

**MICROPROPAGATION DU CAROUBIER
(*CERATONIA SILIQUA*) PAR CULTURE DE
BOURGEONS AXILLAIRES ISSUS DE JEUNES
PLANTULES (*)**

Rabah SAIDI ⁽¹⁾, ***Ahmed LAMARTI*** ⁽²⁾, ***Alain BADO*** ⁽³⁾

La micropropagation du Caroubier par culture de bourgeons axillaires issus de plantules de sept mois a été abordée sur un milieu à base des macroéléments WPM additionnés des microéléments et vitamines MS. Le débourrement des bourgeons axillaires est assuré avec comme cytokinine la BAP et est amélioré par la combinaison d'1,44 µM d'AG₃ avec 2,22 µM de BAP. La multiplication des pousses d'un des clones obtenus est facilitée par 2,22 µM de BAP, seule ou combinée à 0,5 µM d'ANA ou d'AIB. L'enracinement des pousses sur MS/2 est favorisé par 10 µM d'AIB.

(*) *Manuscrit reçu le 17 mars 2007.*

(1) *Département des Sciences naturelles, École normale supérieure, BP 202, 93150 Martil, Maroc. rabahsaidi2@yahoo.fr*

(2) *Équipe de Biotechnologie végétale, Département de Biologie, Faculté des Sciences, M'hannech II, BP 2121, 93002 Tétouan, Maroc. biotec99@hotmail.com*

(3) *Laboratoire de Sciences végétales, Mycologie et Biotechnologie, GESVAB – EA 3675, Faculté des Sciences pharmaceutiques, Université Victor Segalen Bordeaux 2, 146, rue Léo-Saignat, 33076 Bordeaux Cedex, ISVV. alain.badoc@phyto.u-bordeaux2.fr*

INTRODUCTION

Le Caroubier (*Ceratonia siliqua* L., Fabacée Césalpinoïdée) joue un rôle socio-économique et écologique important dans le système agrosylvopastoral. La pulpe des fruits et la gomme tirée des graines sont largement utilisées dans l'industrie agroalimentaire. La production mondiale annuelle, essentiellement méditerranéenne, est estimée à 310 000 tonnes, dont une bonne partie est fournie par l'Espagne suivie de l'Italie, du Portugal et du Maroc [1].

C'est une espèce dioïque dont les fleurs sont initialement bisexuelles puis deviennent habituellement unisexuées au cours du développement floral [19]. À l'état naturel, on a autant de pieds mâles que de pieds femelles [1,4]. Ce rapport est modifié par greffage et bouturage [1,7] et il existe quelques formes hermaphrodites [6,9-10,15-16,19].

La multiplication végétative du Caroubier peut être obtenue par des techniques traditionnelles, telle que le bouturage. Cependant les potentialités d'enracinement des boutures sont faibles [8,11]. De même, la greffe de bourgeons femelles sur de jeunes arbres est souvent pratiquée. Vu l'importance accordée à la culture du Caroubier au cours des dernières années, ces techniques ne pourraient satisfaire le besoin accentué en cette plante. Donc le recours à sa multiplication végétative par culture *in vitro* devient une nécessité. Les premières publications relatives à la culture *in vitro* du Caroubier datent de 1983 [20]. Différents types d'explants ont été étudiés : épicotyles issus des embryons immatures [21-22], bourgeons axillaires de jeunes plantules [2] ou d'arbre âgé [17-18] et ovules [3].

La culture de bourgeons axillaires dérivant de jeunes plantules offre une bonne possibilité de micropropagation de cette espèce sans que l'on soit gêné par la contamination des cultures très fréquente quand on travaille sur des explants issus d'un arbre adulte.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Obtention des explants

Les graines ont été récoltées d'un arbre femelle remarquable sur la route Tétouan - Chefchaoun, dans la région de Bni Mtil, dans le Rif occidental au Maroc. Les graines sont mises à germer par trente dans des

flacons sur de l'eau gélosée stérile (0,7 %), après désinfection et scarification par l'acide sulfurique 36 N selon le protocole de Correia et Martins-Loucao [5]. Une semaine après leur germination, les plantules germées sont transférées sur la tourbe et mises en salle de culture. L'arrosage se fait chaque semaine avec une solution à base de macroéléments et de microéléments de Murashige et Skoog [13]. Les plantules utilisées sont âgées de sept mois, atteignent environ 16 cm et présentent 13 à 16 nœuds (Photo 1).

