BIOCHEMICAL STUDIES ON PRODUCTION OF EGYPTIAN COTTON PLANTS BY TISSUE CULTURE TECHNIQUE

By

HEBA AHMED MAHMOUD SHAFEI
B.Sc. (Biotechnology), Fac. Agric., Cairo Univ., 2002

THESIS
Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of

MASTER OF SCIENCE

In

Agricultural Sciences
(Biochemistry)

Department of Biochemistry
Faculty of Agriculture
Cairo University
EGYPT

2010

APPROVAL SHEET

BIOCHEMICAL STUDIES ON PRODUCTION OF EGYPTIAN COTTON PLANTS BY TISSUE CULTURE TECHNIQUE

M.Sc. Thesis
In
Agric. Sci. (Biochemistry)

By

HEBA AHMED MAHMOUD SHAFEI
B.Sc. (Biotechnology), Fac. Agric., Cairo Univ., 2002

Approval Committee

Dr. ALIA AWAD MAHMOUD NAMICH.....
Head of Researcher of Plant Physiology, Cotton Research Institute, ARC

Dr. ABD EL-KADER MOURSY ABD EL-SAMAD.....
Professor of Biochemistry, Fac. Agric., Cairo University

Dr. MAHMOUD MOHAMED SAKR.....
Researcher Professor of Plant Biotechnology, National Research Center

Dr. ABD EL-MONEM MOHAMED NAGUIB.....
Professor of Biochemistry, Fac. Agric., Cairo University

Date: / / 2010

SUPERVISION SHEET

BIOCHEMICAL STUDIES ON PRODUCTION OF EGYPTIAN COTTON PLANTS BY TISSUE CULTURE TECHNIQUE

M.Sc. Thesis
In
Agric. Sci. (Biochemistry)

By

HEBA AHMED MAHMOUD SHAFEI
B.Sc. (Biotechnology), Fac. Agric., Cairo Univ., 2002

SUPERVISION COMMITTEE

Dr. ABD EL-MONEM MOHAMED NAGUIB
Professor of Biochemistry, Fac. Agric., Cairo University

Dr. GABER MOHAMED GOMAH SHEHAB
Assistant Professor of Biochemistry, Fac. Agric., Cairo University

Dr. MAHMOUD MOHAMED SAKR
Researcher Professor of Plant Biotechnology, NRC

DEDICATION

I dedicate this work to the soul of my father, my mother, my brothers, my sisters, sons of my brothers and sisters.

ACKNOLWEDGEMENT

I would like to express my most sincere gratitude and deep appreciation to ***Dr. Abd El-Monem Mohamed Naguib*** *Professor of Biochemistry, Faculty of Agriculture, Cairo University, for his supervision, guidance, great interest, encouragement, and continuous criticism throughout this work.*

Great thanks for ***Dr. Osama Mohamed El-Shihy*** *Professor of Plant Physiology, Faculty of Agriculture, Cairo University and Director of Plant Biotechnology Research Laboratory, for providing all facilities during the practical part of this work.*

Sincere thanks for ***Dr. said Abd El-Twab Hamoda*** *doctor researcher of the Cotton Research Institute (CRI), Agriculture Research Center (ARC), for help in statistical analysis.*

Sincer thanks to ***Dr. Mahmoud Mohamed Sakr*** *Researcher Professor of National Research Center, Dokki of sharing in supervision.*

Sincere gratitude and deep appreciation to ***Dr. Gaber Mohamed Gomah Shehab*** *assistant doctor of Biochemistry, Faculty of Agriculture, Cairo University, for his supervision and continuous criticism throughout this work.*

Special deep appreciation is given to the soul my father, my mother, my brother, my sisters, sons of my brothers and sisters.

Many thanks are due to friends and all members of Plant Biotechnology Research Laboratory, Faculty of Agriculture, Cairo, University.

