TRANSFORMATION AND DIFFERENTIAL EXPRESSION OF NA^+/ H^+ ANTIPORTER VACUOLAR (*ATNHX1*) GENE IN TOBACCO PLANTS UNDER SALT STRESS

By

HANAA SHERIF AHMED OMAR

B.Sc. Agric. Sci. (Biotechnology), Fac. Agric., Cairo Univ., Egypt, 2004.

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

2009

APPROVAL SHEET

TRANSFORMATION AND DIFFERENTIAL EXPRESSION OF NA^+/H^+ ANTIPORTER VACUOLAR (*ATNHX1*) GENE IN TOBACCO PLANTS UNDER SALT STRESS

M.Sc. Thesis
By

HANAA SHERIF AHMED OMAR
B.Sc. Agric .Sci. (Biotechnology), Fac. Agric., Cairo Univ., Egypt, 2004.

Approved by:

Dr. AHMED EZZAT ABOU SALHA ..……
Professor of Genetics, Fac. Agric., El -Menia University.

Dr. EBTISSAM HUSSEIN ALY HUSSEIN ……
Professor of Genetics, Fac. Agric., Cairo University.

Dr. MOHAMED HASSANEIN SOLIMAN ……….
Professor of Genetics, Fac. Agric., Cairo University

Dr. ABD ELKADER YOUSSEF GAMAL EL-DIN …….
Professor of Genetics, Fac. Agric., Cairo University.

Date: / /

SUPPERVISION SHEET

TRANSFORMATION AND DIFFERENTIAL EXPRESSION OF NA^+/ H^+ ANTIPORTER VACUOLAR *(ATNHX1)* GENE IN TOBACCO PLANTS UNDER SALT STRESS

M.Sc. Thesis

By

HANAA SHERIF AHMED OMAR

B.Sc. Agric. Sci. (Biotechnology), Fac. Agric., Cairo Univ., Egypt, 2004.

SUPERVISION COMMITTEE

Dr. ABD ELKADER YOUSSEF GAMAL EL-DIN
Professor of Genetics, Fac. Agric., Cairo University.

Dr. MOHAMED HASSANEIN SOLIMAN.
Professor of Genetics, Fac. Agric., Cairo University.

Name of Candidate: Hanaa Sherif Ahmed Omar **Degree:** M.Sc.
Title of Thesis: Transformation and Differential Expression of Na^+/ H^+Antiporter Vacuolar (*AtNHX1)* gene in Tobacco Plants Under Salt Stress**.**
Supervisors: Prof. Dr. Abd Elkader Y. Gamal EL-Din
` Prof. Dr. Mohamed H. Soliman
Department: Genetics **Approval: / /**

ABSTRACT

Saline soil is a serious problem worldwide, and it is necessary to improve the salt tolerance of plants to avoid the progressive deterioration of saline soil. Agrobacterium based system was employed to transfer a vacuolar Na^+/H^+ antiporter (*AtNHX1*) gene into tobacco leaf discs. Hundred thirty putative transgenic tobacco plants were obtained. The leaf painting and spraying assay were applied to select the transformants containing the *bar* gene (basta herbicide resistance). In addition, the stable integration of the *AtNHX1* gene was confirmed by PCR analysis. The expression of encoding sequence *AtNHX1* gene was detected by the accumulation of salt in the transgenic tobacco plants under the salt stress conditions. The wild type plants could not tolerate the concentration up to 150 mM of NaCl. The first generation of transformed plants (T1) could tolerate a concentration of 150 to 300 mM of NaCl. However, transgenic tobacco (second generation plants) expressing the *AtNHX1* were able to grow in the presence of 150 to 500 mM sodium chloride and accumulated significantly high concentrations of sodium ions in the leaves. The significant high salt tolerance in transgenic tobacco plants could by useful through cultivation of these plants in reclaimed and high saline desert soil (phytoremediation).

Key words: transformation, transgenic tobacco, *AtNHX1* gene, salt–tolerance, phytoremediation

DEDICATION

I dedicate this work to whom my heart felt thanks: to father, mother, and brothers, for all the support and encouragement they continually offered along the period of my post graduation.

