ABSTRACT

Samy Abdel kader Aly Heiba.Development of Markers- Assisted Selection for Abiotc Stress in Advanced Generations of Sorghum Genotypes.Unpublished Ph. D. Dissertation, Ain Shams University, Faculty of Agriculture, Department of Genetics, 2013.

The present study aimed to detect markers-assisted selection associated with salt tolerance in advanced generations in *Sorghum bicolor*L. Moench to improve sorghum genotypes by introducing novel genetic markers for salt tolerance into the breeding populations using morphological and molecular markers.TheF_1 grains were obtained from the two parents, G123 as a salt tolerant and Dorado as the salt sensitive one. F_1grains were sown under salt stress (6000 ppm Na^+Cl^-)to obtain the F_2 plants. In the next year, F_2 grains of the selected plants were sown under the same salinity treatment until obtained F_3 grains. In the last season of this study, F_3 grains were cultivated under salt stress to obtain the leaves sample of the most tolerant ,moderately tolerant and the most sensitive F_4 plants for molecular analysis with their parents and F_1 plants. Among three segregated generations F_2, F_3 and F_4, the morphological parameters were recorded by measuring four traits were grain yield /plant, number of leaves / plant, plant height and mean of leaves area / plant these traits were related directly to salt stress. Most salt tolerant and most salt sensitive plants were selected in each generation according to their performance under salt stress. For molecular analysis,ten ISSR primers were used to screen 21genotypes of sorghum under salt stress for parents, their F_1, most tolerant, moderately tolerant and most sensitive F_4plants.TenISSRs primers detected a total of 108 fragments ranged in size from 146 to 4509 bp , 99 of them polymorphic bands (91.67%) and 9 monomorphic (8.33%)Number of bands varied from 5 to 21 with an average of 10.8 bands /primer.The results recorded eight ISSR- markers for salt stress three of them were positive markers associated with salt tolerance and five negative markers associated with salt sensitivity.SSRs analysis detected a total of 50 fragments ranged in molecular size from 76 to 348 bp., 38 of them were polymorphic bands

(76%) and 12 monomorphic (24%) among the 21 Sorghum genotypes. Number of bands varied from 4 to 10 bands with an average of 5bands /primer.Out of the ten SSR primers, five of them developed three positive markers associated with salt tolerance and three negative markers associated with salt sensitivity.

The identified markers could be used as markers assisted selection for salt tolerance in sorghum breeding programs. It could be concluded that the molecular markers in combination with the morphological traits can be useful in traditional and molecular breeding programs.

Key words: Sorghum, Salt tolerance, Salt –related traits, Advanced generations and ISSR and
SSR markers.

ACKNOWLEDGMENT

I wish to thank **Allah** who supporting me with the strength and patience to complete this work.

The author wishes to express his deep gratitude and sincere appreciation to **Prof. Dr. Mohamed A. Rashed**, Professor of Genetics, Faculty of Agriculture, Ain Shams University for kind supervision, continuous encouragement, sincere help criticism and precious advices during the progress of thesis work.

Sincere thanks are also due to **Prof. Dr. A. H. Atta,** Professor of Genetics, Faculty of Agriculture, Ain Shams University for his supervision, valuable advice, and help during of this study.

I would like to express my deep gratitude to **Prof. Dr. Elham A. A. Abd El Hady,** Professor of Genetics and Cytology Department, National Research Center, Cairo, Egypt for his supervision, help during the period and the preparation and writing the manuscript.

Sincere thanks are also due to **Prof. Dr. Ali H. M. Hassan** for Late supervision.

Deepest thanks to his assistants especially my brother, **Dr. Atef A. A. Haiba** Associate Professor of Genetics and Cytology Department, National Research Center, Cairo, Egypt for their help during the progress of this work.

Sincere thanks are also due to **Mr. Ahmed M. Youssef and Mahmoud Magdy** for their help in data analysis**.**

Also, special thanks are due to my friends **Mr. Bahaa Fayez** and **J. Nassef** for their kind, and their help in gel documentation and their help in gel documentation analysis of this thesis.

Great thanks for all members Department of Faculty of Agriculture, Ain Shams University and Department of Genetics and Cytology in NRC for help me by place and money to complete this work.

And also deepest thanks for Academic of Science Research for supply me with fund to aid in order to finish this thesis.

Finally, I am indebted as gift to **my late Parents and my family, all brothers, wife and my sons** for their continuous encouragement and praying for me.