دراسات كيميائية حيوية على إنتاج نباتات القطن المصرى
باستخدام تقنية زراعة الأنسجة

رسالة ماجستير
في العلوم الزراعية
(كيمياء حيوية)

مقدمة من

هبه أحمد محمود شافعى

بكالوريوس في العلوم الزراعية (تكنولوجيا حيوية)- كلية الزراعة - جامعة القاهرة ، ٢٠٠٢

لجنة الإشراف

دكتور/ عبد المنعم محمد نجيب
أستاذ الكيمياء الحيوية- كلية الزراعة - جامعة القاهرة

دكتور/ جابر محمد جمعه شهاب
أستاذ الكيمياء المساعد - كلية الزراعة - جامعة القاهرة

دكتور/ محمود محمد صقر
أستاذ باحث التكنولوجيا الحيوية – المركز القومى للبحوث

دراسات كيميائية حيوية على إنتاج نباتات القطن المصرى
باستخدام تقنية زراعة الأنسجة

رسالة ماجستير
في العلوم الزراعية
(كيمياء حيوية)

مقدمة من

هبه أحمد محمود شافعى

بكالوريوس في العلوم الزراعية (تكنولوجيا حيوية)- كلية الزراعة - جامعة القاهرة ، ٢٠٠٢

لجنة الحكم

دكتور/ عالية عوض محمود ناميش .....
رئيس بحوث فسيولوجيا النبات – معهد بحوث القطن – مركز البحوث الزراعية

دكتور/ عبد القادر مرسى عبد الصمد .....
أستاذ الكيمياء الحيوية – كلية الزراعة – جامعة القاهرة

دكتور/ محمود محمد صقر .....
أستاذ باحث التكنولوجيا الحيوية النباتية – المركز القومى للبحوث

دكتور/ عبد المنعم محمد نجيب .....
أستاذ الكيمياء الحيوية – كلية الزراعة – جامعة القاهرة

التاريخ / /٢٠١٠

دراسات كيميائية حيوية على إنتاج نباتات القطن المصرى
باستخدام تقنية زراعة الأنسجة

رسالة مقدمة من

هبه أحمد محمود شافعى

بكالوريوس في العلوم الزراعية (تكنولوجيا حيوية)- كلية الزراعة - جامعة القاهرة ، ٢٠٠٢

للحصول على درجة

ماجستير

في

العلوم الزراعية
(كيمياء حيوية)

قســـــم الكيمياء الحيوية
كليـــــة الزراعـــة
جـامعــة القــاهرة
مصـــــــر

٢٠١٠

Name of Candidate: Heba Ahmed Mahmoud Shafei **Degree:** M.Sc.
Title of Thesis: Biochemical Studies on Production of Egyptian Cotton plants by Tissue Culture Technique.
Supervisors: Dr. Abd El-Monem Mohamed Naguib
Dr. Mahmoud Mohamed Sakr
Dr. Gaber Mohamed Gomah Shehab
Department: Biochemistry.
Branch: - **Approval:** / / **2010**

ABSTRACT

Gene transfer technology is an attractive means for introduction of foreign genes into cotton. This technology requires an effective plant regeneration system. This study was aimed to develop a high frequency shoot regeneration technique from cotyledonary nodes and shoot apex of Egyptian Cottons (*Gossypium barbadense* L.). Shoot proliferation from different explants of seven Egyptian cotton varieties namely: Giza 45, Giza 70, Giza 83, Giza 86, Giza 88, Giza 89 and Giza 90 was studied in vitro. The proliferation was carried out on B_5 Gamberg medium supplemented with different cytokinins (6 combinations). The results indicated that the addition of cytokinins in the medium induced the number of produced shoots compared to the control, however differences based on the cytokinin type and concentration and nature of the explants were observed. Cotyledonary nodes produced higher number of shoots compared to shoot apex of the same vareity. The cotyledonary nodes and shoot apex explants of the Giza 70 produced higher numbers of shoots compared to the other varieties. The best medium for the proliferation of cotton from cotyledonary nodes of all the tested varieties was the medium supplemented with 3 mgl^{-1} Kin (M1), while the combination of 1 mgl^{-1} Kin and 1 mgl^{-1} 2ip (M6) gave the highest number of shoots per shoot apex compared to the other hormonal combinations. The isolated shoots were rooted on basal medium supplemented with α-naphthaleneacetic acid and were transferred to acclimatization on mixture of soil and peat moss (1:1) under nonsterile conditions.

The present study aimed also to regenerate cotton plantlets via somatic embryogenesis. Callus induction from different explants roots, hypocotyls, cotyledonary nodes and cotyledonary leaves of three Egyptian cotton varieties namely: Giza 70, Giza 86 and Giza 88. The hypocotyls gave the highest callus induction with the three varieties tested. Also, The treatment containing 0.1 mgl^{-1} 2,4D + 0.5 mgl^{-1} 2ip (C1) in medium gave the highest frequency of callus induction of all the tested varieties. The embryogenic callus produced different shapes; compact callus, callus with red colour which may be due to anthocyanin formation. RAPD analysis showed that Giza 45 revealed more stability (100%) than Giza 86 which revealed less stability (61%).

