Name of Candidate: Rania Ahmed Mahmoud Ahmed **Degree:** Ph.D.
Title of Thesis: *In vitro* Propagation and Stress Tolerance of Some Stone Fruit Rootstocks
Supervisors: Dr. Mohamed Ahmed Fayek
Dr. Mohamed Helmy Abd El-Zaher
Dr. Nadia Mohamed Mansour
Department: Pomology **Approval:** / /2009

ABSTRACT

This research was conducted in three main experiments. The first aimed to optimize tissue culture techniques for propagation of some stone fruit rootstocks; Meet-Ghamr, Okinawa, Nemaguard, Nemared (peach), GF677 (peach X almond) and Tetra (plum). The second was evaluating their salinity and drought tolerance. The third was molecular identification, detection of somaclonal variations and detection of molecular markers related to root-knot nematode resistance. Two explant types (shoot tip & nodal cutting) of each rootstock were used. The explants were quick immersed in 70% ethyl alcohol, then soaked in commercial bleach "Clorox" at 10 % for 20 min, for successful surface sterilization. The prepared explants were cultured on MS (Murashige and Skoog) medium supplemented with 0.01 mg/L IBA (Indolebutyric acid) and 0.2 mg/L BA (6- Benzyl adenine), as an establishment medium. During multiplication, BA at 3.0 mg/L was used only for the first two subsequent subcultures to avoid vitrification; then at 0.5 to 3.0 mg/L in the following subcultures. The rooting treatment of 2 mg/L IBA without AC gave the highest rooting % and average root length besides sufficient number of roots during the rooting stage for all rootstocks under study which was suitable for successful acclimatization. Generally, Tetra rootstock proved to be the simplest rootstock to propagate, root and acclimatize. Three kinds of salts; NaCl, Na_2So_4 or $CaCl_2$ were separetely used to induce salt stress and mannitol was used as an osmoticum to induce drought stress. Tetra rootstock seems to be more tolerant to salinity stress while GF677 rootstock is more sensitive compared to other rootstocks under investigation. On contrast, the peach-almond hybrid GF677 rootstock is more tolerant to drought stress whereas Tetra plum rootstock is more sensitive compared to other tested rootstocks. Some of stress-induced proteins, as revealed by SDS-PAGE, were synthesized for the particular stress; the 23.276 KDa protein which associated with inclusion of highest sodium salts (NaCl and Na_2SO_4) concentration in Meet-Ghamr, Okinawa, Nemaguard and GF677 rootstocks. However, certain proteins were common and synthesized under more than one type of stress; the 67.173 and 30.155 KDa proteins in Okinawa rootstock and 61.122 and 17.097 KDa proteins in Tetra rootstock which appeared as a response to both salinity and drought stresses. On the other hand, most of the disappeared proteins in stressed-Tetra rootstock were at the highest concentrations of mannitol which consider the most harmful stress to this rootstock. Thirty of the total RAPD and ISSR markers were found to be rootstock specific including both of positive and negative markers. All of the six stone fruit rootstocks had rootstock-specific markers. No detectable differences were found between the DNA fingerprints of mother plants and their analogous *ex vitro* plants after 3 months acclimatization, indicating that the studied regenerates possess high genetic stability and that the protocol used seems to be suitable for maintaining the integrity of the genome. By using SSR, STS and SCAR markers, it was suggested that, Tetra rootstock as a RKN resistant European plum (*Prunus domestica*) belongs to the subgenera Prunophora and the other tested resistant Amygdalus (peaches) might possess two different resistance systems. Therefore, more work is required for the detection of major genes involved in the RKN resistance of the Amygdalus sources.

Keywords: Stone fruit, rootstocks, tissue culture, salinity, drought, DNA.

إسم الطالب: رانيا أحمد محمود أحمد **الدرجة: دكتور الفلسفة**
عنوان الرسالة: الإكثار المعملي وتحمل الإجهاد لبعض أصول الفاكهة ذات النواة الحجرية
المشرفون : دكتور : محمد أحمد فايق
دكتور : محمد حلمي عبد الظاهر
دكتور : نادية محمد منصور
قسم: الفاكهة **تاريخ منح الدرجة:** //٢٠٠٩

