IN VITRO STUDIES ON DROUGHT TOLERANCE USING GENE TRANSFER ON TOMATO

By

DOAA HASSAN ALI SOLIMAN

B.Sc. Agric. Sci. (Biotechnology), Fac. Agric., Cairo Univ., 2009

THESIS

Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of

MASTER OF SCIENCE

In

Agricultural Sciences
(Plant Physiology)

Department of Agricultural Botany
(Plant Physiology)
Faculty of Agriculture
Cairo University
EGYPT

2015

APPROVAL SHEET

IN VITRO STUDIES ON DROUGHT TOLERANCE USING GENE TRANSFER ON TOMATO

M.Sc. Thesis
In
Agric. Sci. (Plant Physiology)

By

DOAA HASSAN ALI SOLIMAN

B.Sc. Agric. Sci. (Biotechnology), Fac. Agric., Cairo Univ., 2009

APPROVAL COMMITEE

Dr. MAHMOUD MOHAMMED SAKR……..
Professor of Plant Biotechnology, National Research Center, President of the Academy of Scientific Research and Technology

Dr. FARGHAL ABD-EL HAFIEZ ZEID…….
Professor of Plant Physiology, Fac. Agric., Cairo University

Dr. AHMED HUSSEIN HANAFY AHMED……
Professor of Plant Physiology, Fac. Agric., Cairo University

Dr. Dr. AYMAN YEHIA AMIN……
Associate Professor of Plant Physiology, Fac. Agric., Cairo University

Date: / /

SUPERVISION SHEET

IN VITRO STUDIES ON DROUGHT TOLERANCE USING GENE TRANSFER ON TOMATO

M.Sc. Thesis
In
Agric. Sci. (Plant Physiology)

By

DOAA HASSAN ALI SOLIMAN

B.Sc. Agric. Sci. (Biotechnology), Fac. Agric., Cairo Univ., 2009

SUPERVISION COMMITEE

Dr. AHMED HUSSEIN HANAFY AHMED
Professor of Plant Physiology, Fac. Agric., Cairo University

Dr. AYMAN YEHIA AMIN
Associate Professor of Plant Physiology, Fac. Agric., Cairo University

Dr. HAMDY ABDEL-AZIZ MOURSY
Professor of Plant Biotechnology, Plant Biotechnology Department, National Research Center

Name of Candidate: Doaa Hassan Ali Soliman **Degree:** M.Sc.
Title of Thesis: *In vitro* Studies on Drought Tolerance using Gene Transfer on Tomato
Supervisors: Dr. Ahmed Hussein Hanafy Ahmed
Dr. Ayman Yehia Amin
Dr. Hamdy Abdel-Aziz Moursy
Department: Agricultural Botany **Branch**: Plant Physiology
Approval: / /

ABSTRACT

The aim of this study is to investigate best conditions of previously published protocols on *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato, to deliver PtdIns-*PLC2* gene, which renders the trait of tolerance to drought, to Moneymaker (MM), Super Strain B (SSB) and Rio Grande (RG) tomato cultivars. The obtained results indicated that the efficiency of *Agrobacterium*-mediated gene transfer in tomato tissues is influenced by many factors; the most important are cultivars, explants type and bacterial optical density. The highest transformation efficiency was 68% with Moneymaker flamingo bill like explant. Whereas the transformation efficiency with Super Strain B and Rio Grande cotyledons were 48% and 40%, respectively. On contrary, the transformation efficiency of Rio Grande and Super Strain B hypocotyls were 20% and 16 %, respectively. The best optical density for cotyledons and hypocotyls of the SSB and RG was 0.05 followed by 0.5 and 1.0. The presence of transgenes and their expression were confirmed by molecular analysis (PCR, RT PCR and Real Time PCR) and histochemical analysis (GUS assay). In conclusion, GUS assays and PCR affirmed the successful delivery and expression of PtdIns-*PLC2* gene in Moneymaker, Super Strain B and Rio Grande tomato plants regenerated, elongated and rooted on selective media. The obtained Moneymaker transformants were exposed to drought stress *in vitro* using different concentrations of mannitol to assess the activity of the gene and estimate the occurred physiological variations.