Key words: cotton, cotyledonary nodes, *Gossypium barbadense*, proliferation, propagation, regeneration, shoot apex, callus, RAPD.

ABBREVIATIONS

MS	Murashig and Skoog's basal medium (1962)
BA	6-benzyladenine
2ip	(τ-τ dimethylallayl-amino)-purine
2,4-D	2,4-dichlorophenoxyacetic acid
KT	kinetin
B5	Gamborg et al. medium (1968)
NAA	α-naphthalene acetic acid
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
DNA	Deoxyribonucleic acid
PCR	Polymers Chain Reaction
CTAB	Cetyl Tris-methyl Ammonium Bromide
PVP	Poly Vinyl Polyrolidone
rpm	Round per minute
TE buffer	Tris-EDTA buffer
RNA	Ribonuceic acid
RNase	Ribonuclease
TBE buffer	Tris, Boric acid, EDTA buffer
bp	Base pair(s)
M	Marker
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate

اسم الطالب: هبه أحمد محمود شافعى **الدرجة:** الماجستير

عنوان الرسالة: دراسات كيميائية حيوية على إنتاج نباتات القطن المصرى باستخدام تقنية زراعة الأنسجة

المشرفون : دكتور : عبد المنعم محمد نجيب
دكتور : محمود محمد صقر
دكتور : جابرمحمد جمعة شهاب

قسم: الكيمياء الحيوية **فرع:** - **تاريخ منح الدرجة:** / /٢٠١٠

المستخلص العربي

تعنى تكنولوجيا نقل الجينات النباتية ادخال جينات جديدة بداخل نبات القطن وبالطبع تحتاج هذه التكنولوجيا الى الوصول الى أفضل تقنية لإنتاج نباتات جديدة باستخدام زراعة الأنسجة ولذلك كان الهدف من هذه الدراسة هو انتاج أعلى عدد من النباتات الجديدة باستخدام جزئين نباتين هما القمم النامية والفلقات للقطن المصرى. أشتملت هذه التجربة على ٧ أصناف هى جيزة ٤٥ ، جيزة ٧٠ ، جيزة ٨٣ ، جيزة ٨٦ ، جيزة ٨٨ ، جيزة ٨٩ و جيزة ٩٠ . حيث تم زراعة الأجزاء النباتية المختلفة على بيئة B5 تشتمل على ٦ توليفات من السيتوكينن المختلفة. وقد أوضحت النتائج أن المعاملات المختلفة أعطت عدد أعلى من النباتات الجديدة مقارنةً بالبيئة التى لم يُضاف اليها أى منظمات نمو. وأوضحت أيضاً أن الفلقات أعطت عدد أكبر من النباتات مقارنةً بالقمم النامية لنفس النبات، كما أوضحت النتائج أيضاً أن الفلقات والقمم النامية للصنف جيزة ٧٠ أعطت أعلى عدد من النباتات الجديدة مقارنةً بالأصناف الأخرى. وكانت المعاملة التى تحتوى ٣ ملجم كينيتين هى أفضل معاملة حيث أعطت عدد أكبر من النباتات الجديدة مع الفلقات مقارنةً بالمعاملة التى تحتوى على ١ ملجم كينيتين + ١ ملجم 2ip والتى أعطت عدد أكبر من النباتات مع القمم النامية. وبعد ذلك تم نقل النباتات التى كونت جذور على بيئة تحتوى نفثالين اسيتك اسيد الى خليط من الرمل والبيت موس بنسبة ١:١ تحت ظروف غير معقمة.

وفى دراسة أخرى أيضاً الهدف منها عمل إكثار ولكن من خلال الأجنة الجسدية تم أنتاج الكالس من أجزاء مختلفة من النبات مثل الجذور، السيقان، الفلقات والأوراق الفلقية لثلاثة من أصناف القطن المصرى وهى جيزة ٧٠، جيزة ٨٦ وجيزة ٨٨. السيقان كانت أعلى أنتاج للكالس لكل الأصناف التى تم أختبارها حيث أعطى الكالس الجنينى أشكال مختلفة وهى كالس متماسك، كالس أحمر اللون، كالس دون تحول وكل هذه الأشكال لم تعطى أى نباتات جديدة. أوضحت نتائج البصمة الوراثية باستخدام الربد ان الثبات الوراثى فى النباتات الناتجة من زراعة الأنسجة فى صنف جيزة ٤٥ كانت ١٠٠% و ٦١% فى جيزة ٨٦ وبالتالى أمكانية استخدام هذه التقنية بنجاح فى النقل الجينى للصنف جيزة ٤٥.

