Name of Candidate	Ezz El-Dien Gadalla Hussein Gadalla El-Seme'a — Degree ph.D
Title of thesis	PROPAGATION OF DRY VARIETIES OF DATE PALM
Supervisors	Prof.Dr. Magda Mahmoud Khattab — Prof. Dr. Ibrahim Abd El-Maksoud Ibrahim
Department	Pomology
Branch	Approval

ABSTRACT

Current study was undertaken in 1998-2002 successive seasons on fruits of dry date palm cultivars, Bartamuda, Malakaby, Shamia, Gondeila and Sakkoty. The study was carried out with the intention to study.

Exp. I: Establishment and micropropagation of dry cultivars via somatic embryogenesis.

Exp. II:DNA finger printing by using AFLP technique.

Exp.III: Field evaluation of date palm cultivars produced through tissue culture technique and traditional methods(offshoots).

Results indicated that :

Sakkoty cv. produced the highest significant value of browning after 18 weeks followed by Shamia and Malakaby cvs.Explant cultured on March produced the highest significant value of browning, while explant cultured on February produced the lowest significant value.No significant difference could be observed between values of browning produced by shoot-tip or leaf primordia explants.

The highest significant value of callus formation was observed with Gondeila cv., while the lowest significant values were noticed with Bartamuda and Malakaby cvs..

Shoot-tip explant appear to be the most effective explant to produce a highest significant value of callus formation percentage compared with leaf primordia explant.October and March were the most suitable date of culture as produced the highest significant values of callus formation percentage without significant difference. While December was the lowest one.

Malakaby cv. was superior on producing embryogenic callus compared with other various under investigation.Embryogenic callus formation percentage reached to maximum significant value using culture media supplemented with 10 mg/L 2,4-D + 5.0 mg/L NAA + 5.0 mg/L IAA + 3.0 mg/L 2ip in addition to 1g/L charcoal.

The highest significant value of embryos number was noticed with Shamia cv., while the lowest significant values were observed with Sakkoty and Malakaby cvs.Using control medium, medium supplemented with 0.1 mg/L NAA and medium supplemented with 0.2 mg/L kinetin produced the highest significant values of embryos number without significant difference among them, compared with other media investigation. While the lowest one was obtained with medium of adding 0.1 mg/L kinetin and 0.1 mg/L NAA.

The highest significant value of vitrified embryos was observed with Shamia cv., followed by Malakaby and Gondeila cvs, while the lowest value of this phenomena was observed with Bartamuda and Sakkoty cvs. embryos.Medium with adding 0.2 mg/L BA-ribozide appeared to stimulate significantly the vitrification of embryos, followed by medium of adding 0.1 mg/L NAA, medium of adding 0.2 mg/L kinetin and that of adding 0.4 mg/L 2ip which produced the same values without significant differences.Medium with adding 0.2 mg/L BA-ribozide appeared to stimulate significantly the vitrification of embryos, followed by medium of adding 0.1 mg/L NAA, medium of adding 0.2 mg/L kinetin and that of adding 0.4 mg/L 2ip which produced the same values without significant differences.

The highest significant values difference between **germination** percentages were observed with Bartamuda, Malakaby and Sakkoty cvs. without significant difference between them, while the lowest significant value of germination percentage was obtained with Gondeila cv.Medium M4 (MS + 0.1 mg/l NAA with different additives recorded superiority of stimulated germination percentage than other media. While the lowest significant values was observed with medium M3 (MS + different additives).

MS without any addition of growth regulator or other additives produced the highest significant value of secondary embryos and the lowest significant value was noticed by using MS + 0.1mg/L NAA.Malakaby, Bartamuda, Gondeila and Sakkoty cvs. produced the highest values of secondary embryos without significant difference among them. While the lowest number was obtained with Shamia cv.

The highest significant value of embryos was obtained by adding 0.4 mg/L cytokinin to culture medium, followed by adding 0.05 and 0.2 mg/L cytokinin to culture media with significant difference inbetween. While the low significant values were obtained by adding 0.1 mg/L and control to culture medium without significant difference.

Benzyl-adenine ribozide was the most effective cytokinin to produce a highest significant values of root number, followed kinetin and 2ip, without significant differences inbetween. While the lowest value was observed by using culture medium with adding BA.