Les plantules sont coupées au niveau du cinquième nœud afin de prendre des bourgeons axillaires encore pourvus à leur base d'une feuille non tombée. Elles sont lavées à l'eau courante pour éliminer le maximum de microorganismes. Après coupure des feuilles à la base de leur pétiole, on a séparé les différents nœuds, en gardant environ 2 à 3 mm de chaque côté. La désinfection a été réalisée par action 20 min de l'hypochlorite de calcium 7 % additionné de quelques gouttes de Tween 80, rinçage 5 min par l'eau distillée stérile, 5 min de chlorure mercurique à 0,1 % et trois rinçages successifs de 10, 10 et 15 min par l'eau distillée stérile.

Chaque explant est mis dans un flacon de 200 ml contenant 50 ml de milieu de culture solidifié par l'agar 0,7 %. Le milieu nutritif de base est constitué des macroéléments Woody Plant Medium (WPM) [12] auxquels sont additionnés des microéléments et vitamines de Murashige et Skoog (MS), ainsi que 30 g/l de saccharose et 0,1 g/l de myo-inositol. Le pH est ajusté à 5,8 avant l'autoclavage. La photopériode est de 16 heures de lumière avec 4000 lux et une température de 23 à 25°C le jour et 20°C la nuit. La lecture des résultats se fait après un mois.

Mise en culture des bourgeons axillaires

Quatre cytokinines, la BAP, la zéatine, la 2i-P et la kinétine, ont été testées sur le débourrement des bourgeons axillaires à 2,22 et 4,44 μM .

La BAP a été testée parallèlement à 2,22 et 4,44 μM seule ou combinée avec quatre concentrations d'AG₃, 0,29 ; 0,58 ; 1,44 et 2,89 μM .

Trois clones issus chacun d'une plantule ont été retenus et repiqués trois fois pendant un mois sur le même milieu de base, en présence de 2,22 μM de BAP et 1,44 μM d'AG₃, condition la plus favorable.

Multiplication des pousses

Le clone 2, bien adapté à la multiplication et au maintien des pousses, a été retenu pour l'étude de la phase de multiplication afin de minimiser les variations de réponses liées aux différences génétiques. Des tiges de 7 à 9 mm, comprenant chacune trois entre-nœuds, ont été repiquées dans différentes conditions sur un milieu à base des macroéléments WPM ou Murashige et Skoog (MS) additionnés des microéléments et vitamines MS, ainsi que de 30 g/l de saccharose et 0,1 g/l de myo-inositol. Les cultures sont mises en salle de culture dans les conditions préalablement mentionnées. La lecture des résultats se fait après un mois.

Pour tester l'effet des solutions de macroéléments WPM et MS sur la multiplication des pousses du clone 2, trois concentrations de BAP ont été choisies 1,33 ; 2,22 et 4,44 μM pour chaque milieu.

Le milieu WPM s'est avéré plus adapté au maintien des pousses issues du clone 2, qui a été conservé pour tester l'effet des régulateurs de croissance. Les tiges ont été repiquées en présence de la BAP seule à différentes concentrations (0,44 ; 1,33 ; 2,22 ; 3,11 ; 4,44 et 6,66 μM) ou combinée à 2,22 μM avec l'AG₃ (0,29 ; 0,87 ; 1,44 et 2,89 μM) ou avec des auxines à 0,5 μM (ANA, AIB, AIA et 2,4-D).

Enracinement des pousses

L'enracinement des pousses d'environ 14 mm a été étudié en présence d'AIB et d'AIA à 5 et 10 μM par deux méthodes différentes. La première consiste à cultiver des pousses de 12-16 mm sur le milieu MS dilué de moitié (MS/2) additionné de l'auxine à l'obscurité durant une semaine, suivi d'un transfert un mois à la lumière sur le même milieu sans phytohormones. Dans la deuxième méthode, les pousses sont trempées trois minutes dans la solution auxinique, cultivées sur le milieu MS/2 sans phytohormones une semaine à l'obscurité, puis les cultures sont transférées un mois à la lumière. Dans les deux cas, la lecture des résultats se fait après un mois de culture en présence de lumière.

Acclimatation des plantules

Les plantules enracinées ont été acclimatées sur des pots de tourbe. Elles ont été pulvérisées après transfert par une solution de Benlate® à 1 %. Chaque pot a été recouvert par un sachet en plastique transparent durant deux mois pour assurer un taux d'humidité élevé. L'arrosage se fait chaque semaine avec la solution MS/2. Les plantules sont maintenues en salle de culture dans les mêmes conditions que précédemment.