الكلمات الدالة: القطن، الفلقات، القطن المصرى، الأكثار الدقيق، االقمم النامية والبادئات العشوائية.

CONTENTS

	Page
INTRODUCTION	**1**
REVIEW OF LITERATURE	**5**
1. Production of cotton varieties	**5**
a. Breeding	**5**
b. Biotechnology and transgenic plant	**6**
1. Tissue culture	**16**
a. Embryogenesis	**21**
b. Organogenesis	**35**
c. Protoplasts	**39**
2. Rooting	**41**
2. Random Amplified Polymorphic DNA	**43**
MATERIALS AND METHODES	**49**
1. Direct regeneration of shoots from cotyledonary nodes and shoot apex	**49**
a. Plant material	**49**
b. Seeds sterilization and germination	**50**
c. Shoot induction and multiplication	**50**
d. Rooting of shoots	**52**
e. Acclimatization	**52**
2. Regeneration of shoots from callus Induction	**53**
a. Plant material	**53**
b. Seeds sterilization and regeneration	**53**
c. Callus induction	**53**
d. Somatic embryogenesis	**54**
3. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)	**55**
a. Genomic DNA extraction and Purification	**55**
b. Estimation of DNA quantity and quality	**57**
c. RAPD- PCR Reactions	**57**
d. Thermocycling profile and detection of the PCR products	**59**
e. Gel electrophoresis	**59**
1. Agarose gel components	**59**
2. Sample components	**59**
4. Statistical analysis	**60**

RESULTS AND DISCUSSION..... **61**
1. Seeds sterilization and germination..... **61**
2. Direct regeneration of shoots from cotyledonary nodes and shoot apex..... **62**
a. Shoot induction and multiplication..... **62**
b. Rooting of shoots..... **75**
c. Acclimatization..... **76**
3. Regeneration of shoots from callus induction..... **77**
a. Callus induction..... **77**
b. Somatic embryogenesis **85**
4. Identification of regenerated plants developed from cotyledonary nodes and shoot apex of Egyptian cotton using RAPD-PCR analysis..... **87**
a. RAPD polymorphism of Giza45..... **87**
b. RAPD polymorphism of Giza70..... **88**
c. RAPD polymorphism of Giza83..... **89**
d. RAPD polymorphism of Giza86..... **92**
e. RAPD polymorphism of Giza88..... **93**
f. RAPD polymorphism of Giza89..... **93**
g. RAPD polymorphism of Giza90..... **94**
SUMMARY..... **96**
REFERENCES..... **106**
ARABIC SUMMARY

LIST OF TABLES

No	Title	Page
1.	List of cotton varieties used in the study, their pedigree, staple length and the location in which they are cultivars.....	49
2.	Nutritional components of plant tissue culture media.....	51
3.	The hormone combination in the induction media of shoots and multiplication.....	52
4.	The hormone combination in the induction media of callus.....	54
5.	Sequence of the primers used in RAPD-PCR.....	58
6.	Effect of varieties on number of shoots.....	63
7.	Effect of varieties on number of shoots per explants.....	65
8.	Effect of media on the number of shoots per explants.....	67
9.	Effect of the media on cotyledonary nodes of all varieties.....	70
10	Effect of the media on shoot apex of all varieties.....	73
11	Effect of the varieties on callus induction (gram/explants).....	79
12	Effect of the media on callus induction (gram/explants).....	81
13	Effect of media on the explants of callus induction from all varieties.....	83

14	Number of amplified DNA bands of Giza45 as well as percentage of polymorphism generated by six primers.……..……..….	88
15	Number of amplified DNA bands of Giza70 as well as percentage of polymorphism generated by six primers.……..……....	88
16	Number of amplified DNA bands of Giza83 as well as percentage of polymorphism generated by six primers.……..……..	89
17	Number of amplified DNA bands of Giza86 as well as percentage of polymorphism generated by six primers.……..……..	92
18	Number of amplified DNA bands of Giza88 as well as percentage of polymorphism generated by six primers.……...……..…..…	93
19	Number of amplified DNA bands of Giza89 as well as percentage of polymorphism generated by six primers.……...…..……..	95
20	Number of amplified DNA bands of Giza90 as well as percentage of polymorphism generated by six primers.……..……..……..	95