Name of Candidate: Maiada Mohamed EL Dawayati **Degree:** Ph. D.
Title of Thesis: Using Tissue Culture Technology to Storage Some Plant Tissues of Date Plam .
Supervisors: Prof. Dr. El-Sayed Ibrahim Baker, Prof Dr. Amina Hamed Gomaa
Department: Pomology
Branch: Pomology **Approval:** 20/04/2008

ABSTRACT

Cryoprotection procedures for *in vitro* established shoot tip explants of Date palm Zaghlool cv. prior to cryoprservation process in liquid nitrogen were investigated in this study. The first cryoprotection procedure was to study the effects of different sucrose concentrations (0.1, 0.3, 0.5, and 0.7Mol) in preculturing medium and the incubation at 5°C or 27°C for four weeks. The second cryoprotection procedure was to study the effects of the same previous sucrose concentrations in preculturing medium and the incubation at 27°C for four weeks followed by desiccation procedure for two hours in an open petri dish exposed to continual current stirel air in the laminar airflow cabinet. The third cryoprotection procedure was to study the effects of abscisic acid (ABA) concentrations (2.0, 4.0, 6.0 and 8.0 mg/L) in preculturing media and the incubation at 5°C or 27°C for four weeks. The fourth cryoprotection procedure was to study the effects of the same previous concentrations of (ABA) in preculturing media and incubation at 27 °C for four weeks followed by desiccation procedure for two hours in an open petri dish exposed to continual current of stirel air in laminar airflow cabinet . All shoot tip explants obtained from the four cryoprotiction procedures were plunged in liquid nitrogen Dewar at (-196 °C) for one hour after thawing process in water bath at 40 °C. All cryopreserved shoot tip explants were cultured on recovery medium for 3 weeks to examine their potential for surviving after cryopreservation process. The results of explants viability showed that all of the tested pretreatments gave quiet results for survival. The optimal procedure developed was the cryoprotiction of cultured shoot tip explants on preculturing medium supplemented with 0.5 M of sucrose concentration for four weeks and incubated at 27°C followed by air desiccation treatment prior to cryopreservation process. The cryopreserved explants from this cryoprotiction procedure revealed high survival and could resume their life cycle in normal manner on the recovery medium. Date palm explants cryopreservation needs more studies to achieve better results in germplasm conservation.

All shoot tip explants of Zaghlool cv. conserved at 5°C for 6 months or at 15°C for 12 months on media supplemented with 0.3M sucrose or sorbitol combined with different concentrations of ABA able to survive.

All callus explants of Gundila cv. conserved at 15°C for 12 months on media supplemented with different concentrations of sucrose and sorbitol able to survive.

.91.10% of both Zaghlool and Gundila cvs. Callus explants conserved at 5°C under dark or low light with 1000 Lux for 6 months on media supplemented with different ABA concentrations able to survive. While 57.77% of Zaghlool cv. callus explants and 63.32% of Gundial callus explants conserved for 12 months able to survive. More over, all callus explants of both Zaghlool and Gundila cvs. conserved at 15°C for 6 and 12 months able to survive

Unsliced shoot tip explants of Zaghlool cv. cultured on medium supplemented with 10 mg/L 2,4-D with the addition of 4.0 mg/L ABA produced the highest significant number of direct somatic embryos at the second subculture. The number of somatic embryos depended on ABA concentration. Explants cultured on ABA- Free medium failed completely to produce somatic embryos.

Key words: *Date palm/ Conservation/ Cryopreservation/ Sorbitol/ ABA/ Minimal growth condition/ micropropagation Direct somatic embryogenesis.*

A. H Gomaa

اسم الطالب: ميادة محمد أحمد الدوياتى — الدرجة: دكتوراه

عنوان الرسالة: استخدام تكنولوجيا زراعة الأنسجة لحفظ بعض الأنسجة النباتية لنخيل البلح