Pour chaque étude, trois essais d'une trentaine d'échantillons ont été effectués. Les résultats sont comparés par analyse de variance (ANOVA) avec le test "Duncan's Multiple Range". Les pousses sont considérées peu développées quand leur taille est inférieure à 3 mm ou encore que le nombre de tiges et de feuilles est inférieur ou égal à 2.

RÉSULTATS

Mise en culture des bourgeons axillaires

Effet des cytokinines

La taille des bourgeons débouffés après un mois diffère selon le type et la concentration de cytokinines utilisés (Tableau 1, Photos 2-5). La BAP à 2,22 μM donne une croissance maximale (tiges de 9,1 mm). Elle est suivie de la zéatine sans différence significative pour les concentrations étudiées alors que la kinétine est la plus défavorable pour l'élongation des bourgeons.

La BAP permet une néoformation de bourgeons, notamment à 2,22 μM où le nombre de bourgeons et de feuilles sont maximaux. Pour les autres cytokinines, un seul bourgeon par explant est obtenu quelle que soit leur concentration. Pour la néoformation de feuilles, la zéatine et la 2-iP donnent des valeurs proches, significativement non supérieures à celles de la kinétine. Les pourcentages de bourgeons peu développés et d'explants non caulogènes sont faibles en présence de BAP et de zéatine. La 2-iP donne des bourgeons peu développés, mais peu d'explants non caulogènes.

Tableau I :
Effet de quatre cytokinines sur le débourrement de bourgeons axillaires de jeunes plantules de Caroubier après un mois de culture sur le milieu WPM.

Cytokinines (µM)	Taille des pousses (mm)	Nombre de bourgeons par pousse	Nombre de feuilles par pousse	Bourgeons peu développés (%)	Explants non caulogènes (%)	
BAP	2,22	9,1 ± 0,8 ^a	1,55 ± 0,16 ^a	4,33 ± 0,38 ^a	22,2 ^{cd}	22,0 ^{cd}
	4,44	5,2 ± 0,4 ^c	1,21 ± 0,11 ^b	2,80 ± 0,18 ^b	30,4 ^c	28,6 ^{bc}
zéatine	2,22	7,0 ± 0,6 ^b	1 ^c	2,00 ± 0,17 ^{bc}	23,1 ^{cd}	18,2 ^{cde}
	4,44	6,2 ± 0,5 ^b	1 ^c	2,53 ± 0,19 ^{bc}	25,9 ^{cd}	23,7 ^{bcd}
2-iP	2,22	4,7 ± 0,4 ^c	1 ^c	2,46 ± 0,20 ^{bc}	55,6 ^a	10,0 ^e
	4,44	6,1 ± 0,5 ^b	1 ^c	2,61 ± 0,21 ^{bc}	44,4 ^b	11,1 ^e
Kinéatine	2,22	2,7 ± 0,2 ^d	1 ^c	1,72 ± 0,15 ^c	44,4 ^b	33,3 ^b
	4,44	4,4 ± 0,4 ^c	1 ^c	1,84 ± 0,14 ^c	20,0 ^d	50,1 ^a