ACKNOWLEDGEMENT

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

I wish to express my sincere thanks, deep gratitude and appreciation to ***Dr. Mohamed. H. Soliman*** *and Dr.* ***Abd ElKader.Y. Gamal El-Din****, Professors of Genetics, Faculty of Agriculture, Cairo University for suggesting the problem, supervision, continued assistance, criticism and guidance through the course of study.*

I would like to express my appreciation to ***Dr.Mohamed El-awady*** *Lecturer of Genetics and* ***Dr. Salah Al-Assal*** *Associate Professor of Genetics, Faculty of Agriculture, Cairo University for continuous support through the practical parts of this research work and constant help writing the thesis.*

I would also like to express my sincere thanks to ***Dr. Mohamed. S. Husein*** *Associate Professor of Soil Faculty of Agriculture, Cairo University for valuable help and encouragement.*

Lastly I would like to sincerely thank all the staff members of the Genetics Department, Faculty of Agriculture, Cairo University for their help and support.

التحول الوراثى واختلاف مستويات التعبير الجينى *(AtNHX1)* المسئول عن تبادل بروتونات الهيدروجين و الصوديوم فى نباتات الدخان تحت ظروف الملوحة القاسية

رسالة ماجستير
فى العلوم الزراعية
(وراثة)

مقدمة من

هناء شريف أحمد عمر
بكالوريوس في العلوم الزراعية (تكنولوجيا حيوية) - كلية الزراعة - جامعة القاهرة ، 2004

لجنة الإشراف

الدكتور/ **عبد القادر يوسف جمال الدين**
استاذ الوراثة - كلية الزراعة - جامعة القاهرة

الدكتور/ **محمد حسنين سليمان**
استاذ الوراثة - كلية الزراعة - جامعة القاهرة

التحول الوراثى واختلاف مستويات التعبير الجينى *(AtNHX1)* المسئول عن تبادل بروتونات الهيدروجين و الصوديوم فى نباتات الدخان تحت ظروف الملوحة القاسية

رسالة ماجستير
فى العلوم الزراعية
(وراثة)

مقدمة من

هناء شريف أحمد عمر
بكالوريوس في العلوم الزراعية (تكنولوجيا حيوية) - كلية الزراعة - جامعة القاهرة ، 2004

لجنة اجازة الرسالة:

د. أحمد عزت ابو صالحة .....
استاذ الوراثة - كلية الزراعة - جامعة المنيا

د. ابتسام حسين علي حسين.....
استاذ الوراثة - كلية الزراعة - جامعة القاهرة

د. محمد حسنين سليمان.....
استاذ الوراثة - كلية الزراعة - جامعة القاهرة

د. عبد القادر يوسف جمال الدين..... .....
استاذ الوراثة - كلية الزراعة - جامعة القاهرة

التحول الوراثى واختلاف مستويات التعبير الجينى *(AtNHX1)* المسئول عن تبادل بروتونات الهيدروجين و الصوديوم فى نباتات الدخان تحت ظروف الملوحة القاسية

رسالة مقدمة من

هناء شريف أحمد عمر
بكالوريوس في العلوم الزراعية (تكنولوجيا حيوية) - كلية الزراعة - جامعة القاهرة ، 2004

للحصول على

درجة الماجستير

في

العلوم الزراعية
(وراثة)

قسم الوراثة
كلية الزراعة
جامعة القاهرة
مصر

2009

اسم الطالبه: هناء شريف أحمد عمر **الدرجة:** ماجستير

عنوان الرسالة: التحول الوراثى واختلاف مستويات التعبير الجينى(*AtNHX1*) المئسول عن تبادل بروتونات الهيدروجين والصوديوم فى نباتات الدخان تحت ظروف الملوحة القاسية

المشرفون : الأستاذ الدكتور : عبد القادريوسف جمال الدين
الأستاذ الدكتور : محمد حسنين سليمان

قسم: الوراثــة **تاريخ منح الدرجة:** / /

المستخلص العربي

من المعروف ان التربة الملحية هي مشكلة خطيرة في جميع أنحاء العالم ، لذلك من الضروري تحسين مقاومة النباتات للملوحة لتفادي مشاكل التربة الملحية .ولتحقيق ذلك تم استخدام التحول الوراثى بواسطة الاجروبكتريم لنقل جين *AtNHX1* لنباتات الدخان . وقد تم الحصول على 130 نبات محولا وراثيا من الدخان. وقد تم اختيار النباتات المحولة وراثيا المحتوية على جين *bar* وبالإضافة إلى ذلك معرفة اندماج جين *AtNHX1* فى جينوم النباتات عن طريق استخدام تفاعل البلمرة المتسلسل(PCR). ولمعرفة تعبير الجين *AtNHX1* من خلال تراكم الملح تم اختيار النبات المحولة وراثيا تحت ظروف الملوحة العالية. وجد ان النباتات البرية يمكن أن تقاوم تركيز يصل إلى 150 ملى مولر كلوريد الصوديوم، وقد اظهرت النتائج أن نباتات الجيل الاول المحورة وراثيا المحتوية على جين *AtNHX1* قادرة على النمو في وجود 150 الى300 ملى مولر من كلوريد الصوديوم كما وجد أن نباتات الجيل الثانى المحورة وراثيا المحتوية على جين *AtNHX1* قادرة على النمو في وجود 150 الى 500 ملى مولر والتي تراكمت بشكل كبير بتركيزات عالية (أيونات الصوديوم) في أوراق نباتات الدخان المحورة وراثيا ., إن مقاومة الملوحة الملحوظة في نباتات الدخان المحورة وراثيا ربما يكون مفيدا في المستقبل فى تقليل نسبة الملوحة والاستفادة من زراعة الأراضي الملحية الصحراوية(phytoremediation) بمحاصيل ذات قيمة اقتصادية .