DEVELOPMENT OF MARKERS-ASSISTED SELECTION FOR ABIOTIC STRESS IN ADVANCED GENERATIONS OF SORGHUM GENOTYPES

By

SAMY ABD EL-KADER ALY HEIBA

B.Sc. Agric. Sc. (Genetics), Zagazig Univ., 1995
M.Sc. Agric. Sc. (Genetics), Zagazig Univ., 2005

A thesis submitted in partial fulfillment
of
the requirements for the degree of

DOCTOR OF PHILOSOPHY

in

Agricultural Science
(Genetics)

Department of Genetics
Faculty of Agriculture
Ain Shams University

2013

Approval Sheet

DEVELOPMENT OF MARKERS-ASSISTED SELECTION FOR ABIOTIC STRESS IN ADVANCED GENERATIONS OF SORGHUM GENOTYPES

By

SAMY ABD EL-KADER ALY HEIBA

B.Sc. Agric. Sc. (Genetics), Zagazig Univ., 1995
M.Sc. Agric. Sc. (Genetics), Zagazig Univ., 2005

This thesis for Ph.D. degree has been approved by:

Dr. Ahmed Abdel Salam Mahmoud ……
Prof. of Genetics, of Genetics, Fac. of Agric., Zagazig University.

Dr. Eman Mahmoud Fahmy ……
Prof. of Genetics, t of Genetics, Fac. of Agric., Ain Shams University.

Dr. Mohamed Abdel Salam Rashed ……
Prof. of Genetics, Fac. of Agric., Ain Shams University.

Date of examination: / / 2013

DEVELOPMENT OF MARKERS-ASSISTED SELECTION FOR ABIOTIC STRESS IN ADVANCED GENERATIONS OF SORGHUM GENOTYPES

By

SAMY ABD EL-KADER ALY HEIBA

B.Sc. Agric. Sc. (Genetics), Zagazig University, 1995
M.Sc. Agric. Sc. (Genetics), Zagazig University, 2005

Under the supervision of:

Dr. Mohamed Abdel Salam Rashed
Prof. of Genetics Department, Fac. of Agric., Ain Shams University.
(Principle supervisor)

Dr. Ayman Hanfy Atta
Prof. of Genetics Department, Fac. of Agric., Ain Shams University.

Dr. Elham Ahmed Abass Abd El - Hady
Prof. of Genetics , Department of Genetics and Cytology, National Research Center.

استنباط كشافات جزيئية للانتخاب لصفة تحمل الاجهاد البيئى فى أجيال متقدمة لتراكيب وراثية من السورجم

رسالة مقدمة من

سامى عبدالقادر على هيبة
بكالوريوس علوم زراعية (وراثة)، جامعةالزقازيق، 1995
ماجستير علوم زراعية (وراثة)، جامعة الزقازيق، 2005

للحصول على
درجة دكتور فلسفه في العلوم الزراعيةِ
(وراثة)

قسم الوراثة
كليه الزراعة
جامعة عين شمس

2013

صفحة الموافقة على الرسالة

استنباط كشافات جزيئية للانتخاب لصفة تحمل الاجهاد البيئى فى أجيال متقدمة لتراكيب وراثية من السورجم

رسالة مقدمة من

سامى عبدالقادر على هيبة
بكالوريوس علوم زراعية (وراثة)، جامعةالزقازيق، 1995
ماجستير علوم زراعية (وراثة)، جامعة الزقازيق، 2005

للحصول على
درجة دكتور فلسفه في العلوم الزراعية
(وراثة)

وقد تمت مناقشة الرسالة والموافقة عليها

اللجنة :

د. أحمد عبد السلام محمود .....

أستاذ الوراثة المتفرغ ، قسم الوراثة، كلية الزراعة ، جامعة الزقازيق

د. ايمان محمود فهمى .....

أستاذ الوراثة، كلية الزراعة، جامعة عين شمس

د. محمد عبد السلام راشد .....

أستاذ الوراثة المتفرغ،كلية الزراعة، جامعة عين شمس (المشرف الرئيسي)

تاريخ المناقشة: / / 2013

جامعة عين شمس
كلية الزراعة

رسالة دكتوراه

اسم الطالب : سامى عبد القادر على هيبة
عنوان الرسالة : استنباط كشافات جزيئية للانتخاب لصفة تحمل الاجهاد البيئى فى أجيال متقدمة لتراكيب وراثية من السورجم.

اسم الدرجة : دكتور فلسفة فى العلوم الزراعية (وراثة)

لجنة الإشراف

د. محمد عبد السلام راشد
أستاذ الوراثة المتفرغ ، قسم الوراثة، كلية الزراعة، جامعة عين شمس (المشرف الرئيسى).

