PYSIOLOGICAL AND BIOTECHNOLOGICAL STUDIES ON DATE PALM MICROPROPAGATION

By

AMAL FATHY MOHAMED ZEIN EL DIN

B.Sc. Agric. Sci. (Horticulture), Fac. Agric., Cairo Univ., 1990
M.Sc. Agric. Sci. (Plant Physiology), Fac. Agric., Ain Shams Univ., 2005

THESIS

Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of

DOCTOR OF PHILOSOPHY

In

Agricultural Sciences

(Plant Physiology)

Department of Agric. Botany
Faculty of Agriculture
Cairo University
EGYPT

2010

APPROVAL SHEET

PHYSIOLOGICAL AND BIOTECHNOLOGICAL STUDIES ON DATE PALM MICROPROPAGATION

Ph.D. Thesis
In
Agric. Sci. (Plant Physiology)

By

AMAL FATHY MOHAMED ZEIN EL DIN

B.Sc. Agric. Sci. (Horticulture), Fac. Agric., Cairo Univ., 1990
M.Sc. Agric. Sci. (Plant Physiology), Fac. Agric., Ain Shams Univ., 2005

APPROVAL COMMITTEE

Dr. IBRAHIM SEIF El-DIN IBRAHIM ……..……
Professor of Plant Physiology, Fac. Agric., Ain Shams University

Dr. OSAMA M. ABDEL- HAMID EL-SHIHY……
Professor of Plant Physiology, Fac. Agric., Cairo University

Dr. ABDEL-RAHMAN MOURSY GALLAB ……..……
Professor of Plant Physiology, Fac. Agric., Cairo University

Dr. EGLAL MOHMED ZAKI HARB……..……..
Professor of Plant Physiology, Fac. Agric., Cairo University

Date: 22 / 8 / 2010

SUPERVISION SHEET

PHYSIOLOGICAL AND BIOTECHNOLOGICAL STUDIES ON DATE PALM MICROPROPAGATION

Ph.D. Thesis
In
Agric. Sci. (Plant Physiology)

By

AMAL FATHY MOHAMED ZEIN EL DIN

B.Sc. Agric. Sci. (Horticulture), Fac. Agric., Cairo Univ., 1990
M.Sc. Agric. Sci. (Plant Physiology), Fac. Agric.,
Ain Shams Univ., 2005

SUPERVISION COMMITTEE

Dr. EGLAL MOHMED ZAKI HARB
Professor of Plant Physiology, Fac. Agric., Cairo University

Dr. ABDEL-RAHMAN MOURSY GALLAB
Professor of Plant Physiology, Fac. Agric., Cairo University

Dr. ADEL-MONEM EL-BANA
Head of Research of Date palm Lab., ARC, Giza

Name of Candidate: Amal Fathy Mohamed **Degree:** Ph.D.
Title of Thesis: Physiological And Biotechnological Studies On Date palm Micropropagation
Supervisors: Dr. Eglal Mohmed Zaki Harb
Dr. Abdel- Rahman Moursy Gallab
Dr. Abdel- Moneam El- Bana
Department: Agricultural Botany
Branch: Plant Physiology **Approval: 22 / 8/ 2010**

ABSTRACT

Date palm embryogenic cultures were obtained from culturing the explants isolated from off-shoots of dry cv. Sakkoty. Embryogenic palm callus has been shown to be highly heterogeneous in nature, composed of asynchronously developing embryos. Only a small percentage of somatic embryos converted to normal plants, instead, most of them germinated precociously or exhibited abnormal morphology. Therefore, biochemical and histological analyses were studied to increase our knowledge about date palm somatic embryogenesis. Biochemical analysis showed that, embryogenic callus is distinguished by its high endogenous IAA, ABA, T.S., free amino acids, total protein and low endogenous zeatin levels. Normal individual somatic embryo contained low levels of GA_3, IAA, ABA, zeatin and zeatin riboside, T.S. and high levels of free amino acids. Precociously germinated (abortion) somatic embryo contained lower level of GA_3, IAA and high level of zeatin riboside, total protein, proline and phenol. Histological observation showed that, the nodular callus developed in the inner side of the friable callus by the formation of the meristematic cells that produced compact clusters. Longitudinal sections in normal repeated and multiple somatic embryos showed that, its distinguished by the presence of meristematic centers in its base that responsible for secondary somatic embryogenesis. Improved maturation experiments indicated that, normal individual and repeated somatic embryos are increased by adding 1.5 mg\l ABA plus 15g\l PEG, 0.5mg\l NAA plus either 0.05 or 0.1 mg\l BA, 2.5 and 5.0mg\l paclobutrazol. 300g\l Spermine and 1.0 mg\l ABA plus 10g\l phytagel.