الكلمات الدالة: التحول الوراثى – نبات الدخان المحولة وراثيا - جين تبادل الصوديوم والهيدروجين - مقاومة الملوحة

استمارة معلومات الرسائل التى تمت مناقشتها

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

١ - **الدرجة العلمية :** ماجستير ☑ دكتوراه ☐

٢ - بيانات الرسالة :

عنوان الرسالة باللغة العربية :

التحول الوراثى واختلاف مستويات التعبير الجينى *(AtNHX1)* المسئول عن تبادل بروتونات الهيدروجين و الصوديوم فى نباتات الدخان تحت ظروف الملوحة القاسية

عنوان الرسالة باللغة الأجنبية :

transformation and differential expression of Na^+/H^+ antiporter vacuolar (*AtNHX1)* gene in tobacco plants under salt stress**.**

التخصص الدقيق :

تاريخ المناقشة : ٧-٦-٢٠٠٩

٣ - بيانات الطالب :

الاسم : هناء شريف احمد عمر الجنسية : مصريه النـوع : أنثي

العنوان : ٤٢ شارع عبد تالمنعم العسلاني – دار السلام رقم التليفون :٠١١٩٩٦٩٧٩٨

جهة العمل :قسم الوراثه– كليه الزراعه البريد الإلكترونى :hanaa8324@yahoo.com

٤ - المشرفون على الرسالة :

الاسم	القسم	الكلية	الجامعة
١- أ.د/ عبد القادر يوسف جمال الدين	الوراثه	الزراعه	القاهره
٢- أ.د/ محمد حسنين سليمان	الوراثه	الزراعه	القاهره

٥ - مستخلص الرسالة (Abstract)

٥ - ١ باللغة العربية : بشرط ألا يزيد عن ٧ أسطر

من المعروف ان التربة الملحية هي مشكلة خطيرة في جميع أنحاء العالم ، لذلك من الضروري تحسين مقاومة النباتات للملوحة لتفادي مشاكل التربة الملحية .ولتحقيق ذلك تم استخدام التحول الوراثى بواسطة الاجروبكتريم لنقل جين *AtNHX1* لنباتات الدخان . وقد تم الحصول على ١٣٠ نبات محولا وراثيا من الدخان. معرفة اندماج جين *AtNHX1* فى جينوم النباتات عن طريق استخدام تفاعل البلمرة المتسلسل(PCR). وبالإضافة إلى معرفة تعبير الجين *AtNHX1* تحت ظروف الملوحة العالية .كما وجد أن نباتات الجيل الثانى المحورة وراثيا المحتوية على هذا الجين قادرة على النمو في وجود ٥٠٠ ملى مولر والتي تراكمت بشكل كبير بتركيزات عالية (أيونات الصوديوم) في أوراق نباتات الدخان المحورة وراثيا.

(**الكلمات الدالة** : التحول الوراثى – نبات الدخان المحولة وراثيا – جين تبادل الصوديوم والهيدروجين – مقاومة الملوحة)

٥ - ٢ باللغة الأجنبية : بشرط ألا يزيد عن ٧ أسطر

Saline soil is a serious problem worldwide, and it is necessary to improve the salt tolerance of plants to avoid the progressive deterioration of saline soil. Agrobacterium based system was employed to transfer a vacuolar Na^+/H^+ antiporter (*AtNHX1*) gene into tobacco leaf discs. Hundred thirty putative transgenic tobacco plants were obtained .The stable integration of the *AtNHX1* gene was confirmed by PCR analysis. The expression of encoding sequence *AtNHX1* gene was detected under the salt stress conditions. Transgenic tobacco (second generation plants) expressing the *AtNHX1* were able to grow in the presence of 150 to 500 mM sodium chloride.

