IN VITRO PRODUCTION OF VIRUS FREE GRAPEVINE PLANTS AND GENETIC IMPROVEMENT OF ROOTSTOCKS FOR SALINITY TOLERANCE USING BIOTECHNOLOGY TECHNIQUES

By

MOHAMMAD MORSHED AKAD AL-DHAHER

B.Sc. Agric. Sci. (Horticulture), Fac. Agric., Aleppo Univ., 1998

M.Sc. Agric. Sci. (Pomology), Fac. Agric., Cairo Univ., 2005

THESIS

Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of

DOCTOR OF PHILOSOPHY

In

Agricultural Sciences

(Pomology)

Department of Pomology

Faculty of Agriculture

Cairo University

Egypt

2010

APPROVAL SHEET

IN VITRO PRODUCTION OF VIRUS FREE GRAPEVINE PLANTS AND GENETIC IMPROVEMENT OF ROOTSTOCKS FOR SALINITY TOLERANCE USING BIOTECHNOLOGY TECHNIQUES

Ph.D. Thesis
In
Agric. Sci. (Pomology)

By

MOHAMMAD MORSHED AKAD AL-DHAHER
B.Sc. Agric. Sci. (Horticulture), Fac. Agric., Aleppo Univ., 1998
M.Sc. Agric. Sci. (Pomology), Fac. Agric., Cairo Univ., 2005

Approval Committee

Dr. IBRAHIM ABD EL-MAKSOUD IBRAHIM……………..…
Professor of Plant Biotechnology, Genetic Eng. and Biotech. Res. Inst., Menofia University

Dr. AHMAD TAWFEK SALEM…..…………………...………………
Professor of Pomology, Fac. Agric., Cairo University

Dr. AMINA HAMED JOMAA ……...........................………………....
Professor of Pomology, Fac. Agric., Cairo University

Dr. MOHAMMAD AHMAD FAYEK …..
Professor of Pomology, Fac. Agric., Cairo University

Date: 28 / 6 / 2010

SUPERVISION SHEET

IN VITRO PRODUCTION OF VIRUS FREE GRAPEVINE PLANTS AND GENETIC IMPROVEMENT OF ROOTSTOCKS FOR SALINITY TOLERANCE USING BIOTECHNOLOGY TECHNIQUES

Ph.D. Thesis
In
Agric. Sci. (Pomology)

By

MOHAMMAD MORSHED AKAD AL-DHAHER

B.Sc. Agric. Sci. (Horticulture), Fac. Agric., Aleppo Univ., 1998
M.Sc. Agric. Sci. (Pomology), Fac. Agric., Cairo Univ., 2005

SUPERVISION COMMITTEE

Dr. MOHAMMAD AHMAD FAYEK
Professor of Pomology, Fac. Agric., Cairo University

Dr. AMINA HAMED JOMAA
Professor of Pomology, Fac. Agric., Cairo University

Dr. ABD-EL-BASET AHMAD SHALABY
Head Researcher of Virus and Phytoplasma, Plant Pathology Research Institute, ARC, Giza

Name of Candidate: Mohammad Morshed Akad Al-Dhaher
Degree: Ph. D.
Title of Thesis: *In Vitro* Production of Virus Free Grapevine Plants and Genetic Improvement of Rootstocks for Salinity Tolerance Using Biotechnology Techniques
Supervisors: Dr. Mohammad Ahmad Fayek
Dr. Amina Hamed Jomaa
Dr. Abd-El-Baset Ahmad Shalaby
Department: Pomology
Branch: - **Discussion date: 28 / 6 / 2010**