Key words: Date palm, *Phoenix dactylifera* L., Somatic embryogenesis, Abnormality, Callus, Micropropagation, IAA, GA_3, ABA, Zeatin, PBZ, NAA, PA_s, Put, Spd, Spm and Phytagel .

DEDICATION

This work would not have been possible without continuous encouragement from my family. I thank my late mother and father, my brother and my sisters for love and support throughout my studies and in everyday life.

ACKNOWLEDGEMENT

I am grateful to my supervisor, Dr. ***Eglal Mohamed Zaki Harb*** *Professor Emeritus of Plant Physiology, Faculty of Agriculture, Cairo University for her vast knowledge, support and valuable comments are warmly appreciated.*

Dr. ***Abdel-Rahman Moursy Gallab*** *Professor of Plant Physiology, Faculty of Agriculture, Cairo University is thanked for his supervision , support and advice during my studies.*

Dr. ***Abdel-Monem El-Bana*** *Head of Research of Date palm Lab., ARC, Giza. is acknowledged for his supervision and providing excellent library facilities at the date palm Research Lab.*

I would like to express my sincere thanks to my teacher Dr. ***Ibrahim Seif El-Din Ibrahim*** *Professor of Plant Physiology, Faculty of Agriculture, Ain shams University for his teaching and support during my studies.*

I have been greatly assisted by Dr. ***Zeinab Zaid*** *Researcher in the Date Palm Tissue Culture Lab and offer my sincerest thanks to here.*

Dr. ***Sami Habib*** *Professor of Plant Botany, Faculty of Agriculture, Ain shams University and Dr.* ***Olaa Hussien*** *are acknowledged for their encouraging attitude towards my work and allowing me to use the fluorescent microscope*

Thanks too, to all staff members of Agricultural Botany Department, Plant Physiology Section, Faculty of Agriculture, Cairo University.

I would like express my heartfelt thanks to all members in the Date Palm Tissue Culture Lab for pleasant teamwork and other members whom created a warm, open atmosphere and assisted me in many ways are acknowledged.

اسم الطالب: أمال فتحى محمد زين الدين **الدرجة:** دكتوراه الفلسفة

عنوان الرسالة: دراسات فسيولوچية و بيوتكنولوچية على الأكثار الدقيق لنخيل البلح

المشرفون : **دكتور:** أجلال محمد زكى حرب
دكتور: عبدالرحمن مرسى غلاب
دكتور: عبد المنعم عبد الودود البنا