The highest significant value of rooting percentage was observed when culture medium supplemented with 3.0 mg/l NAA or IBA. While control medium (auxin-free medium) produced the lowest significant value of rooting percentage.Medium lacking auxin produced the lowest significant value of root number. Whereas, the medium of adding 3 mg/L NAA was the best one to produced a highest significant value.

The similarity percentage was 93.5, 91.1, 94.1 and 92.7 for Bartamuda, Gondeila, Shamia and Malakaby, respectively produced derived tissue culture techniques compared to the original mother trees and the somaclonal variation percentage was 6.5, 8.9, 5.9 and 7.3, respectively, when E-ACA/M-CAA primer used.

Vegetative parameters of Bartamuda and Sakkoty cultivars derived from tissue culture propagation technique showed to be significantly better than those produced from the traditional method of propagation method.

Trees produced by tissue culture (Bartamuda and Sakkoty cvs.) came to flowering earlier than the same cultivars produced by traditional methods as up to the third and fourth years from planting those propagated from offshoots did not show any flowering .

The flowering behavior and reproductive traits of the two cultivars under study were normal and there were no sign of mutation and / or abnormalities .

- **Key words:** Dry date palm-***In vitro***-DNA-AFLP-Field evaluation.

Magdi

اسـم الطـالب	عز الدين جاد الله حسين جاد الله السمـع		الدرجة الدكتوراه
عنـوان الرسـالة	إكثار الأصناف الجافة لنـخيل البلح		
المشـرفون	أ.د/ مـاجدة مـحمود خطاب	أ.د/ إبراهيم عبد المقصود ابراهيم	
قسـم	الفاكـهة	فرع	تاريخ منح الدرجة

الملخص العربـــــــي

أجريت هذه الدراسة خلال الفترة من 1998 حتى 2002 علي الاصناف الجافه (برتمودا – ملكابي – شاميه – جنديلـــه – ســـكوتي بهدف : إيجاد البروتوكول المناسب لإكثار الأصناف الجافة عن طريق تقنية زراعة الأنسجة (الأجنة الجسمية)ومدى وجود اختلافا وراثية من عدمه للأصناف الجافة ناتج زراعة الأنسجة عند مقارنتها بالأمهات ، وذلك عند عمل البصمة الوراثية وكذلك لبيان مـــد درجة القرابة بين تلك الأصناف الجافة وكذلك التقييم الحقلى للأصناف الجافة ناتج زراعة الأنسجة ومقارنتها بـــالطرق التقليديـــة الفسائل) .

ويمكن تلخيص أهم النتائج كالتالى:

تحقق أعلى معدل للتلون باللون البني باستخدام الصنف سكوتي ثم صنفي شامية وملكابي بدون فروق معنوية. بينما حقق صـــنف البرتمودا أقل معدل للتلون البني. وأعلى معدل للتلون باللون البني نتج من الزراعة في شهر مارس ، بينما أقل معدل معنوي تـــم الحصول عليه في شهر فبراير.و لم يظهر أي فرق معنوي لظاهرة التلون البني باستخدام القمة النامية والأوراق الفلقية.

أعطى استخدام القمة النامية أعلى معدل معنوي لتكوين الكالوس مقارنة باستخدام الأوراق الفلقية.و زراعة الأجزاء النباتيـــة فـــي شهري أكتوبر ومارس أعطى أعلى معدل معنوي لتكوين الكالوس بدون فرق معنوي بينهما ، بينما الزراعة في ديسمبر أعطت أقل معدل معنوي.

تم الحصول على أعلى معدل معنوي لتكوين الكالوس الجنيني باستخدام الصنف ملكابي مقارنة بباقي الأصناف تحت الدراسة.كما أدى استخدام بيئة الزراعة المحتوية على 10 مجم/ 2,4-D ، 5مجم NAA ، 5 مجم IAA ، و 3مجم 2ip ، بالإضافة إلـــى 1.5 جم/لتر فحم للحصول على أعلى معدل معنوي لتكوين الكالوس الجنيني.