ABSTRACT

This investigation was carried out for purification of grapevine from both viruses GLRaV-1 and GFLV, micropropagation of four grapevine *Vitis vinifera* L. cultivars (Thompson Seedless, Flame Seedless, Superior and Crimson) and eight rootstocks (Harmony, Freedom, Dog Ridge, 1103 Paulsen, 140 Ruggeri, Teleki 5C, SO4 and Salt Creek) using shoot tip culture. The four types of cytokinins BAP, Kinetin (Kin), Zeatin (Z), and Thidiazuron (TDZ) were tested at various concentrations on the multiplication stage. Three types of auxins IAA, IBA and NAA were tested at various concentrations too on the rooting stage. Moreover, Gamma irradiation at 0, 10, 20, 30, 40, or 50 Gy were experimented on virus free shoot tips as a mean for inducing salinity tolerance of rootstocks. Sea salts (0, 1000, 2000, 3000, and 4000 ppm) were used in this study. Finally, micrografting of Superior cultivar on Salt Creek rootstock was also *in vitro* tested. Flame Seedless produced the highest average of shoots number per explant. Meanwhile, Superior and Thompson Seedless gave the highest average of shoot length and leaves number per explant. Zeatin and BAP were the most effective cytokinins. The highest average of shoots number was obtained at 4 µM cytokinin in cultivars and 10 µM in rootstocks. In contrast, the low concentrations (1 and 2 µM) produced the highest average of shoot length and leaves number per explant. Thompson Seedless and Harmony had produced the highest roots number. NAA at 5 or 1 µM had high efficiency among those tested for rooting. Explants of 1103 Paulsen and Salt Creek rootstocks had given the highest survival rate after Gamma-rays treatment. LD_{50} was estimated at 50 Gy Gamma-rays for all rootstocks except 1103 Paulsen. The obtained results indicated that the gradual increase in sea salts level caused a significant increase in all organic components (total soluble sugars, proline, free amino acids and total soluble phenols). Salt Creek had the highest total soluble sugars, proline, free amino acids, and total soluble phenols. Gamma-rays at 10 and 20 Gy with or without sea salts improved rootstocks growth. Irradiated Salt Creek explants with 30 Gy displayed genetic variation depending on the RAPD-PCR analysis compared to the control. N, P, K, and Mg concentrations as well as K/Na ratio in the scion and rootstock decreased under salt stress conditions, while, Na, Cl and Ca concentrations were increased in scion leaves and rootstock roots. Salt Creek roots constrained large amount of sodium and its concentration in scion shoots was only one third (1/3) of roots content. In the same trend, rootstock roots accumulated double amount of chloride in comparison to scion shoots content.

Key words: Grape, Meristem tip, Purification, Salinity, Fingerprint and Micrografting

DEDICATION

I dedicate this work to whom my heart felt thanks; to the memory of my departed father; my mother; my brothers and sisters; my wife and my two life flowers Ahmad & Omar for their patience and for all the support they lovely offered along the period of my post graduation.

ACKNOWLEDGEMENT

I wish to express my sincere thanks, deepest gratitude and appreciation to ***Dr. Mohammad Ahmad Fayek*** *Professor of Pomology, Faculty of Agriculture, Cairo University for his supervision, suggesting the problem, his continuous and valuable suggestion during this study and for revision the manuscript of this thesis.*

The author also wishes to express his appreciation to ***Dr. Amina Hamed Gomaa*** *Professor of Pomology, Faculty of Agriculture, Cairo University for her valuable and continued assistance, great support during all steps of the study and for her guidance through the course of study.*

Sincere thanks and gratitude to ***Dr. Abd-El-Baset Ahmad Shalaby*** *Head Researcher of Virus and Phytoplasma, Plant Pathology Research Institute, Agriculture Research Center, Giza for sharing in supervision, his great help, progressive criticism and encouragement at all stages of the work.*

Great acknowledgments are also extended to all members of the Virus Research Laboratory, for their truly co-operation and for providing facilities needed to make this work possible.

Also, special deep appreciation is given to the dear ***twine*** *countries* ***Syria*** *and* ***Egypt*** *(****Sygypt****).*

انتاج نباتات عنب خالية من الفيرس معملياً والتحسين الوراثي للأصول لتحمل الملوحة باستخدام التقنيات الحيوية

رسالة مقدمة من

محمد مرشد عقاد الظاهر

بكالوريوس في الهندسة الزراعية (بساتين) - كلية الزراعة - جامعة حلب ، ١٩٩٨
ماجستير في العلوم الزراعية (فاكهة) - كلية الزراعة - جامعة القاهرة ، ٢٠٠٥

للحصول على درجة

دكتور الفلسفة

في

العلوم الزراعية
(فاكهة)

قسم الفاكهة
كلية الزراعة
جامعة القاهرة
مصر

٢٠١٠

انتاج نباتات عنب خالية من الفيرس معملياً والتحسين الوراثي للأصول لتحمل الملوحة باستخدام التقنيات الحيوية

رسالة دكتوراه الفلسفة
في العلوم الزراعية
(فـاكـهـة)