د. أيمن حنفى عطا
أستاذ الوراثة، قسم الوراثة، كلية الزراعة، جامعة عين شمس.

د. الهام أحمد عباس عبد الهادى
أستاذ الوراثة بقسم الوراثة والسيتولوجى ،المركز القومى للبحوث.

تاريخ التسجيل: 12/ 2 / 2007

الدراسات العليا

ختم الإجازة **أجيزت الرسالة بتاريخ**

/ / 2013

موافقة مجلس الكلية **موافقة مجلس الجامعة**

/ / 2013 **/ / 2013**

الملخص العربى

اجريت هذه الدراسة فى مزرعة قسم الوراثة بكلية الزراعة جامعة عين شمس ومعامل قسم الوراثة والسيتولوجى بشعبة الهندسة الوراثية والبيوتكنولوجى فى المركز القومى للبحوث خلال الفترة من 2007م حتى 2013 م ، وتهدف هذه الدراسة الى تحديد واسمات جزيئية مساعدة للانتخاب لصفة تحمل الملوحة لأجيال متقدمة فى نبات السورجم للحصول على بعض التراكيب الوراثية المتحملة للملوحة.

وكانت خطة الدراسة كما يلى :

١ -تقييم أداء بعض تراكيب وراثية من السورجم تحت الاجهاد الملحى لثلاثة أجيال انعزالية متقدمة من السورجمهى F_2 و F_3 و F_4.

٢ -تحديد النباتات الأكثر تحملا والأكثر حساسية طبقا لبعض القياسات المورفولوجية التى لها علاقة بالاجهاد الملحى.

٣ -تحديد بعض الواسمات الجزيئية الخاصة ب(ISSR and SSR) المرتبطة بتحمل الملوحة لكى تستخدم كواسمات مساعدة للانتخاب لصفة تحمل الملوحة فى برامج التربية.

فى هذه الدراسة تم زراعة بذور الجيل الاول الناتج من أبوين أحدهما أكثر تحملا للاجهاد الملحى (جيزة 123) والاخر أكثر حساسية للاجهاد الملحى (دورادو) مع المعاملة بالرى بمحلول هوجلاند المغذى بالعناصر الصغرى والكبرى اللازمة لنمو النبات واضافة الى ذلك الرى بتركيز (6000 ppm) من كلوريد الصوديوم (ملح الطعام) لمدة 60 يوم من الزراعة ثم استكمال الرى بمحلول هوجلاند فقط الى تمام النضج وفى العام التالى تم زراعة بذور الجيل الثانى وبنفس الكيفية والمعاملة تم الحصول على بذور الجيل الثالث الهجين ثم زراعتها تحت نفس الظروف السابقة للحصول على أوراق النباتات المتحملة والحساسة والمتوسطة التحمل للاجهاد الملحى للجيل الرابع لاستخدامها فى الدراسات الوراثية على المستوى الجزيئى.

وتتلخص النتائج المتحصل عليها كالاتى

الصفات المورفولوجية التى لها علاقة بالاجهاد الملحى

تم أخذ القياسات لأربعة صفات مورفولوجيةهى كمية المحصول لكل نبات، عدد الأوراق لكل نبات، إرتفاع النبات، متوسط مساحة الأوراق لكل نبات وأخذت القراءات المذكورة و قد تم إجراء التحليل الاحصائى باستخدام T- test للصفات تحت الدراسة فى النباتات الأكثر تحملا والأكثر حساسية للملوحة فيالأجيال الثلاثة المتتالية,(F_2),(F_3) and (F_4).

وبصفة عامةأوضحت النتائج للنباتات المنتخبةالمتحملة للملوحة فى هذه الدراسةأداءا عاليا فى كل الصفات المورفولوجيه تحت الدراسة مقارنة بالنباتات الحساسة فى الثلاثة أجيال سالفة الذكر.

أوضحت نتائج التحليل الاحصائى لمعامل الارتباط بين الصفات المورفولوجية التى تم دراستها ما يلى:

وجد فى النباتات الأكثر تحملا أن هناك إرتباط إيجابى قوى بين متوسط مساحة الأوراق وكمية المحصول بينما وجدت علاقة سالبة بين كمية المحصول لكل نبات وأرتفاع النبات وذلك فى النباتات المتحملة، بينما لوحظ فى النباتات الحساسة أن هناك إرتباط إيجابى بين كمية المحصول وعدد الأوراق لكل نبات فى F_2 and F_3 كما وجدأيضا إرتباط ايجابى بين صفتى عدد الاوراق ومتوسط مساحة الاوراق ومن ناحية أخرى سجلإرتباط سلبى بين ارتفاع النبات وكمية المحصول فى النباتات الحساسة.