تم الحصول على أعلى معدل معنوي لعدد الأجنة المتكونة باستخدام الصنف شامية بينما نتج أقل معدل معنوي باســـتخدام صـــنفي سكوتي وملكابي.كما أدى استخدام البيئة الخالية من منظمات النمو وتلك المضاف إليها 0.1 مجم/لتر NAA ، وكذلك المحتوية على 0.2 مجم/لتر كينيتين للحصول على أعلى معدل معنوي لتكون الأجنة بدون فروق معنوية فيما بينهم مقارنة بباقي البيئـــات تحـــت الدراسة.

ظهر أعلى معدل لظاهرة تزجج الأجنة باستخدام الصنف شامية يلي ذلك صنفي ملكابي وجنديلة ، بينما أقل معدل معنـــوي لهـــذه الظاهرة نتج باستخدام صنفي برتمودا وسكوتي.كما تم الحصول على أعلى معدل معنوي لظاهرة التزجج باستخدام البيئة المضاف إليها 0.2مجم/لتر بنزايل أدنين ريبوزايد ، وتلك المضاف إليها 0.1 مجم/لتر NAA ، وكذلك المضاف إليها على 0.2 مجم/لتـــر كينيتين أو 0.4 مجم/لتر 2ip بدون فروق معنوية بينهم.

تم الحصول على أعلى معدل لإنبات الأجنة باستخدام الأصناف برتمودا أو ملكابي وسكوتي بدون فروق معنوية بينهم.

أعطت البيئة(م4) المضاف إليها 0.1 ملجم/لتر NAA والإضافات الأخرى أعلى معدل لإنبات الأجنة ، بينما تم الحصول على أقل معدل معنوي باستخدام البيئة(م3) الخالية من منظمات النمو والمحتوية على الإضافات.

أعطت البيئة الخالية من منظمات النمو أعلى معدل معنوي لتكون الأجنة الثانوية ، بينما تم الحصول على أقـــل معـــدل معنـــوي باستخدام البيئة 0.1 مجم/لتر NAA. تم الحصول على أعلى معدلات لتكون الأجنة الثانوية باستخدام الأصناف ملكابي وبرتمودا – جنديلة وكذلك السكوتي بدون فروق معنوية فيما بينهما ، بينما تم الحصول أقل معدل معنوي باستخدام الصنف شامية.

أدت إضافة 0.4 مجم/لتر بيئة من السيتوكينين لإنتاج أكبر عدد معنوي من الأجنة مقارنة بإضافة 0.05 أو 0.2 مجم/لتر بيئـــة ، بينما تم الحصول على أقل عدد معنوي باستخدام 0.1 مجم/لتر ، وكذلك بيئة الكنترول.

تم الحصول على أعلى معدل لتكون الجذور معنويا باستخدام BA-riboside ثم الكينتين والـــ 2ip بدون فروق معنوية ، بينمـــا أدى استخدام الـــ BA للحصول على أقل عدد معنوي من الجذور. تم الحصول على أعلى معدل لنسبة التجـــذير عنـــد اســـتخدام 3مجم/لتر من كل من NAA و IBA لكل الأصناف. وكذلك تم الحصول على أقل معدل لنسبة التجذير عند استخدام بيئة الكنترول.

أعطت البيئة الخالية من الأكسينات أقل عدد من الجذور ، بينما البيئات المضاف إليها 3مجم/لتر من كل من NAA أعطت أعلى عدد من الجذور. تم الحصول على نسبة تشابه بين الأصناف المكثرة بزراعة الأنسجة والأمهات بنســـب 93.5 ، 91.1 ، 94.1 ، 92.7 للأصناف برتمودا و جنديلة ، شامية وملكابي على التوالي باستخدام primer E-ACA/M-CAA ، وكانت نسبة التغيرات الوراثية للبرتمودا والجنديلة والشامية والملكابي هي 6.5 ، 8.9 ، 5.9 و 7.3 على التوالي.

أظهرت النتائج تفوق صنفي البرتمودا والسكوتي ناتج زراعة الأنسجة تفوقا مقارنة بتلك الناتجة من زراعـــة الفســـائل (الطـــرق التقليدية).

أصناف البرتمودا والسكوتي الناتجة من زراعه الانسجه بدأت في التزهير مبكرا في العام الثالث والرابع من ألزراعه عن مثيلتها الناتجة بالطرق ألتقليديه والتي لم تزهر بعد

سلوك الأزهار والخصائص التكاثرية لصنفي البرتمودا والسكوتي ناتج زراعه الانسجه كان طبيعيا ولم تظهر فيه أي طفـــرات أو حالات شاذة .