Key words: Tomatoes- *Agrobacterium tumefaciensis*- PtdIns-*PLC2*- Gene transfer- Drought- PCR- GUS assay

دراسات معملية على تحمل الجفاف في الطماطم باستخدام النقل الجيني

رسالة الماجستير
في العلوم الزراعية
(فسيولوجيا النبات)

مقدمة من

دعاء حسن علي سليمان
بكالوريوس في العلوم الزراعية(تكنولوجيا حيوية)، كلية الزراعة، جامعة القاهرة، ٢٠٠٩

لجنة الاشراف

دكتور/ أحمد حسين حنفي أحمد
أستاذ فسيولوجيا النبات، كلية الزراعة، جامعة القاهرة

دكتور/ أيمن يحي أمين
أستاذ مساعد فسيولوجيا النبات، كلية الزراعة، جامعة القاهرة

دكتور/ حمدي عبدالعزيز مرسي
أستاذ التكنولوجيا الحيوية النباتية، قسم التكنولوجيا الحيوية النباتية، المركز القومي للبحوث

دراسات معملية على تحمل الجفاف في الطماطم
باستخدام النقل الجيني

رسالة الماجستير
في العلوم الزراعية
(فسيولوجيا النبات)

مقدمة من

دعاء حسن علي سليمان
بكالوريوس في العلوم الزراعية (تكنولوجيا حيوية)، كلية الزراعة، جامعة القاهرة، ٢٠٠٩

لجنة الحكم

دكتور/ محمود محمد صقر.....
أستاذ التكنولوجيا الحيوية النباتية، المركز القومي للبحوث و رئيس أكاديمية البحث العلمي و التكنولوجيا

دكتور/ فرغل عبد الحفيظ زيد.....
أستاذ فسيولوجيا النبات، كلية الزراعة، جامعة القاهرة

دكتور/ أحمد حسين حنفي أحمد.....
أستاذ فسيولوجيا النبات، كلية الزراعة، جامعة القاهرة

دكتور/ أيمن يحي أمين.....
أستاذ مساعد فسيولوجيا النبات، كلية الزراعة، جامعة القاهرة

التاريخ / /

دراسات معملية على تحمل الجفاف في الطماطم باستخدام النقل الجيني

رسالة مقدمة من

دعاء حسن علي سليمان
بكالوريوس في العلوم الزراعية (تكنولوجيا حيوية)، كلية الزراعة، جامعة القاهرة، ٢٠٠٩

للحصول على درجة

الماجستير

في

العلوم الزراعية
(فسيولوجيا النبات)

قســـــم النبات الزراعي
فرع فسيولوجيا النبات
كليـــــة الزراعـــة
جامعة القاهرة
مصـــر

٢٠١٥

DEDICATION

I dedicate this work with all my deepest love and appreciation to all my family especially to spirit of my great grandfather, my grandmother, mother, father, aunts, my two brothers, two sisters, and my husband for their love, patience, care, help and permanent encouragements during my study and for helping me throughout my life.

Praise to Allah for choosing you to be my family.

