea water becomes the only source of irrigation water in such newly cultivated areas, but the sensitivity of some wheat cultivars to salinity will restricts or even prevents their cultivation in such reclaimed areas. Thus, it is mandatory to improve the salinity tolerance of such sensitive wheat cultivars and consequently enhancing their ability to tolerate salinity which, in turn, increasing the possibility of their successful cultivation in such newly reclaimed areas. Therefore, there is increasing attention to accommodate wheat cultivars to

grow in salinities outside the natural range of tolerance and nevertheless obtain appropriate economic productivity.

Clearly, in addition to the "technological fix" of managing the rooting medium, we must add the "biological fix" of genetically adapting crops to saline conditions (Epstein, 1976). This strategy is based on two facts, first, we well know that transport of ions including sodium and chloride is under genetic control and can be genetically manipulated, second, plants can inhabit even highly saline substrates. Nearly all the life in the world's oceans (which are roughly 0.5 M NaCl) depends on green algae. Estuaries in general and salt marshes in particular are unusually productive places (Silliman and Jefferies, 2004). Even among and within crop species, salt tolerance varies appreciably (Epstein, 1976).

The irradiation with Ultra-Violet, laser and gamma rays may provide insight into the mechanism of action of the radiation in producing physiological and genetic variability, thus have been used directly to produce useful variation in quantitively inherited characters, therefore, the result previously obtained by many authors suggested the possibility of successful application of Ultra-Violet, gamma and laser rays to improve salinity tolerance of the sensitive wheat cultivars, since the mutagen agents including ultra-violet radiation, laser and gamma rays are the effective tools for inducing genetical changes in the treated plant material.

In many crop plants the natural accumulation of glycine betaine (GB) is lower than sufficient to ameliorate the adverse

effects of dehydration caused by various environmental stresses (Subbarao *et al*., 2001). Exogenous application of GB to low-accumulating or non-accumulating plants may help reduce adverse effects of environmental stresses (Yang and Lu, 2005). Foliar application of GB resulted in a significant improvement in salt tolerance of rice plants (Lutts, 2000). On the other hand, Knowledge of the concentration, timing and frequency of GB application is a pre-requisite to its commercial use for improving crop stress tolerance. Unfortunately, however, limited research has been conducted to determine the effectiveness of different concentrations of GB in different plant species.

Several plants supported with titanium (Ti) enhanced their leaf N concentrations as well as the contents of other elements, such as P, Ca, Mg, Fe, Mn and Zn (Martinez-Sanchez *et al*, 1992 and Ghallab and Nesiem, 1999). These effects occur when Ti is applied to the nutrient solution in hydroponic culture of tobacco, maize and capsicum (Nautsch-Laufer, 1974; Pais, 1983 and Alcaraz *et al*., 1990) as well as by leaf spraying on apple, grape and wheat (pais, 1983 and Ghallab and Nesiem, 1999), pepper (Carvajal, 1992) or soil fertilization as a Ti (IV)-complex on barley (Ram and Verloo, 1983). However, limited research has been conducted to alleviate of salt stress in wheat plants by exogenous Ti.

Crop diversity studies using molecular markers have been conducted in different cereals such as barley, (Koebner *et al*., 2003), rice (*Orayza sativa* L., Ishii and McCouch, 2001), maize (*Zea mays*