الكلمات الدالة: زراعة أنسجة – البصمة الوراثية– الحامض النووى الديوكسي ريبوز – التقيم الحقلي – الأصناف الجافة – نخيل البلح.

CONTENTS

Page

1- INTRODUCTION 1
2- REVIEW OF LITERATURE 4
3- MATERIALS AND METHODS 42
4- RESULTS AND DISCUSSION 61
4.1. Establishment and micropropagation of dry varieties via somatic embryogenesis by using tissue culture technique ...61
4.1.1. Browning percentage 61
4.1.2. Callus formation percentage 64
4.1.3. Embryogenic callus 67
4.1.4. Embryo formation (maturation) 70
4.1.4.1. Number of embryos 70
4.1.4.2. Length of embryos 72
4.1.4.3. Embryos vitrification 74
4.1.5. Growth and development of somatic embryos 76
4.1.5.1. Germination percentage 76
4.1.5.2. Number of secondary embryos 77
4.1.5.3. Shoot number 80
4.1.5.4. Root number 81
4.1.6. Multiplication stage (effect of cytokinin on growth and development of somatic embryos) 82
4.1.6.1. Number of embryos 83
4.1.6.2. Number of leaves 85
4.1.6.3. Number of shoots 89
4.1.6.4. Shoot length 92
4.1.6.5. Number of roots 95
4.1.7. Rooting stage 98
4.1.7.1. Rooting percentage 98
4.1.7.2. Root number 100
4.1.7.3. Root length 101
4.1.7.4. Leaves number 103
4.1.7.5. Plantlet length 104
4.1.8. Acclimatization stage 106
4.2. DNA Fingerprinting using AFLP technique 109
4.2.1. Somaclonal variation percentage 109
4.2.2. Dendogram 126

4.3. Field evaluation of date palm cultivars produced through tissue culture technique and traditional methods (off shoots) 128
4.3.1. Vegetative parameters 128
4.3.2. Flowering and Fruit setting 136
4.3.2.1. Spathe emergence 136
4.3.2.2. Spathe opening 137
4.3.2.3. Harvesting date 137
4.3.2.4. Initial fruit set 139
4.3.2.5. Fruit retention 139
4.3.2.6. Ultimate fruit set 143
4.3.3. Fruit physical parameters after harvesting 143
4.3.3.1. Fruit weight 143
4.3.3.2. Seed weight 146
4.3.3.3. Flesh weight 146
4.3.3.4. Flesh weight percentage 146
4.3.3.5. Fruit length 146
4.3.3.6. Fruit diameter 147
4.3.3.7. Fruit dimension 147
4.3.3.8. Fruit volume 148
4.3.4. Fruit chemical parameters after harvesting 148
4.3.4.1. Moisture percentage 148
4.3.4.2. Dry matter percentage 148
4.3.4.3. Total soluble solids (TSS) 149
4.3.4.4. Acidity 149
4.3.4.5. Crude fibers 149
4.3.4.6. Total sugars 150
4.3.4.7. Reducing sugar 150
4.3.4.8. Non-reducing sugar 150
DISCUSSION 152
5- SUMMARY 173
6- REFERENCES 187
7- ARABIC SUMMARY

LIST OF ABBREVIATIONS

2,4-D	dichloro-phenoxyacetic acid
2ip	N6-(2-iso-pentenyl adenine)
AFLP	Amplified restriction Fragment Length Polymorphic
BA	Benzyl Adenine
BAr	Benzyl Adenine-ribozide
DNA	Deoxy ribonucleic acid
E-	*Eco*RI
GA_3	Gibberellic acid
IAA	Indol acetic acid
IBA	Indol butyric acid
Kin	Kinetin
M-	M*se*I
NAA	Naphthaleneacetic acid
NOA	2-naphthoxy acetic acid
PCR	Polymerase chain reaction
POD	Peroxidase
PPO	Polyphenoloxidase
PVP	Polyvinyle pyroledone
RAPD	Random amplified polymorphisms DNA
RFLP	Restriction fragment length polymorphic