ACKNOWLEDGEMENT

First of all, praise for the Almighty ***ALLAH*** *for his great and continuing help and mercy in all my life.*

I would like to gratefully and sincerely thank ***Dr. Ahmed Hussein Hanafy Ahmed****, Professor of Plant Physiology, Faculty of Agriculture, Cairo University, for his kind supervision, guidance, understanding, patience during my graduate studies and his efforts in preparation and revision of the manuscript of this thesis.*

I wish to express my gratefully and sincerely thank to ***Dr. Hamdy Abdel-Aziz*** *Professor of Plant Biotechnology, Plant Biotechnology Department, National Research Center for his supervision, guidance, continuous advice during my graduate studies and revision of the manuscript of this thesis*

My deepest appreciation and thanks to ***Dr. Mahmoud Sakr,*** *Professor of Plant Biotechnology, President of the Academy of Scientific Research and Technology, for his kind help, valuable advice, encouragement and providing me all facilities for performing this work and introducing me to apply part of my work at Center of Biotechnology of Sfax, Tunisia for two months. No words are sufficient to express thanks to him.*

I would like to express my thanks to ***Dr. Ayman Yehia,*** *Associate Professor of Plant Physiology, Faculty of Agriculture, Cairo University, for his supervision and helping during the course of this work.*

Special and deep sense of gratitude to ***Dr. Habib Khoudi,*** *Professor of Biotechnology, Laboratory of Plant Protection and Improvement, Centre of Biotechnology of Sfax, Tunisia for*

hosting me at his lab for two months and his continuous advice and encouragement. I thank him for his great efforts with me. Besides I want to thank his student ***Dr. Sandra Gouiaa,*** *Doctor of Biotechnology, for her great help and training*

My endless thanks to my friends; ***Rasha, Mohammed, Mai, Eman and Radwa*** *in Plant Transformation Group, NRC, for their great and continuous help.*

My deepest and special thanks for my friends ***Sara Hussein,*** *the Assistant Researcher, NRC and* ***Shimaa Ahmed*** *&* ***Mohammed Saad*** *Lecturer Assistant of Plant Physiology, Faculty of Agriculture, Cairo University, for their cooperation and help*

Second and foremost, I would like to express my appreciate to my family; Starting from my parents; ***Eng. Hassan and Eng. Ehsan,*** *for their love and support throughout my life, for their encouragement to be ambitious. The word thanks will be tiny for any person to express for his parent. Thanks and great gratitude toward my aunts;* ***Miss Mona Hussein*** *and* ***Miss Hanan Hussein*** *for their stood beside me. Great thanks to my brothers;* ***Mohammed*** *and* ***Hussein*** *and my sisters;* ***Amira*** *and* ***Alaa*** *for their support and help all the time.*

My deepest thanks for my friend Mohamed Mysara the Researcher Assistant, Unit of Microbiology, Belgian Nuclear Research Centre who brings Moneymaker seeds to me from UK.

Last but not lest; I am greatly indebted to my beloved husband ***Mahmoud Shehata****. He forms the backbone and origin of my happiness. I owe my every achievement to him. I thank him for his constant encouragement and support step by step. Thanks for everything and may Allah give him all the best in return.*

LIST OF ABBREVIATIONS

Abbreviation	Meaning of abbreviation
ABA	Abscisic acid
APS	Ammonium Persulphate
BA	Benzyl adenine
BCM	Billion Cubic Meters
Bp	Base pair
CA	Carbonic anhydrase
CAT	Chloramphenicol acetyl transferase
CBF	C-repeat binding factor
CBF1	CRT/DRE-binding factor 1
cDNA	Complementary Deoxyribonucleic acid
CP	Coat protein gene
DAG	Diacylglycerol
DREB	Dehydration-responsive element-binding
FAO	Food and Agriculture Organization
GB	Glycinebetaine
Gus	Bacterial β-glucuronidase
Hrs	Hours
HSF	Heat shock factor
IAA	Indole-3-acetic acid
IBA	Indole-3-butyric acid
InsP	Inositol phosphate
Kan	Kanamycin
LB	Luria-Bertani
MAP	Mitogen-activated protein
Mb	Mega base
Mm	Millimolar
MM	Moneymaker
mRNA	Messenge Ribonucleic acid
MS	Murashige and Skoog
MSKC	Murashige and Skoog with Kanamycin and Cefotaxime
MSI	Membrane stability index
MTA	Material Transfer agreement
NAA	Naphthalene acetic acid
NOS	Nopaline synthase
NPTII	Neomycin phospho-transferase
NR	Nitrate reductase
OD	Optical density
PC	Phosphatidylcholine