المشرفون: الأستاذ الدكتور : السيد إبراهيم بكر

الأستاذ الدكتور : أمينة حامد جمعه

قسم: الفاكهة — فرع: الفاكهة — تاريخ منحة الدرجة: ٢٠٠٨/٤/٢٠

المستخلص العربى

تم دراسة معاملات للحماية من التجميد للمنفصلات النباتية للقمم النامية المجهزة لنخيل البلح صنف الزغلول وذلك قبل إجراء عملية الحفظ بالتجميد بجهاز النيتروجين السائل وقد أجريت المعاملة الأولية للحماية من التجميد بدراسة تأثير تركيزات مختلفة من السكروز (٠,١، ٠,٣، ٠,٥، ٠,٧ مول) وذلك فى بيئة المعاملة الأولية والتحضين عند ٥م° أو ٢٧ م° لمدة ٤ أسابيع أما المعاملة الثانية للحماية درست تأثير تركيزات من السكروز السابقة فى بيئة المعاملة الأولية والتحضين عند ٢٧ م° لمدة ٤ أسابيع يتبعها معاملة تجفيف بداخل جهاز الزراعة على طبق زجاجى مفتوح مع التعرض لتيار الهواء المعقم لمدة ساعتين أما المعاملة الثالثة للحماية من التجميد درست تأثير تركيزات مختلفة من حمض الأبسيسيك (٢,٠، ٤,٠، ٦,٠، ٨,٠ ملجم/ليتر) وذلك فى بيئة المعاملة الأولية والتحضين عند لمدة ٤ أسابيع ٥م° أو ٢٧ م° أما المعاملة الرابعة للحماية من التجميد فكانت دراسة تأثير تركيزات مختلفة من حمض الأبسيسيك السابقة فى بيئة المعاملة الأولية والتحضين على ٢٧ م° لمدة ٤ أسابيع يتبعها معاملة تجفيف بداخل جهاز الزراعة على طبق زجاجى مفتوح مع التعرض لتيار الهواء المعقم لمدة ساعتين. جميع المنفصلات النباتية للقمم المتحصل عليها من الأربعة معاملات السابقة للحماية من التجميد يتم غمسها فى جهاز النيتروجين السائل عند (− ١٩٦ م°) لمدة ساعة وبعدها تتم عملية الأذابة فى حمام مائى على درجة ٤٠ م°. جميع المنفصلات النباتية للقمم النامية التى حفظت بالتجميد قد تم زراعتها على بيئة استعادة النمو لمدة ٣ أسابيع وذلك لأختبار مدى قدرتها للبقاء حية بعد إجراء عملية الحفظ بالتجميد. ونجد أن نتائج الحيوية للمنفصلات النباتية قد أظهرت أن جميع المعاملات الأولية لحماية المنفصلات النباتية للقمم النامية من التجميد قد أعطت نتائج بسيطة ولقد وجد أن أفضل معاملة للحفظ من التجميد للمنفصلات النباتية للقمم النامية تلك التى زرعت على بيئة المعاملة الأولية المزودة ٠,٥ مول من السكروز والتحضين على ٢٧ م° لمدة ٣ أسابيع ثم يتبع ذلك معاملة التجفيف الهوائى قبل إجراء الحفظ بالتجميد فقد أظهرت المنفصلات النباتية للقمم النامية التى حفظت والناتجة من معاملة الحماية من التجميد هذه قدرة عالية للبقاء حية والأستمرار بشكل طبيعى فى نموها على بيئة أستعادة النمو. ومن الجدير بالذكرأن مجال الحفظ بالتجميد لنخيل البلح يحتاج لمزيد من الدراسات للحصول على أفضل النتائج فى حفظ الأصول الوراثية .

جميع المنفصلات النباتية للقمم النامية من صنف الزغلول والتى حفظت عند ٥ م° لمدة ٦ أشهر أو عند ١٥ م° لمدة ١٢ شهر على بيئات مزودة بالسكروز أو السوربيتول عند تركيز ٠,٣ مول بالأضافة إلى تركيزات مختلفة من حمض الأبسيسيك كان لها القدرة على البقاء حية. جميع المنفصلات النباتية للكالس من صنف الجنديلة والتى حفظت عند١٥ م° لمدة ١٢ شهرعلى بيئات مزودة بتركيزات مختلفة من السكروز والسوربيتول كان لها القدرة على البقاء حية.

٩١,١٠ % من المنفصلات النباتية للكالس من صنفى الزغلول والجنديلة والمحفوظة عند٥ م° تحت الأظلام أو تحت الأضاءة (١٠٠٠ قدم/شمعة) لمدة ٦ أشهر على بيئات مزودة بتركيزات مختلفة من حمض الأبسيسيك لها القدرة على البقاء حية بينما ٥٧,٧٧ % من صنف الزغلول المنفصلات النباتية للكالس و ٦٣,٣٢% من صنف الجنديلة والمحفوظة لمدة ١٢ شهر لها القدرة على البقاء حية. كذلك تلك المنفصلات النباتية للكالس لكل من صنفى الزغلول والجنديلة المحفوظة لمدة ٦ أشهر عند١٥ م° لها القدرة على البقاء حية.

المنفصلات النباتة للقمم النامية المجزأه لصنف الزغلول والمنزرعة على بيئة مزودة ١٠,٠ملجم/لتر 2,4-D مع إضافة ٤,٠ ملجم/لتر من حمض الأبسيسيك قد أعطت أعلى عدد معنوى من الأجنة الجسدية البالغة المباشرة فى النقلة الزراعية الثانية وقد أعتمد عدد الأجنة الجسدية البالغة المباشرة المتكونة على تركيز حمض الأبسيسيك. المنفصلات النباتة للقمم الناميةوالتى زرعت على بيئة خالية من حمض الأبسيسيك قد فشلت تماما فى إنتاج أجنة جسدية.