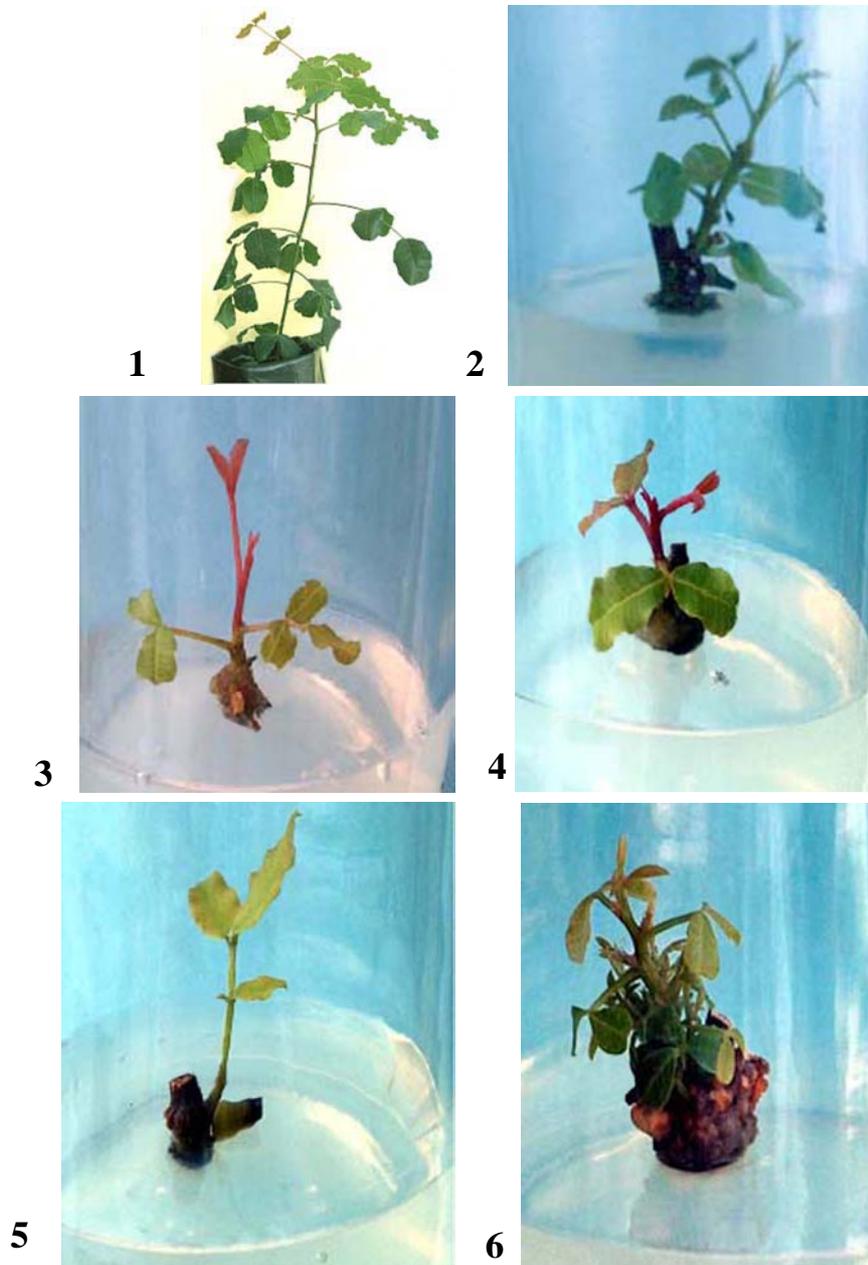
Les valeurs ayant les mêmes lettres pour une même colonne ne présentent pas de différence significative à 5 %.

Effet de la BAP seule ou combinée avec l'AG₃

L'association d'AG₃ à 2,22 µM de BAP améliore l'élongation des bourgeons débouffés, qui atteignent 11,6 mm (Tableau II). Pour 4,44 µM de BAP, la taille des pousses est minimale lorsque la concentration d'AG₃ est faible.

La combinaison d'1,44 µM d'AG₃ avec la BAP est efficace sur la néoformation de feuilles et la diminution du pourcentage d'explants non caulogènes. Avec 2,22 µM de BAP et 1,44 µM d'AG₃, on atteint 5,24 feuilles (Photo 6) et seulement 8,4 % de pousses peu développées, alors que le nombre de bourgeons par pousse n'est statistiquement pas modifié par rapport aux autres concentrations d'AG₃.

L'addition d'AG₃ à la BAP a aussi un effet sur le maintien des pousses dont les feuilles sont vertes et en bon état, alors qu'en présence de la BAP seule, elles sont légèrement violettes.



Phase d'initiation de la micropropagation du Caroubier par culture in vitro de bourgeons axillaires de plantules âgées de sept mois. Jeunes plantules de 7 mois cultivée sur la tourbe (Photo 1) ; pousse issue du bourgeon axillaire, suite à un mois de culture sur le milieu WPM additionné de 2,22 μM de BAP (Photo 2), de 2i-P (Photo 3), de kinétine (Photo 4), de zéatine (Photo 5), de 2,22 μM de BAP combinée à 1,44 μM d'AG₃ (Photo 6).

Tableau II :
Effet de la BAP combinée à l'AG₃ sur le débourrement des bourgeons axillaires de jeunes plantules du Caroubier après un mois de culture sur le milieu WPM.

