

***IN VITRO* INDUCTION OF LOCAL RICE VARIETIES, MRQ74 & MR269 PLANT
SALT TOLERANCE AND ASSESSMENT OF VARIABILITY THROUGH
BIOCHEMICAL & MOLECULAR MARKER**

ARSHAD NAJI HUSIN ALHASNAWI

**THESIS SUBMITTED IN FULFILMENT FOR THE DEGREE OF
DOCTOR OF PHILOSOPHY
GENETIC**

**FACULTY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY
UNIVERSITI KEBANGSAAN MALAYSIA
BANGI**

2017

**INDUKSI SECARA *IN VITRO* PADI TEMPATAN VARIETI MRQ74 & MR269
RINTANG TERHADAP KEMASINAN DAN PENILAIAN KEBERBEZAAN
MELALUI PENANDA BOKIMIA & MOLECULAR**

ARSHAD NAJI HUSIN ALHASNAWI

**TESIS YANG DIKEMUKAKAN UNTUK MEMPEROLEHI
IJAZAH DOKTOR FALSFAH
GENETIK**

**FAKULTI SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITI KEBANGSAAN MALAYSIA
BANGI**

ABSTRACT

Salinity is one of the main issues encountered in interrupting the metabolic processes of plants, thus limiting crop productions. The primary objective of this study was to establish and develop regeneration protocols (direct and indirect plant regeneration) to elicit salt tolerance in local rice varieties MRQ74 and MR269, using an *in vitro* selection technique followed by the assessment of genetic variability using an inter-simple sequence repeat (ISSR) marker. In the present investigation, 200 mM NaCl was applied to produce salinity stress conditions within the growth medium. An *in vitro* experiment was conducted to evaluate the potential of exogenous application at different concentrations of ascorbic acid (AsA) and polysaccharide from mushroom (beta glucan, BG) to alleviate the effect of stress conditions on seedlings and callus of both rice varieties. There was selection for the higher levels of antioxidant enzyme and proline activities in seedling and callus for plant regeneration (direct and indirect) and then transfer to a glasshouse for the hardening and acclimatization process to produce generation (F1) plants. To verify the stability of the acquired salinity tolerant plants, selected F1 seeds from both sources (direct and indirect regeneration) then were germinated under irrigation salinity stress in glasshouse for F2 generation plants. The same process was carried out for these F2 generation selected plants to produce F3 generation tolerant plants. Seedlings from F3 generation then were selected together with seedlings from its mother plant. Molecular evaluations were done to determine DNA polymorphism of the selected variance derived from MRQ74 and MR269 variety for salt tolerance via ISSR markers. Results showed that seedling and callus of both varieties exposed to salt stress exhibited significant reductions in growth characteristics. The findings from the treatment using AsA and BG revealed enhancement of growth characteristics, antioxidant enzymes, and proline activities. These, all leading to improve process plant regeneration to yield F1 generation plants from direct and indirect sources. The F2 generation plants from both sources (direct and indirect) acquired under irrigation salinity stress and the results showed that F2 generation plants derived from indirect plant regeneration (callus sources) had a superior phenotype as well as physiological and chemical characteristics. Germination of generation F2 seeds resulted in the production of generation F3 seedlings derived from indirect (callus sources) that were then were chosen for genetic variation assessment based on polymorphisms among the selected samples for both MRQ74 and MR269. Assessments of genetic variability through ISSR marker revealed significant differences between controls and those treated with AsA and BG. These findings are expected to contribute in understanding of the relationship between the physiological and anatomical structure as well as molecular data for epigenetic regulation of salinity tolerance in both rice varieties for developing new traits to enhance tolerance in Malaysian rice varieties.

ABSTRAK

Kemasinan merupakan salah satu masalah utama yang mengganggu proses metabolic dalam tumbuhan dan seterusnya menghadkan pengeluaran penghasilan tanaman. Objektif utama kajian ini adalah untuk mewujudkan dan membangunkan protokol pertumbuhan semula secara langsung dan tidak langsung. Ini bertujuan bagi mendapatkan tahap penerimaan kemasinan pada dua jenis varieti padi tempatan MRQ74 dan MR269 melalui teknik *in vitro*. Kemudiannya variasi genetik digunakan melalui kaedah penanda inter-simple sequence repeat (ISSR). Kepekatan 200mM NaCl telah digunakan untuk mewujudkan keadaan tekanan kemasinan pada medium pertumbuhan secara *in vitro* ini. Kaedah *in vitro* ini juga dijalankan untuk menilai potensi penggunaan pelbagai kepekatan asid askorbik (AsA) dan polisakarida beta glukon (BG) secara luaran untuk mengurangkan kesan tekanan ke atas biji benih dan kalus bagi kedua-dua jenis padi. Pemilihan ke atas tahap tertinggi aktiviti enzim antioksidan dan proline dalam biji benih dan kalus telah dilakukan untuk menumbuhkan semula tumbuhan (secara langsung dan tidak langsung) dan kemudiannya di alihkan ke dalam rumah hijau untuk proses penglihatan dan penyesuaian untuk menghasilkan generasi tumbuhan F1. Untuk mengesahkan kestabilan tahap penerimaan kemasinan yang diperolehi tumbuhan, benih F1 yang dipilih dari kedua-dua sumber tersebut dicambahkan di dalam rumah kaca bagi mendapatkan generasi F2 di bawah tekanan pengairan kemasinan. Proses yang sama telah dijalankan untuk generasi F2 yang dipilih untuk menghasilkan tahap penerimaan tumbuhan F3. Benih dari generasi F3 terpilih kemudiannya dibandingkan dengan induk. Pemilihan generasi F3 ini adalah berdasarkan kepada penilaian secara molekul variasi polymorphisma DNA yang diperolehi dari varieti MRQ74 dan MR269 untuk tahap penerimaan garam melalui penanda ISSR. Hasil kajian menunjukkan bahawa anak benih dan kalus yang dicambahkan secara langsung dan tidak langsung yang didedahkan kepada tekanan garam mempamerkan pengurangan ketara dalam ciri-ciri pertumbuhan. Penemuan daripada kajian menggunakan AsA atau BG mendapati peningkatan dari aspek ciri-ciri pertumbuhan, enzim antioksidan, dan aktiviti proline. Ini membawa kepada peningkatan proses pertumbuhan semula untuk menghasilkan generasi F1 dari sumber langsung dan tidak langsung. Generasi F2 dari kedua-dua sumber ini diperolehi di bawah tekanan pengairan kemasinan menunjukkan generasi F2 daripada pertumbuhan semula tumbuhan secara tidak langsung (sumber kalus) mempunyai fenotip unggul serta ciri-ciri fisiologi dan kimia. Percambahan biji benih F2 varieti MRQ74 dan MR269 bagi mendapatkan benih generasi F3 dari sumber kalus yang dicambahkan secara tidak langsung telah dipilih untuk penilaian variasi genetik berdasarkan polimorfisme. Penilaian kepelbagaian genetik melalui penanda ISSR menunjukkan perbezaan yang signifikan di antara kawalan dan sampel yang dirawat menggunakan AsA dan BG. Penemuan ini dijangka akan menyumbang kepada pemahaman dalam hubungan antara struktur fisiologi dan anatomi serta data molekul untuk peraturan epigenetik tahap penerimaan kemasinan dalam kedua-dua jenis beras untuk membangunkan ciri-ciri baru dalam meningkatkan tahap penerimaan dalam jenis-jenis padi Malaysia.