والنتيجة: هذاأولا للصفات المورفولوجية ثمالإرتباط بين الصفاتووفقا للتحليل الإحصائى للقراءات المورفولوجية للصفات تحت الدراسة (كمية المحصول ، وعدد الأوراق ، وإرتفاع النبات ، ومتوسط مساحة الأوراق لكل نبات) على 21 نبات تحتوى على الأبوين والجيل الاول F_1 وثلاثة أجيال متتالية (F_2, F_3 and F_4) أظهرت النتائج ثمانيةتراكيب وراثية متحملة وسبعة تراكيب وراثية حساسة وثلاث وسطية التحمل.

التراكيب الوراثية المنتخبة تم دراستها على المستوى الجزيئى بـتقنيتى:

١ -استخدام ISSR - PCR:

تم استخدام عشره بادئات من (ISSR) على ال 21 عينه DNA من التراكيب الوراثيه المنتخبة منالسورجم وقد سجلت النتائج وجود واسمات جزيئية موجبة وسالبة للانتخاب لصفة تحمل الاجهاد الملحى حيث وجد النتائج هناك واسمات جزيئية باستخدام تقنية (ISSRs – PCR) من بينهم ثلاثة واسمات موجبة عند أحجام جزيئية مختلفة وبيانهم كالتالى:

(464bp179bp and 848 bp)باستخدام البادئات (UBC 855, UBC 860b and UBC866)على الترتيب ووجدمنهم خمسة واسمات سالبة أحدهم عند وزن جزيئي 263 bp مع البادئ

(UBC 823) وتحدد اثنين من الواسمات السالبة عند حجم جزيئى 610 bp مع اثنين من البادئات هما (UBC 825 and UBC 857) وسجل البادئ (UBC 866) واسم سالب عند حجم جزيئى 239 bp وظهرآخر الواسمات الجزيئية السالبة مع البادئ (UBC 880) عند حجم جزيئىbp 339.

2 - استخدام تقنيةSSRs – PCR:

فقد تم استنباط ستة واسمات جزيئية للإنتخاب لصفة تحمل الإجهاد الملحى باستخدام عشرة بادئات نتجت ثلاثة واسمات جزيئية موجبة مع البادئات (P_2, P_3 and P_6) بأحجام جزيئية (232 bp) و (216 bp) و (192bp)على الترتيب وكذلك وجد ثلاثة واسمات جزيئية سالبة للإجهاد الملحباستخدام عشرة بادئات نجح منها ثلاثة بادئات هى (P_3) سجل واسم سالب للحساسية للاجهاد الملحى عند حجم جزيئى (122 bp)فى حين أظهر البادئى(P_7) واسم جزيئى سالب عند حجم جزيئى(122 bp) وأخيرا البادئ (P_9) سجل واسم سالب عند حجم جزيئى 146 bp.

والواسمات الجزيئية الناتجة باستخدام تقنيتى (ISSRs and SSRs – PCR) يمكن استخدامها فى برامج التربية للإنتخاب لصفة التحمل للاجهاد الملحى فى تراكيب وراثية من السورجم.

الخلاصة:

نستنتج من هذا أن هذه الواسمات الجزيئية المتحصل عليها بالاضافة للقياسات المورفولوجية يمكن أن تفيد مربى النبات فى برامج التربيه التقليديه والجزيئيهكواسمات مساعدة للإنتخاب لصفة تحمل الملوحة.

CONTENTS

		Pages
	LIST OF TABLES	iii
	LIST OF FIGURES	v
	I- INTRODUCTION	1
	II- REVIEW OF LITERATURE	4
2.1.	Salt stress	4
2.2.	Morphological characters and salinity	9
2.3.	Molecular markers	12
	III- MATERIALS AND METHODS	26
3.1.	Plant materials	26
3.2.	Methods	26
3.2.1.	The main experiment	26
3.2.2.	Statistical analysis	27
3.2.3.	Molecular markers	28
	A) DNA Extraction.	28
	B) Stock solutions.	29
	C) ISSR-PCR analysis	30
	D) SSR- PCR analysis	30
	E) PCR- amplification	31
	F) Agarose gel electrophoresis	32
	IV- RESULTS AND DISSCUSION	33
4.1.	Performance of sorghum genotype for three generations under salt stress	33
4.2.	Correlation analysis of the studied traits	39
4.2.1.	Correlationbetweenstudied traits of salt tolerant plants	39
4.2.2.	Correlationbetween studied traits of salt	44