مقدمة من

محمد مرشد عقاد الظاهر

بكالوريوس في الهندسة الزراعية (بساتين) - كلية الزراعة - جامعة حلب ، ١٩٩٨
ماجستير في العلوم الزراعية (فـاكـهـة) - كلية الزراعة - جامعة القاهرة ، ٢٠٠٥

لجنة الحكم

دكتور/ ابراهيم عبد المقصود ابراهيم .....
أستاذ التكنولوجيا الحيوية للنبات – معهد بحوث الهندسة الوراثية والتكنولوجيا الحيوية – جامعة المنوفية

دكتور/ أحمد توفيق سالم .....
أستاذ الفاكهة – كلية الزراعة – جامعة القاهرة

دكتور/ أمينة حامد جمعة .....
أستاذ الفاكهة – كلية الزراعة – جامعة القاهرة

دكتور/ محمد أحمد فايق .....
أستاذ الفاكهة – كلية الزراعة – جامعة القاهرة

التاريخ: ٢٨ / ٦ / ٢٠١٠

انتاج نباتات عنب خالية من الفيرس معملياً والتحسين الوراثي للأصول لتحمل الملوحة باستخدام التقنيات الحيوية

رسالة دكتوراه الفلسفة
في العلوم الزراعية
(فـاكـهـة)

مقدمة من

محمد مرشد عقاد الظاهر

بكالوريوس في الهندسة الزراعية (بساتين) ـ كلية الزراعة ـ جامعة حلب ، ١٩٩٨
ماجستير في العلوم الزراعية (فـاكـهـة) ـ كلية الزراعة ـ جامعة القاهرة ، ٢٠٠٥

لجنة الإشراف

دكتور/ محمد أحمد فايق
أستاذ الفاكهة – كلية الزراعة – جامعة القاهرة

دكتور/ أمينة حامد جمعة
أستاذ الفاكهة – كلية الزراعة – جامعة القاهرة

دكتور/ عبد الباسط أحمد شلبي
رئيس بحوث الفيروس والفيتوبلازما– معهد بحوث أمراض النبات– مركز البحوث الزراعية

اسم الطالب: محمد مرشد عقاد الظاهر **الدرجة:** دكتور الفلسفة

عنوان الرسالة: انتاج نباتات عنب خالية من الفيرس معملياً والتحسين الوراثي للأصول لتحمل الملوحة باستخدام التقنيات الحيوية

المشرفون : دكتور: محمد أحمد فايق
دكتور: أمينة حامد جمعة
دكتور: عبد الباسط أحمد شلبي