قسم: النبات الزراعى **فرع:** فسيولوچى نبات **تاريخ منح الدرجة:** ٢٢ / ٨ /٢٠١٠

المستخلص العربي

يتميز الكالس لنخيل البلح بأنه غير متجانس كذلك نجد حدوث مشكلة عدم التزامن فى تكوين الأجنة الجسدية، إلى جانب أنخفاض النسبة المئوية لتحول الأجنة الجسدية إلى نبيتات كاملة وبدلاً من هذا نجد حدوث أنبات مبكر للأجنة الخضرية أو حدوث تشوهات للأجنة. لذلك أستهدفت الدراسة إلى محاولة التعرف على الأسباب الفسيولوچية و التشريحية المعيقة لتكشف الكالس الجنينى إلى أجنة كاملة كذلك التعرف على أسباب فشل تحول الأجنة أثناء عمليات الأنبات إلى نبيتات كاملة. وقد أظهرت النتائج أن الكالس الجنينى قد أحتوى على مستويات عالية من أندول حامض الخليك، حامض الأبسيسيك ، السكريات الكلية الذائبة، الأحماض الأمنية الحرة و البروتينات الكلية و مستوى منخفض من الزياتين . أحتوى الجنين الفردى الطبيعى على مستويات منخفضة من حامض الجبريليك، أندول حامض الخليك، حامض الأبسيسيك و الزياتين و الزياتين رايبوزيد و السكريات الكلية الذائبة وعلى أحتوائه على مستوى عالى من الأحماض الأمنية الحرة. أحتوى الجنين الغير طبيعى والذى يتم أنباته مبكراً على بيئة النضج على مستويات منخفضة من حامض الجبريليك، أندول حامض الخليك و مستويات عالية من الزياتين رايبوزيد، البروتينات الكلية ، البرولين والفينول. أوضحت نتائج القطاعات التشريحية أن الكالس الجنينى العقدى ما هو الا مراكز مرستيمية نشطة يتم تكونها فى السطح الداخلى للكالس الهش وهى عبارة كالس عقدى يتكون من خلايا مرستيمية بها نواة مركزية تحتوى على نوية أو أكثر من نوية.وقد أظهرت نتا ئج القطاعات الطولية على الأجنة الطبيعية المتكررة و المتضاعفة على أنها تمتاز بأن خلايا البشرة لها خصائص الخلايا المرستيمية و هذا ما قد يفسر تكون أجنة أخرى ثانوية على الجنين الأصلى. و قد أوضحت تجارب تحسين نضج الأجنة الجسدية أن النسبة المئوية لتكون الأجنة الطبيعية الفردية و المتكررة قد زادت عند أضافة ٠.٥ ملليجرام/ لتر حامض الأبسيسيك + ١٥جم / لتر من البولى أيثيلين جليكول أو أضافة ٠.٥ مج / لتر نفثالين حامض الخليك + ٠.٠٥ أو ٠.١ مج / لتر بنزيل أدنين، أيضاً تكون الأجنة الطبيعية الفردية و المتكررة عند أضافة ٠.٥، ٢.٥ مج / لترباكلوباترازول وكذلك عند أضافة ٣٠٠ مج /لتر سبرمين وكذلك عند أضافة ١.٠مج / لتر حامض الأبسيسيك + ١٠جم / لتر فيتاجيل.

الكلمات الدالة : نخيل البلح ، تكوين أجنة جسدية ، تشوهات الأجنة، كالس، الأكثار الدقيق، أندول حامض الخليك، الزياتين، حامض الجبريليك ، حامض الأبسيسك، الباكلوباترازول، نفثالين حامض الخليك، البولى أمينات، البيوتراسين ، الأسبرميدين، الأسبرمين،الفيتاچيل.

دراسات فسيولوچية و بيوتكنولوچية
على الأكثار الدقيق لنخيل البلح

رسالة دكتوراه الفلسفة
في العلوم الزراعية
(فسيولوچى نبات)

مقدمة من

أمال فتحى محمد زين الدين

بكالوريوس في العلوم الزراعية (بساتين)- كلية الزراعة - جامعة القاهرة، ١٩٩٠
ماجستير في العلوم الزراعية (فسيولوچى نبات)- كلية الزراعـــة – جامعة عين شمس، ٢٠٠٥

لجنة الإشراف

دكتور/ أجلال محمد زكى حرب
أستاذ فسيولوچيا النبات المتفرغ - كلية الزراعة - جامعة القاهرة

دكتور/ عبد الرحمن مرسي غلاب
أستاذ فسيولوچيا النبات – كلية الزراعة - جامعة القاهرة

دكتور/ عبد المنعم عبد الودود البنا
رئيس بحوث - معمل بحوث النخيل – مركز البحوث الزراعية

دراسات فسيولوچية و بيوتكنولو چية
على الأكثار الدقيق لنخيل البلح

رسالة دكتوراه الفلسفة
في العلوم الزراعية
(فسيولوچى نبات)

مقدمة من

أمال فتحى محمد زين الدين

بكالوريوس في العلوم الزراعية (بساتين)- كلية الزراعة – جامعة القاهرة ،١٩٩٠
ماجستير في العلوم الزراعيـة (فسيولوچى نبات)- كلية الزراعة -
جامعة عين شمس ،٢٠٠٥