BAP (μM)	AG ₃ (μM)	Taille des pousses (mm)	Nombre de bourgeons par pousse	Nombre de feuilles par pousse	Bourgeons peu développés (%)	Explants non caulogènes (%)
2,22	0	9,1 ± 0,8 ^{bc}	1,55 ± 0,16 ^{ab}	4,33 ± 0,38 ^{bc}	22,2 ^{abcd}	22,0 ^a
	0,29	8,7 ± 0,6 ^c	1,66 ± 0,15 ^a	4,66 ± 0,42 ^{ab}	20,3 ^{bcd}	11,3 ^b
	0,58	8,6 ± 0,7 ^c	1,36 ± 0,14 ^{abc}	3,81 ± 0,29 ^{bc}	26,4 ^{ab}	11,6 ^b
	1,44	11,6 ± 1,0 ^a	1,52 ± 0,15 ^{ab}	5,24 ± 0,47 ^a	8,4 ^e	0,0 ^c
	2,89	9,5 ± 0,9 ^b	1,34 ± 0,13 ^{abc}	4,12 ± 0,38 ^{bc}	13,4 ^{de}	5,6 ^{bc}
4,44	0	5,2 ± 0,4 ^f	1,21 ± 0,11 ^{bc}	2,80 ± 0,18 ^{de}	30,4 ^a	28,6 ^a
	0,29	4,4 ± 0,5 ^e	1,10 ± 0,09 ^c	2,32 ± 0,19 ^e	27,8 ^a	20,5 ^a
	0,58	6,0 ± 0,7 ^e	1,37 ± 0,12 ^{abc}	3,60 ± 0,28 ^{cd}	25,5 ^{ab}	25,8 ^a
	1,44	7,1 ± 0,7 ^d	1,38 ± 0,15 ^{abc}	4,00 ± 0,36 ^{bc}	15,5 ^{cde}	7,7 ^{bc}
	2,89	5,8 ± 0,6 ^e	1,22 ± 0,13 ^{bc}	3,54 ± 0,32 ^{cd}	17,9 ^{bcd}	8,3 ^{bc}

Les valeurs ayant les mêmes lettres pour une même colonne ne présentent pas de différence significative à 5 %.

Sélection d'un clone

Trois clones ont été obtenus et ils ne montrent pas de différence significative de taille sur trois subcultures (Tableau III). La néoformation de tiges est plus abondante pour le clone 2, de manière nette à partir de la deuxième subculture. Le nombre de feuilles semble peu affecté par le type de clone. Le nombre de pousses peu développées diminue avec les subcultures et devient nul.

Le clone 2 a été retenu pour la mise au point de la phase de multiplication.

Tableau III :
Effet de trois subcultures sur l'évolution de trois clones de Caroubier
après un mois de culture sur le milieu WPM en présence de 2,22 μ M de
BAP et 1,44 μ M d'AG₃.

Subculture	Clone	Taille des pousses	Nombre de tiges par pousse	Nombre de feuilles par pousse	% de pousses peu développées
1	1	12,2 \pm 1,3 ^b	4,30 \pm 0,34 ^c	3 \pm 0,3 ^{ab}	5,3 ^a
	2	13,5 \pm 1,2 ^{ab}	5,65 \pm 0,46 ^b	2,71 \pm 0,25 ^{ab}	3,3 ^{ab}
	3	12,6 \pm 1,1 ^{ab}	5,15 \pm 0,51 ^{bc}	2,78 \pm 0,27 ^{ab}	4,9 ^{ab}
2	1	13,3 \pm 1,3 ^{ab}	4,97 \pm 0,55 ^{bc}	2,52 \pm 0,24 ^b	2,5 ^{abc}
	2	14,3 \pm 1,4 ^a	6,69 \pm 0,62 ^a	2,96 \pm 0,26 ^{ab}	2,0 ^{bc}
	3	13,1 \pm 1,1 ^{ab}	4,98 \pm 0,53 ^{bc}	3,15 \pm 0,30 ^a	3,8 ^{ab}
3	1	13,1 \pm 1,4 ^{ab}	5,18 \pm 0,47 ^{bc}	2,9 \pm 0,28 ^{ab}	0 ^c
	2	14,0 \pm 1,3 ^a	6,86 \pm 0,71 ^a	2,99 \pm 0,22 ^{ab}	0 ^c
	3	13,2 \pm 1,2 ^{ab}	5,21 \pm 0,49 ^{bc}	2,94 \pm 0,24 ^{ab}	0 ^c

Les valeurs ayant les mêmes lettres pour une même colonne ne présentent pas de différence significative à 5 %.

Multiplication des pousses

Effet des macroéléments MS et WPM

L'élongation des pousses du clone 2 ne dépend pas des solutions de macroéléments, mais diminue avec la concentration en BAP (Tableau IV).