الكلمات الدالة: نخيل البلح – الحفظ – الحفظ بالتجميد – سوربيتول – حمض الأبسيسيك – الأكثار الدقيق – ظروف النمو المنخفضة – الأجنة الجسدية المباشرة

CONTENTS

INTRODUCTION 1
RIVIEW OF LITERATRE 5
1. **Conservation by using cryopreservation** 7
   a. Cryoprotectant pretreatment induced by sucrose 14
   b. Cryopratectant pretreatment induced by cold hardening................ 18
   c. Cryoprotectant pretreatment induced by air desiccation 20
   d. Cryoprotectant pretreatment induced by abscisic acid (ABA) 24
2. **Conservation under minimal growth condition** 25
   a. Reduction of growth by altering incubation temperature of conservation.. 28
   b. Reduction of growth by altering the light condition of conservation 31
   c. Reduction of growth by altering the osmotic potential of the conservation culture 34
   d. Reduction of growth by using growth regulator abscisic acid (ABA).. 39
3. **Direct somatic embryos for date palm propagation** 43

MATERIAL SAND METHODS 48
RESULTS AND DISCUSSION 67
1. **Conservation of shoot tip explants of date palm Zaghlool cv. by cryopreservation** 67
   Pretreatment 1. Effect of different sucrose concentrations in preculturing media and incubation temperature at 5°C or 27°C on the survival percentage of cryopreserved shoot tip explants of date palm Zaghlool cv. cultured on recovery medium for three weeks.. 67
   Pretreatment 2. The effect of different sucrose concentrations in preculturing media and incubation temperature at 27°C for four weeks followed by desiccation procedure on the survival percentage of cryopreserved shoot tip explants of date palm Zaghlool cv. cultured on recovery medium for three weeks 72
   Pretreatment 3. Effect of different abscisic acid (ABA) concentrations in preculturing media and incubation temperature at 5°C or 27°C. on The survival percentage of cryopreserved shoot tip explants of date palm Zaghlool cv. cultured on recovery medium for three weeks 75
   Pretreatment 4. Effect of different abscisic acid (ABA) concentrations in preculturing media and incubation temperature at 27°C followed by desiccation procedure on

the survival percentage of cryopreserved shoot tip explants of date palm Zaghlool cv. cultured on recovery medium for three weeks 77

2. *In vitro* conservation of different date palm explants under minimal growth conditions 80

Experiment 1. Effect of different sugar and different ABA concentrations on shoot tip explants of dale palm Zaghlool cv conserved at 5˚or 15˚C under complete darkness for 6 months and 12 months 81

a. Effect of different sugar and different ABA concentrations on shoot tip explants of Zaghlool cv conserved at 5˚C under complete darkness for 6 and 12 months 81

b. Effect of different sugar and different ABA concentrations on shoot tip explants of date palm Zaghlool cv conserved at 15˚C under dark for 6 months and 12 months 94

Experiment 2. Effects of different sugar concentrations on callus explants of date palm Gundila cv. conserved at 5 °C or 15°C under complete darkness for 6 and 12 months 110

a. Effect of different sugar concentration on callus explants of date palm Gundila cv. conserved at 5 oC under complete darkness for 6 and 12 months 111

b. Effect of different sugar concentration on callus explants of date palm Gundila cv conserved at 15 oC under complete darkness for 6 and 12 months 124

Experiment 3. Effect of different ABA concentrations on callus explants of date palm Zaghlool and Gundila cvs. conserved at 5°Cor15°C under complete darkness or low light (1000 Lux) for 6 and12 months 140

a. Effect of different ABA concentrations on callus explants of date palm Zaghlool cv. conserved at 5oC under complete darkness or light (1000 lux) for 6 and 12 months 141

b. Effect of different ABA concentrations on callus explants of date palm Zaghlool cv. conserved at 15oC under complete darkness or light (1000 Lux) for 6 and 12 months 156

c. Effect of different ABA concentrations on callus explants of date palm Gundila cv. conserved at 5oC under complete darkness or light (1000 Lux) for 6 and 12 months 170

d. Effect of different ABA concentrations on callus explants of Gundila cv. conserved at 15oC under complete darkness or light (1000 Lux) for 6 and 12 months 184

3. Effect of different ABA concentrations on the production of direct somatic embryos from shoot tip explants of date palm Zaghlool cv. 202

CONCLUSION 210

SUMMARY 211

REFERENCES 231

ARABIC SUMMARY 254