PEG	Polyethylene glycol
PI	Phosphatidylinositol
PGRs	Plant Growth Regulators
PLC	Phospholipase C
PtdIns-*PLC2*	Phosphoinositide-specific phospholipase C
POD	Peroxidase
QTL	Quantitative trait loci
RF	Relative mobilities
RG	Rio Grande
Rif	Rifampicin
RNA	Ribonucleic acid
RNase A	Ribonuclease
ROS	Reactive oxygen species
Rpm	Round per minute
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
RWC	Relative water content
SA	Salicylic acid
SB	Sodium Borate
SOD	Superoxide dismutase
SOS	Son of Sevenless
SSB	Super Strain B
T-DNA	Transfer Deoxyribonucleic acid
TEMED	Tetramethylethylenediamine
TLCV	Tomato leaf curl virus
T4SS	Type IV Secretion System
WB	Washing buffer
X-Gluc	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-glucuronide
YEB	Yeast extract broth
µM	Micrometer

اسم الطالب: دعاء حسن علي سليمان **الدرجة:** ماجستير

عنوان الرسالة: دراسات معملية على تحمل الجفاف في الطماطم باستخدام النقل الجيني

المشرفون: **دكتور:** أحمد حسين حنفي أحمد
دكتور: أيمن يحيى أمين
دكتور: حمدي عبدالعزيز مرسي

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

المستخلص العربي

الهدف من هذه الدراسة هو معرفة أفضل الظروف كفاءة لنقل جين PtdIns-*PLC2* الى الطماطم التى تجعل النباتات تتحمل الجفاف بواسطة الأجروبكتريم لأصناف Moneymaker, Super Strain B و Rio Grande . أوضحت النتائج الحالية وجود عدة عوامل تؤثر في كفاءة النقل الجينى الى نباتات الطماطم بواسطة الأجروبكتريم أهمها: أصناف النباتات ، الجزء النباتى والكثافة الضوئية للبكتريا. وكانت أعلى كفاءة نقل جينى فى صنف Moneymaker بنسبة ٦٨% كمصدر للأجزاء النباتية flamingo bill. وكفاءة النقل الجينى فى كل من الصنفين مع الأوراق الفلقية Super Strain B و Rio Grande بنسبة ٤٨% و ٤٠% على التوالى. على عكس كفاءة النقل الجينى فى الجزء النباتى للسويقة الجنينية السفلى حيث كانت أكثر كفاءة بنسبة ٢٠% فى صنف Rio Grande بينما كانت فى صنف Super Strain B بنسبة ١٦%. كما وجد أن أفضل كثافة ضوئية فى الجزء النباتى من الأوراق الفلقية و الجزء النباتى من الأوراق السويقة الجنينية السفلى ل SSB و RG عند تركيز ٠.٠٥ يليه تركيز ٠.٥ و١. تم عمل التقييم الحيوي والجزيئي للجينات المعدلة وراثيا باستخدام PCR, Reverse transcriptase PCR وReal Time PCR و التحليل النسيجى بواسطة GUS. فى الختام، كلا من GUS و PCR أكدا نجاح التعبير الجينى والنقل الجينى لجين PtdIns-*PLC2* فى أصناف الطماطم التالية Moneymaker, Super Strain B و Rio Grand. صنف Moneymaker المعدل وراثيا تعرض لظروف جفاف فى المختبر مع تركيزات مختلفة من المانيتول لتقييم نشاط الجين المنقول وتقدير بعض الإختلافات الفسيولوجيه.

الكلمات الدالة: الطماطم- الأجروبكتيريم- الجفاف- النقل الجيني- PCR- GUS -PtdIns *PLC2*

CONTENTS

LIST OF FIGURES