قسم: الفاكهة **فرع:** - **تاريخ المناقشة:** ٢٨ / ٦ / ٢٠١٠

المستخلص العربي

أجريت هذه الدراسة لتنقية صنف العنب فليم اللابذري من الإصابة الفيروسية ثم إكثاره معملياً. كذلك الإكثار المعملي الدقيق بزراعة القمة الميرستيمية لعدة أصناف عنب لابذرية (تومبسون، فليم، سوبيريور وكريمسون) مع الأصول الرئيسية المتوافرة (هارموني، فريدم، دوج ريدج، بولسن ١١٠٣، روجيري ١٤٠، تيليكي، SO4 وسالت كريك) باستخدام أربعة أنواع من السيتوكينين هي بنزيل أمينو بيورين وكينيتين وزياتين وثيديزيرون وبعدة تراكيزلكل منها خلال مرحلة التضاعف ، واستخدمت أيضاً ثلاثة أنواع من الأوكسين هي حمض الأندول الخلي وحمض الأندول البيوتيري ونفتالين حمض الخل وبعدة تراكيز خلال مرحلة التجذير. كما عرّضت عزلات أربعة من الأصول هي روجيري، بولسن، SO4 و سالت كريك بعد ذلك لعدة جرعات من أشعة جاما هي ٠ – ١٠ – ٢٠ – ٣٠ – ٤٠ و ٥٠ جراي كوسيلة مساعدة في انتاج طرز وراثية أكثر تحملاً للملوحة بالانتخاب على بيئة أملاح البحربتراكيز ٠، ١٠٠٠، ٢٠٠٠، ٣٠٠٠ و ٤٠٠٠ جزء بالمليون. وتم إجراء تطعيم دقيق لصنف السوبيريور على أصل سالت كريك لتقييم إمكانية التوافق وتحمل الطعم للملوحة. وأشارت النتائج إلى أن الصنف فليم سيدليس قد أعطى أكبر عدد ممكن من الأفرع الجانبية بينما أطول النموات وأكثرها أوراقاً فكانت لنموات صنفي السوبيريور والتومبسون. أثبت الزياتين والبنزيل أمينو بيورين بأنهما أفضل السيتوكينينات في تأثيرهما على معدل التضاعف للأصناف عند تركيز ٤ ميكرومول وللأصول عند تركيز ١٠ ميكرومول. وعلى النقيض من ذلك أعطت التراكيز المنخفضة (١ و ٢ ميكرومول) أفضل طول وعدد أوراق للنمو، أفضل معدل تجذير حققه صنف تومبسون وأصل الهارموني بوجود ٥ أو ١ ميكرومول نفتالين حمض الخل. أعلى نسبة بقاء للعزلات التي تعرضت للإشعاع كانت لأصلي بولسن وسالت كريك وتم حساب الجرعة الحدية المميتة فكانت عند ٥٠ جراي لجميع الأصول باستثناء بولسن. وقد أظهرت النتائج أن الزيادة التدريجية في تركيز أملاح البحر تتناسب طرداً مع تكوين مركبات الحماية العضوية (السكريات الكلية الذوابة، البرولين، الأحماض الأمينية الحرة والفينولات). ووجد بأن أعلى تركيز من السكريات الكلية الذّوّابة والبرولين والأحماض الأمينية الحرة والفينولات الكلية الذوابة قد تراكمت في نموات الأصل سالت كريك الخضرية. تحسن نمو الأصول عند تعرض العزلات لأشعة جاما بجرعة ١٠ أو ٢٠ جراي مع أو بدون الملوحة. وقد أظهرت نموات الأصل سالت كريك المتعرضة ل٣٠ جراي من أشعة جاما اختلافاً وراثياً عند اجراء أحد اختبارات البصمة الوراثية (RAPD) مقارنة مع نباتات معاملة الشاهد التي لم تتعرض للإشعاع. وقد تناقصت تراكيز الآزوت والفوسفور والبوتاسيوم والمغنزيوم ونسبة البوتاسيوم للصوديوم في كلٍ من الطعم والأصل تحت ظروف الاجهاد الملحي بينما ازداد تركيز الصوديوم والكلور والكالسيوم في جذور الأصل وأوراق الطعم، وقد احتجزت جذور الأصل سالت كريك ثلاثة أضعاف محتوى أوراق الطعم من الصوديوم وضعف محتواها من الكلور.

الكلمات الدالة : عنب، قمة ميرستيمية، تنقية، ملوحة، بصمة وراثية، تطعيم دقيق.

CONTENTS

	Page
INTRODUCTION	**1**
REVIEW OF LITERATURE	**9**
1. Virus elimination experiment	**9**
2. Micropropagation experiment	**11**
a. Multiplication stage	**12**
b. Rooting and acclimatization stages	**27**
3. The experiment of inducing and increasing salinity tolerance	**32**
a. Induction stage	**32**
b. Increasing salinity tolerance stage	**40**
4. *In vitro* micrografting technique	**55**
a. Proportion of successful graft unions	**59**
b. Effect of rootstocks on scions	**61**
MATERIALS AND METHODS	**63**
1. Virus elimination experiment	**63**
a. Collection and maintenance of viral cultures	**63**
b. Virus detection of naturally infected and *in vitro* grown plants	**63**
c. *In vitro* culture conditions	**66**
d. Statistical analysis and studied parameters	**67**
2. Micropropagation experiment	**68**
a. Multiplication stage	**68**
b. Rooting and acclimatization stages	**73**
3. The experiment of inducing and increasing salinity tolerance	**77**
a. Induction stage	**77**
b. Increasing salinity tolerance stage	**80**
4. *In vitro* micrografting technique	**88**
a. Plant material for micrografting	**88**
b. Micrografting procedure	**89**
c. Rooting of micrografted plantlets	**90**
d. Determination of mineral elements	**90**
e. Determination of anions	**92**
f. Acclimatization of micrografted plantlets	**92**
g. Experimental design and statistical analysis	**93**
RESULTS AND DISCUSSION	**95**