Au contraire, la formation de tiges et de feuilles est plus importante en présence des macroéléments MS, avec un nombre de tiges voisin pour les trois concentrations testées. Le nombre maximal de feuilles atteint 4,48 à 1,33 μ M.

Bien que le milieu WPM donne moins de tiges et de feuilles par pousse (Photos 7-9), il n'a pas été pour autant abandonné. En effet, avec les macroéléments MS, des désordres physiologiques ont été observés : nécrose foliaire très fréquente, feuilles rudimentaires avec un limbe souvent réduit au rachis.

Tableau IV :
Effet des solutions de macroéléments WPM et MS sur la multiplication des pousses du Caroubier (clone 2) après un mois.

Macroéléments	BAP (µM)	Taille des pousses (mm)	Nombre pousses	Nombre de feuilles par pousse
WPM	1,33	15,8 ± 1,4 ^{ab}	6,45 ± 0,58 ^{bc}	2,45 ± 0,30 ^d
	2,22	14,1 ± 1,2 ^{bc}	7,20 ± 0,66 ^b	2,70 ± 0,28 ^c
	4,44	13,5 ± 1,2 ^c	5,89 ± 0,62 ^c	2,75 ± 0,29 ^c
MS	1,33	16,3 ± 1,4 ^a	9,00 ± 1,01 ^a	4,48 ± 0,55 ^a
	2,22	15,4 ± 1,3 ^{ab}	9,38 ± 1,12 ^a	3,77 ± 0,44 ^b
	4,44	13,7 ± 1,1 ^c	9,67 ± 1,14 ^a	3,93 ± 0,45 ^b

Les valeurs ayant les mêmes lettres pour une même colonne ne présentent pas de différence significative à 5 %.

Effet des régulateurs de croissance

Les concentrations moyennes de BAP (1,33 à 3,11 µM) conviennent pour l'élongation (14,4 à 15,9 mm), le nombre de tiges (6,13 à 6,56) et le nombre de feuilles (2,74 à 3,42) des pousses issues des bourgeons axillaires du clone 2 (Tableau V). Le développement est faible à 6,66 µM. De plus, les fortes concentrations de BAP entraînent une vitrification des explants.

Tableau V :
Effet de six concentrations de la BAP sur la multiplication des pousses du Caroubier (clone 2) après un mois de culture sur le milieu WPM.

BAP (µM)	Taille des pousses (mm)	Nombre de pousses	Nombre de feuilles par pousse
0,44	14,7 ± 1,3 ^{ab}	4,92 ± 0,50 ^c	2,74 ± 0,26 ^c
1,33	15,9 ± 1,4 ^a	6,56 ± 0,58 ^a	2,87 ± 0,26 ^c
2,22	14,4 ± 1,2 ^{ab}	6,30 ± 0,64 ^a	3,07 ± 0,24 ^b
3,11	14,5 ± 1,3 ^{ab}	6,13 ± 0,53 ^{ab}	3,42 ± 0,35 ^a
4,44	13,0 ± 1,1 ^{bc}	5,33 ± 0,46 ^{bc}	2,63 ± 0,40 ^c
6,66	12,4 ± 1,2 ^c	1,92 ± 0,22 ^d	2,70 ± 0,26 ^c

Les valeurs ayant les mêmes lettres pour une même colonne ne présentent pas de différence significative à 5 %

La combinaison de l'AG₃ à la BAP n'a pas d'impact positif sur l'élongation des bourgeons et sur la formation de tiges et de feuilles (Tableau VI). Le nombre de tiges et de feuilles par pousse sont inférieurs à ceux obtenus en présence de la BAP seule. Cependant, l'addition d'AG₃ réduit les désordres physiologiques comme la nécrose foliaire souvent observée en présence de BAP seule.

Tableau VI :
Effet de cinq concentrations d'AG₃ combinées à 1,33 µM de BAP sur la multiplication des pousses du Caroubier (clone 2) après un mois de culture sur le milieu WPM.

AG ₃ (µM)	Taille des pousses (mm)	Nombre de pousses	Nombre de feuilles par pousse
0	15,6 ± 1,4 ^a	6,44 ± 0,71 ^a	3,52 ± 0,28 ^a
0,29	13,2 ± 1,2 ^b	5,10 ± 0,63 ^b	3,18 ± 0,33 ^b
0,87	14,9 ± 1,5 ^{ab}	5,05 ± 0,55 ^b	2,98 ± 0,30 ^b
1,44	15,2 ± 1,5 ^a	5,11 ± 0,44 ^b	3,06 ± 0,32 ^b
2,89	13,1 ± 1,3 ^b	4,24 ± 0,50 ^b	2,96 ± 0,40 ^b

Les valeurs ayant les mêmes lettres pour une même colonne ne présentent pas de différence significative à 5 %.