(Key Words: transformation, transgenic tobacco, *AtNHX1* gene, salt–tolerance**)**

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

(لا تزيد عن سطرين لكل منها)

٦ – ١ عمل PCR لمعرفة دخول وانتقال جين *AtNHX1* فى جينوم نبات الدخان المحولة وراثياً عبر الأجيال

أظهرت النتائج أن نباتات الدخان المحولة وراثيا (نباتات الجيل الأول والثانى) تحتوى على مقطع من جين *AtNHX1* طولة ٥٠٠ زوج من القواعد وانتقاله عبر الأجيال المختلفة، في حين اتضح أن نباتات الدخان العادية لاتحتوي على هذا المقطع.

١. ٦ – ٢ مدى مقاومة استمرارنمو نباتات الدخان المحولة وراثيا تحت ظروف الملوحة القاسية

استهدفت الدراسة معرفة الحد الأعلى من مستوى التعبير الجينى فى أجيال نباتات الدخان المحولة وراثيا، وقد وجد أن نباتات الجيل الثانى المحولة وراثيا والمحتوية على جين *AtNHX1* يمكن أن تقاوم تركيز يصل إلى 500 مللي مولر من كلوريد الصوديوم.

٦ – ٣ انتاج نباتات الدخان المحولة وراثيا والقادرة على النمو تحت تركيز ٥٠٠ مللي مولر من كلوريد الصوديوم.

أجريت التجارب علي عدد ٦٠ نبات من نباتات الدخان المحولة وراثياً تحت ظروف الملوحة القاسية، وجد أن نباتات الجيل الثاني (T2) ١٠ نباتات تقاوم تركيز يصل إلي ١٥٠ مللي مولر وتبلغ نسبتها ١٦ ٪، ١٠ نباتات تقاوم تركيز يصل إلي ٥٠٠ مللي مولر وتبلغ نسبتها ١٦ ٪، ٢٥ نبات تقاوم تركيز يصل إلي ٣٠٠ مللي مولر من كلوريد الصوديوم وتبلغ نسبته ٤١.٦ .

٦ – ٤ التأكد من أن نباتات الدخان المحولة وراثياً لديها القدرة على امتصاص أيونات الصوديوم من التربة وتجمعها فى فجوات الأوراق.

بعد إجراء التجارب علي نباتات الدخان المحولة وراثياً (نباتات الجيل الأول) وجد أن (نباتات الجيل الثاني) وجد أن أوراقها تحتوي علي ٢٦٥٥ إلى ٣٩٨٠ ppm من أيونات الصوديوم .بالإضافة إلي أن أيونات الصوديوم فى جذور نباتات نباتات الجيل الثاني تصل من ٢٠٧.٠٠ إلي ٢٤.٠٠ppm .

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

(اذكر هذه الجهات مع شرح أهمية البحث لهذه الجهة بما لا يزيد عن أربعة سطور لكل جهة)

٧ ـ ١ اكاديمية البحث العلمي

٧ ـ٢ مركز البحوث الزراعية

٧ ـ٣ اصلاح الاراضي

٧ ـ ٤ مركز البحوث الزراعية

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

فى حالة نعم اذكر هذه الجهات :

٨ ـ ١ اكاديمية البحث العلمي

٨ ـ ٢ مركز البحوث الزراعية

٨ ـ ٣

ما هى طبيعة العلاقة :

مشروع بحثى ☑

تعاون أكاديمى ☐

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

أخرى ☐ (تذكر)

٩ - <u>هل توافق على التعاون مع جهات مستفيدة من خلال الجامعة :</u>

لا ☐ **(لماذا**)

نعم ☑

(I) لتطبيق البحث : ☑

(II) لاستكمال البحث : ☑

(ج) أخرى ☐ **(تذكر**)

١٠ - <u>هل تم نشر بحوث مستخرجة من الرسالة فى مجلات أو مؤتمرات علمية</u>

(تذكر مع جهة النشر و المكان و التاريخ)

١٠ - ١ نعم

لا

١٠ - ٢ فى المجلة العربية في المجلس الاعلي لجامعات

١٠ - ٣

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

لا

١٢ - <u>هل توافق على إعطاء البيانات المذكورة فى هذه الاستمارة لجهات أخرى</u>

نعم ☑ لا ☐

توقيع الطالب : توقيع المشرفين :

- هناء شريف احمد عمر

- عبد القادريوسف جمال الدين

- محمد حسنين سليمان

وكيل الكلية (المعهد) للدراسات العليا و البحوث : التاريخ