1. Virus elimination experiment..... **95**
a. The effect of cytokinin concentration and explant size **95**
b. Virus detection..... **101**
c. Effect of meristem size on virus elimination **101**
2. Micropropagation experiment **105**
a. Multiplication stage **106**
b. Rooting and acclimatization stages..... **128**
3. The experiment of inducing and increasing salinity tolerance..... **145**
a. Gamma-rays effect on *in vitro* survival rate of grape rootstocks..... **145**
b. Gamma-rays and sea salts effect on growth parameter **146**
c. Gamma-rays and sea salts effect on the accumulation of some organic components in grapevine rootstocks shoots..... **164**
d. Molecular genetic identification using RAPD technique..... **182**
4. *In vitro* micrografting technique..... **189**
a. Rootstock effect on scion fresh and dry weight..... **190**
b. Rootstock effect on mineral accumulation in scion..... **194**
CONCLUSION..... **203**
SUMMARY **205**
REFERENCES **217**
ABBREVIATIONS..... **257**
ARABIC SUMMARY

LIST OF TABLES

No.	Title	Page
1.	Composition of commonly used tissue culture nutrient media (WP and MS) supplemented with vitamins…..……..…….....……	70
2.	Experimental multiplication media with four cytokinin types at different concentrations …...……	72
3.	Experimental rooting media with three auxin types at different concentrations ……..……..……	75
4.	The exposure time to each Gamma rays dose……	78
5.	Sea salts components……..	80
6.	Combination treatments between rootstocks, Gamma-rays doses, and salinity levels ……..……	81
7.	Required parameters to calibrate the atomic absorption apparatus for each element ……..…	91
8.	The effect of explant size and cytokinin concentration on the shoots number of the virus-infected plantlets from Flame Seedless grapevine cultivar……	96
9.	The effect of explant size and cytokinin concentration on the shoots length (cm) of the virus-infected plantlets from Flame Seedless grapevine cultivar…….…...…	97
10.	The effect of explant size and cytokinin concentration on the leaves number of the virus-infected plantlets from Flame Seedless grapevine cultivar……	98

11. The effect of explant size and cytokinin concentration on the roots number of the virus-infected plantlets from Flame Seedless grapevine cultivar…… 99

12. The effect of explant size and cytokinin concentration on the roots length (cm) of the virus-infected plantlets from Flame Seedless grapevine cultivar…… 99

13. The effect of the meristem size on the production of fan leaf and leaf roll viruses-free plantlets of Flame Seedless grapevine cultivar…… 102

14. Analysis the effect of grapevine cultivars, cytokinin types and their concentrations on *in vitro* growth characters ……... 107

15. Analysis the effect of grapevine rootstocks, cytokinin types and their concentrations on *in vitro* growth characters …….. 108

16. The interaction effect of grapevine cultivars (A), cytokinin types (B) and their concentrations (C) on shoots number of *in vitro* plantlets …… 117

17. The interaction effect of grapevine cultivars (A), cytokinin types (B) and their concentrations (C) on shoots length (cm) of *in vitro* plantlets …….. 119

18. The interaction effect of grapevine cultivars (A), cytokinin types (B) and their concentrations (C) on leaves number of *in vitro* plantlets …… 121

19. The interaction effect of grapevine rootstocks (A), cytokinin types (B) and their concentrations (C) on shoots number of *in vitro* plantlets …… 123

20. The interaction effect of grapevine rootstocks (A), cytokinin types (B) and their concentrations (C) on shoots length (cm) of *in vitro* plantlets …….. 125

21. The interaction effect of grapevine rootstocks (A), cytokinin types (B) and their concentrations (C) on leaves number of *in vitro* plantlets …… 126

22. Effect of grapevine cultivars (A), auxin types (B) and their concentrations (C) on *in vitro* rooting …… 129

23. Effect of grapevine rootstocks (A), auxin types (B) and their concentrations (C) on *in vitro* rooting …… 130

24. The interaction effect of grapevine cultivars (A), auxin types (B) and their concentrations (C) on roots number of *in vitro* plantlets ……... 136

25. The interaction effect of grapevine cultivars (A), auxin types (B) and their concentrations (C) on roots length (cm) of *in vitro* plantlets ……. 138

26. The interaction effect of grapevine rootstocks (A), auxin types (B) and their concentrations (C) on roots number of *in vitro* plantlets ……... 140

27. The interaction effect of grapevine rootstocks (A), auxin types (B) and their concentrations (C) on roots length (cm) of *in vitro* plantlets ……. 141

28. Survival rate of *in vitro* cultured grapevine rootstock explants after irradiation with different Gamma-rays doses …….. 145

29. The effect of sea salts level and Gamma-rays dose on shoots number of *in vitro* cultured grapevine rootstocks ……... 148