لجنة الحكم

دكتور/ إبراهيم سيف الدين إبراهيم .....
أستاذ فسيولوچى النبات – كلية الزراعة – جامعة عين شمس

دكتور/ أسامة محمد عبد الحميد الشيحى .....
أستاذ فسيولوچى النبات – كلية الزراعة – جامعة القاهرة

دكتور/ عبد الرحمن مرسى غلاب .....
أستاذ فسيولوچى النبات – كلية الزراعة – جامعة القاهرة

دكتور/ أجلال محمد زكى حرب .....
أستاذ فسيولوچى النبات – كلية الزراعة – جامعة القاهرة

التاريخ ٢٢/ ٨ /٢٠١٠

دراسات فسيولوچية و بيوتكنولوچية
على الأكثار الدقيق لنخيل البلح

رسالة مقدمة من

أمال فتحي محمد زين الدين

بكالوريوس في العلوم الزراعية (بساتين)- كلية الزراعة – جامعة القاهرة، ١٩٩٠
ماجستير في العلوم الزراعيـــة (فسيولوچى نبات)- كلية الزراعة –
جامعة عين شمس، ٢٠٠٥

للحصول على درجة

دكتوراه الفلسفة

في

العلوم الزراعية
(فسيولوچى نبات)

قســـــم النبات الزراعى
كليـــــة الزراعـــة
جـامعــة القــاهرة
مصـــــــر

٢٠١٠

CONTENTS

	Page
INTRODUCTION.....	**1**
REVIEW OF LITERATURE.....	**5**
1. Somatic embryogenesis……..	**7**
a. Callus induction……	**8**
1. Explant sources ……	**8**
2. Surface sterilization ……	**9**
3. Nutrient medium……..	**10**
b. Embryogenic callus initiation and realization of somatic embryos…….	**12**
c. Germination of somatic embryos……	**13**
d. Rooting……...	**14**
2.Physiological factors affecting somatic embryogenesis.	**14**
a. Auxin	**15**
b. Cytokinin……..	**18**
c. Abscisic acid (ABA) and Polyethylene glycol (PEG)	**20**
d. Gibberellins (GA_3)…….	**23**
e. Growth retardants ……..	**24**
f. Role of polyamines in somatic embryogenesis…	**27**
g. Phytagel…….	**29**
3. Structural observation.....	**30**
MATERIAL AND METHODS ….....	**40**
1. Establishment of date palm embryogenic cultures…..	**40**
a. Callus induction……	**40**
1. Plant material……	**40**
2. Surface sterilization ……	**41**
3. Nutrient media …….	**41**
4. Culture conditions……	**42**
b. Embryogenic callus formation……	**42**
c. Germination and growth of somatic embryos……..	**42**
d. Rooting of plantlets ……..……..……..…….	**43**
2. Chemical analyses……..……..……..…….	**43**

a. Extraction and analysis of endogenous hormones …… 43
1. Extraction……. 43
2. Estimation…… 45
b. Extraction and determination of total sugars, reducing sugars, non-reducing sugars, starch and free amino Acids..……..…… 45
1. Extraction..……..…… 45
2. Determination of total sugars……. 46
3. Determination of reducing sugars…… 47
4. Determination of starch……. 47
5. Determination of free amino acids…… 47
c. Determination of protein content…… 47
d. Extraction and determination of total phenols…….. 47
1.Extraction of total phenols…….. 47
2. Determination of total phenols…….. 48
e. Proline estimation……. 48
3. Light Microscopy (LM)…… 49
4. Maturation improvement…… 49
a. Effect of ABA and PEG-4000 on somatic embryogenesis 50
b. Effect of ABA, NAA and BA added to the culture medium for maturation and realization of date palm somatic embryos cv.Sakkoty…….. 50
c. Effect of GA_3, ABA and growth retardants (paclobutrazol and ancymidol) added to the culture medium for maturation and realization of date palm somatic embryos cv. Sakkoty……. 50
d. Effect of polyamines (Putrescine, Spermidine and Spermine) added to the culture medium alone for maturation and realization of date palm somatic embryos cv. Sakkoty 51
e. Effect of ABA and phytagel added to the culture medium alone for maturation and realization of date palm somatic embryos cv. Sakkoty 51
RESULTS AND DISCUSSION……..... 54
1. Biochemical components..... 54