المستخلص العربي

تضمن هذا البحث ثلاثة تجارب رئيسية. أجريت الأولى بهدف الوصول إلى تقنية زراعة الأنسجة المثلى لإكثار بعض أصول الفاكهة ذات النواة الحجرية وهى ميت غمر ، أوكيناوا ، نيماجارد ، نيمارد (خوخ) وGF677 (هجين خوخ مع لوز) وتيترا (برقوق). والثانية لتقييم مدى تحمل تلك الأصول للملوحة والجفاف. والثالثة لتعريف تلك الأصول على المستوى الجزيئي، الكشف عن حدوث التباينات الجسدية وتحديد كاشفات جزيئية مرتبطة بمقاومة نيماتودا تعقد الجذور. تم إستخدام نوعان من المنفصلات النباتية (القمة النامية و العقلة ذات البرعم الواحد) لكل أصل. ولآداء التعقيم السطحى بنجاح تم غمس المنفصلات النباتية غمساً سريعاً فى كحول الإيثيل (٧٠ %) ثم وضعت فى محلول كلوركس تجارى بتركيز ١٠ % لمدة ٢٠ دقيقة. زرعت المنفصلات النباتية المعقمة على بيئة بداية موراشيجى وسكوج المضاف إليها ٠،٠١ ملجم/ لتر إندول حامض البيوتريك و٠،٢ ملجم/ لتر بنزيل أدنين. تم إستخدام البنزيل أدنين بتركيز ٣ ملجم/ لتر خلال مرحلة التضاعف أثناء النقلتين الأولى والثانية فقط لتجنب حدوث الظاهرة الزجاجية وبتركيزات ٠،٥ إلى ٣ ملجم/ لتر خلال مرات النقل التالية. أعطت معاملة التجذير ٢ ملجم/ لتر إندول حامض البيوتريك فى غياب الفحم النشط أعلى نسبة مئوية للتجذير ومتوسط طول الجذور بجانب الحصول على عدد كافي من الجذور لنجاح الأقلمة. وبصفة عامة فقد أثبت أصل التيترا أنه الأسهل فى الإكثار، التجذير والأقلمة مقارنة بالأصول الأخرى محل الدراسة.

تم إستخدام ثلاثة أنواع من الأملاح (كلوريد الصوديوم، كبريتات الصوديوم وكلوريد الكالسيوم) كل على حدة لإستحداث الإجهاد الملحي فى حين تم إستخدام المانيتول لإستحداث الجفاف. بدا أصل التيترا أكثر مقاومة للملوحة بينما كان أصل GF677 هو الأكثر حساسية مقارنة بالأصول الأخرى محل الدراسة. وعلى النقيض فإن أصل GF677 الهجين بين الخوخ واللوز أكثر مقاومة للجفاف في حين أن أصل البرقوق تيترا هو الأكثر حساسية مقارنة بالأصول الأخرى قيد الدراسة. تم تخليق بعض البروتينات المستحدثة تحت ظروف الإجهاد كما أظهرها التفريد الكهربي كإستجابة لنوع معين من الإجهاد كالبروتين ذو الوزن الجزيئي ٢٣،٢٧٦ كيلو دالتون والذي إقترن بإضافة تركيز مرتفع من أملاح الصوديوم (كلوريد الصوديوم وكبريتات الصوديوم) فى الأصول ميت غمر، أوكيناوا، نيماجارد وGF677. فى حين كانت بروتينات أخرى شائعة حيث تم تخليقها تحت ظروف التعرض لأكثر من نوع من الإجهاد كالبروتينات ذات الأوزان الجزيئية ٦٧،١٧٣ و٣٠،١٥٥ كيلو دالتون فى أصل الأوكيناوا والبروتينات ذات الأوزان الجزيئية ٦١،١٢٢ و١٧،٠٩٧ كيلو دالتون فى أصل التيترا والتي ظهرت كإستجابة لكلا نوعي الإجهاد (الملوحة والجفاف). هذا ومن ناحية أخرى فقد كانت معظم البروتينات المختفية فى أصل التيترا المتعرض لظروف الإجهاد كنتيجة للمعاملة بتركيزات مرتفعة من المانيتول والذى يعتبر أكثر أنواع الإجهاد ضرراً بهذا الأصل.

وجدت ثلاثون حزمة مميزة للأصول (متضمنة حزم موجبة وسالبة) من بين الحزم الكلية المتحصل عليها بإستخدام كاشفات RAPD وISSR. هذا وقد إحتوت الأصول الستة على حزم جزيئية مميزة. لم تكتشف فروق بين البصمات الوراثية على مستوى الدنا للنباتات الأم مقارنة بمثيلاتها الناتجة معملياً خلال مرحلة الأقلمة, مشيراً إلى أن النباتات المنتجة معملياً تتمتع بثبات وراثى وأن البروتوكول المستخدم يبدو مناسباً للحصول على الجينوم (الهيئة الوراثية) مكتملاً. هذا وقد تم إقتراح أن أصل التيترا وهو برقوق أوروبي (*Prunus domestica*) مقاوم لنيماتودا تعقد الجذور وينتمي لتحت الجنس Prunophora والأصول المقاومة المختبرة الأخرى والتي تتبع تحت الجنس Amygdalus (الخوخ) ربما يتضمنان نظامان مختلفان للمقاومة وذلك بإستخدام كاشفات SSR، STS وSCAR. وبناءاً على ذلك فإن تحديد الجينات الرئيسية المسؤولة عن المقاومة فى تحت الجنس Amygdalus مازال يتطلب المزيد من الدراسة.