L'élongation des pousses est favorisée par l'ANA et l'AIB (Tableau VII, Photo 10) et minimale avec le 2,4-D (11,3 mm). La formation de tiges est maximale (8,79) avec l'ANA et celle de feuilles (3,42) en présence d'AIA. L'ajout d'auxine entraîne cependant la formation d'un cal basal.

Tableau VII :
Effet de quatre auxines (0,5 µM) combinées à 1,33 µM de BAP sur la multiplication des pousses du Caroubier (clone 2) après un mois de culture sur le milieu WPM.

Auxines	Taille des pousses (mm)	Nombre de pousses	Nombre de feuilles par pousse
0	16,4 ± 1,7 ^b	6,80 ± 0,74 ^b	2,70 ± 0,26 ^c
ANA	20,5 ± 1,9 ^a	8,79 ± 0,91 ^a	2,87 ± 0,26 ^c
AIB	18,9 ± 1,8 ^a	7,20 ± 0,80 ^b	3,07 ± 0,24 ^b
AIA	14,7 ± 1,5 ^b	1,92 ± 0,33 ^c	3,42 ± 0,35 ^a
2,4-D	11,3 ± 1,2 ^c	1,50 ± 0,25 ^c	2,63 ± 0,40 ^c

Les valeurs ayant les mêmes lettres pour une même colonne ne présentent pas de différence significative à 5 %.

Enracinement des pousses

L'enracinement des pousses est favorisé par un passage une semaine sur un milieu solide renfermant de l'AIB (Tableau VII A), Photo 11). Il est maximal (82,5 %) à 10 µM. Cependant, le nombre de racines et leur taille sont plus élevés à 5 µM. L'AIA à 5 µM donne de moins mauvais résultats qu'à 10 µM pour l'induction des racines et leur élongation.

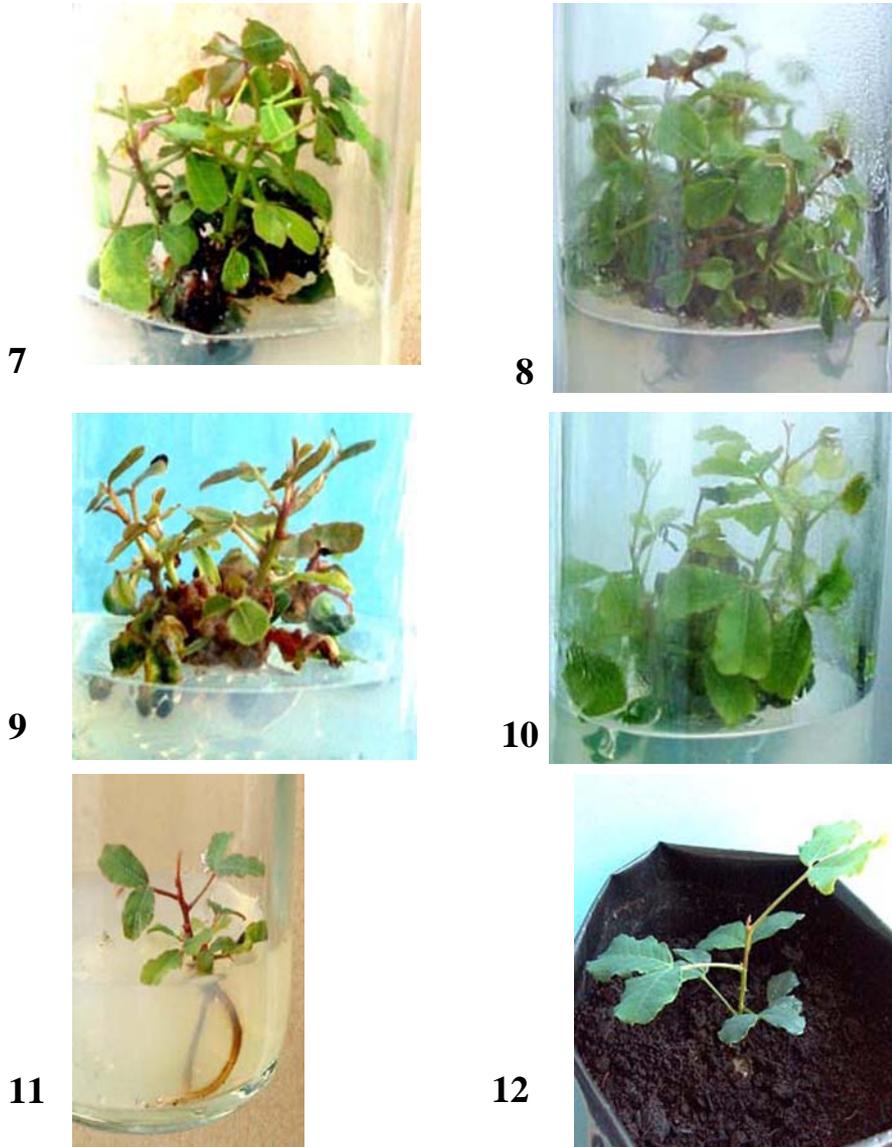
Tableau VIII :
Effet de d'AIA ou d'AIB à 5 ou 10 μ M sur l'enracinement des pousses de Caroubier (clone 2) par (A) séjour une semaine à l'obscurité sur MS/2 additionné de l'auxine ou par (B) trempage trois minutes dans l'auxine suivi d'une semaine à l'obscurité. Les cultures sont ensuite transférées un mois à la lumière.