a. Endogenous hormones (GA_3, IAA, ABA, zeatin and zeatin riboside) levels in different forms of date palm calli, normal and abnormal forms of somatic embryos cv. Sakkoty…… **54**
1. In different forms date palm calli …… **54**
2. In normal and abnormal forms of somatic embryos. **58**
b. Carbohydrate components…… **65**
1. In different forms of date palm calli…….. **65**
2. In normal and abnormal forms of somatic embryos. **70**
c. Nitrogenous components and phenols……. **72**
1. In different forms of date palm calli……. **72**
2. In normal and abnormal forms of somatic embryos. **75**
2. Histological observation ……..... **79**
3. Improve mat**uration of date palm somatic embryogenesis**……. **86**
a. Effect of ABA and PEG, on date palm somatic embryogenesis…… **86**
1. Maturation and realization of date palm somatic embryos…… **86**
a. Normal individual somatic embryos formation. **88**
b. Normal repeated somatic embryos formation… **88**
c. Normal multiple somatic embryos formation. **89**
d. Abnormal somatic embryos formation…… **90**
2. Embryogenic callus fresh weight embryo number and length..... **90**
3. Germination of normal somatic embryos…… **93**
b. Effect of NAA and BA, on date palm somatic embryogenesis…… **103**
1. Maturation and realization of date palm somatic embryos…… … **103**
a. Normal individual somatic embryos formation. **103**
b. Normal repeated somatic embryos formation… **103**
c. Normal multiple somatic embryos formation. **104**
d. Abnormal somatic embryos formation…… **104**
2. Embryogenic callus fresh weight embryo number and length..... **107**

3. Germination of normal somatic embryos…… 110
c. Effect of GA_3, ABA, ancymidol and paclobutrazol on date palm somatic embryogenesis..... 118
1. Maturation and realization of date palm somatic embryos…… … 118
a. Normal individual somatic embryos formation. 118
b. Normal repeated somatic embryos formation… 120
c. Normal multiple somatic embryos formation. 121
d. Abnormal somatic embryos formation…… 121
2. Embryogenic callus fresh weight embryo number and length..... 122
3. Germination of normal somatic embryos…… 126
d. Effect of polyamines on date palm somatic embryogenesis…… 136
1. Maturation and realization of date palm somatic embryos…… … 136
a. Normal individual somatic embryos formation. 136
b. Normal repeated somatic embryos formation… 137
c. Normal multiple somatic embryos formation. 138
d. Abnormal somatic embryos formation…… 138
2. Embryogenic callus fresh weight embryo number and length..... 141
e. Effect of ABA and phytagel on date palm somatic embryogenesis 146
1. Maturation and realization of date palm somatic embryos…… … 147
a. Normal individual somatic embryos formation. 147
b. Normal repeated somatic embryos formation… 147
c. Normal multiple somatic embryos formation. 148
d. Abnormal somatic embryos formation…… 148
2. Embryogenic callus fresh weight embryo number and length..... 151
SUMMARY…….... 154
REFERENCES ……..……..……..… 160
ARABIC SUMMARY

LIST OF TABLES

No.	Title	Page
1.	Variation of endogenous hormones in different forms of date palm calli ……..…….……..	55
2.	Variation of endogenous hormones in different forms of date palm somatic embryos……..	59
3.	Variation of total soluble sugars, reducing sugars, non-reducing sugars and starch in different forms of date palm calli …….……..	67
4.	Variation of total soluble sugars, reducing sugars, non-reducing sugars and starch in different forms of date palm somatic embryos ……	71
5.	Variation of free amino acids, total soluble protein, proline and phenols in different forms of date palm calli…….	73
6.	Variation of free amino acids, total soluble protein, praline and phenols in different forms of date palm somatic embryos…….	76
7.	Effect of ABA and PEG on the percentages of different shapes of date palm somatic cv. Sakkoty…	87
8.	Effect ABA and PEG and their combinations on embryogenic callus fresh weight, embryo number and embryo length …….	91
9.	Effect ABA and PEG on the percentage of re-formation of different shapes of date palm somatic	