الكلمات الدالة: فاكهة ذات النواة الحجرية، أصول، زراعة الأنسجة، الملوحة، الجفاف، الدنا.

CONTENTS

	Page
GENERAL INTRODUCTION.....	1
Part I. *In vitro* propagation of some stone fruit rootstocks.....	
INTRODUCTION.....	4
REVIEW OF LITERATURE.....	6
1. Establishment stage.....	6
2. Multiplication stage.....	10
3. Rooting stage.....	16
4. Acclimatization stage.....	21
MATERIALS AND METHODS.....	24
1. Establishment stage.....	24
2. Multiplication stage.....	26
3. Rooting stage.....	26
4. Acclimatization stage.....	27
5. Statistical analysis.....	27
RESULTS AND DISCUSSION.....	28
1. Establishment stage.....	28
2. Multiplication stage.....	32
3. Rooting stage.....	38
4. Acclimatization stage.....	43
Part II. *In vitro* evaluation of salinity and drought tolerance of some stone fruit rootstocks.....	
INTRODUCTION.....	48
REVIEW OF LITERATURE.....	52
1. *In vitro* growth responses to salinity and drought stress.....	52
a. Salinity stress.....	52
b. Drought stress.....	56
2. SDS-PAGE protein responses to salinity and drought stress.....	59
MATERIALS AND METHODS.....	63
1. Tolerance to salinity and drought stress.....	63
a. Salinity stress.....	63
b. Drought stress.....	63

Page

2. SDS-protein electrophoresis..... 64
RESULTS AND DISCUSSION..... 69
1. *In vitro* growth responses to salinity and drought stress... 69
a. Salinity stress..... 69
b. Drought stress..... 90
2. SDS-PAGE protein responses to salinity and drought stress..... 97
Part III. Molecular identification of the stone fruit rootstocks.....
INTRODUCTION..... 122
REVIEW OF LITERATURE..... 125
1. Molecular identification..... 125
a. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)..... 125
b. Inter Simple Sequence Repeat (ISSR)..... 126
c. Simple Sequence Repeats (SSRs)..... 128
2. Detection of molecular markers related to root-knot nematode (RKN) resistance..... 132
a. Simple Sequence Repeats (SSRs)..... 133
b. Sequence Tagged Site (STS)..... 136
c. Sequence Characterized Amplified Region (SCAR)..... 138
MATERIALS AND METHODS..... 140
RESULTS AND DISCUSSION..... 148
1. Molecular identification of stone fruit rootstocks..... 148
a. Identification based on RAPD..... 148
b. Identification based on ISSR..... 161
c. Combined identification based on RAPD and ISSR-PCR analysis..... 165
2. Detection of molecular markers related to root-knot nematode (RKN) resistance..... 172
a. Simple Sequence Repeats (SSRs)..... 172
b. Sequence Tagged Site (STS)..... 179
c. Sequence Characterized Amplified Region (SCAR)..... 180
GENERAL CONCLUSION..... 183
SUMMARY..... 186
REFERENCES..... 197
LIST OF ABBREVIATIONS..... 219
ARABIC SUMMARY.

LIST OF ABBREVIATIONS

2iP	: Isopentenyladenine "6-(gamma, gamma-dimethylallylamine) purine"
ABA	: Abscisic acid
AC	: Activated charcoal
AFLP	: Amplified fragment length polymorphism
AP	: Almehdi and Parfitt
B5	: Gamborg medium
BA	: Benzyladenine
BAC	: Bacterial artificial chromosome
BN	: Bourgin and Nitsch
BSA	: Bulked segregant analysis
DKW	: Driver and Kuniyuki
IAA	: Indole-3-acetic acid
IBA	: Indole-3-butyric acid
ISSR	: Inter-simple sequence repeats
LP	: LePoivre
LS	: Linsmaier and Skoog
MAS	: Marker-assisted selection
M.S.	: Molecular size
MS	: Murashige and Skoog
MW	: Molecular weight
NAA	: Alpha-naphthaleneacetic acid
PAGE	: Polyacrylamide gel electrophoresis
PCR	: Polymerase chain reaction
PEG	: Polyethylene glycol
PP333	: Paclobutrazol
QL	: Quoirin and Lepoivre
RAPD	: Random amplified polymorphic DNA

RFLPs	: Restriction fragment length polymorphism
RKN	: Root-knot nematodes
SCARs	: Sequence characterized amplified regions
SDS	: Sodium dodecyl sulphate
SDS-PAGE	: Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis
SH	: Schenk and Hildebrandt
SSR	: Simple sequence repeats
STS	: Sequence tagged sites
UPGMA	: Unweighted Pair Group Method with Arithmetic averages
WPM	: Woody Plant Medium