Auxines (μM)	Taille des plantules (mm)	Nombre de tiges par plantule	Nombre de feuilles par plantule	Enracinement (%)	Nombre de racines par plantule	Longueur des racines (mm)	
A							
AIB	5	14,1 $\pm 1,5^{ab}$	1,18 $\pm 0,15^c$	5,74 $\pm 0,65^{bc}$	65,6 ^b	5,62 $\pm 0,49^a$	52,8 $\pm 4,9^b$
	10	15,7 $\pm 1,4^a$	2,02 $\pm 0,28^a$	7,28 $\pm 0,74^a$	82,5 ^a	3,10 $\pm 0,30^b$	45,6 $\pm 4,4^c$
AIA	5	11,9 $\pm 1,2^{cde}$	1,36 $\pm 0,21^{bc}$	6,03 $\pm 0,58^b$	38,1 ^d	2,22 $\pm 0,19^c$	32,2 $\pm 2,9^d$
	10	10,2 $\pm 1,1^e$	1,00 $\pm 0,00^c$	4,96 $\pm 0,50^c$	27,9 ^e	1,41 $\pm 0,15^d$	30,4 $\pm 0,3^d$
B							
AIB	5	13,4 $\pm 1,4^{bc}$	1,37 $\pm 0,28^{bc}$	6,26 $\pm 0,58^b$	52,4 ^c	3,33 $\pm 0,41^b$	60,3 $\pm 5,9^a$
	10	14,5 $\pm 1,5^{ab}$	1,83 $\pm 0,17^{ab}$	7,50 $\pm 0,74^a$	60,2 ^{bc}	2,85 $\pm 0,33^{bc}$	50,5 $\pm 4,4^{bc}$
AIA	5	12,7 $\pm 1,3^{bcd}$	1,21 $\pm 0,13^c$	5,41 $\pm 0,50^{bc}$	11,7 ^f	1,20 $\pm 0,15^d$	28,6 $\pm 3,3^d$
	10	11,1 $\pm 1,2^{de}$	1,09 $\pm 1,01^c$	4,92 $\pm 0,52^c$	18,4 ^f	1,18 $\pm 0,14^d$	25,3 $\pm 3,2^d$

Les valeurs ayant les mêmes lettres pour une même colonne ne présentent pas de différence significative à 5 %.

Le pourcentage d'enracinement est meilleur par trempage dans une solution d'AIB que d'AIA (Tableau VIII B). L'AIB à 10 μ M donne plus de tiges, plus de feuilles et plus de racines de plus longue taille.

La méthode de trempage donne un pourcentage d'enracinement plus faible, moins de racines par plantule. Cependant, la taille des racines par cette méthode atteint 60,3 et 50,5 mm à 5 et 10 μ M d'AIB.



Phases de multiplication et d'allongement, d'enracinement et d'acclimatation de la micropropagation du Caroubier par culture in vitro de bourgeons axillaires de plantules âgées de sept mois.

Multiplication et élongation des pousses issues de bourgeons axillaires après un mois de culture sur milieu WPM additionné de 1,33 μM de BAP (Photo 7) ou de 2,22 μM de BAP (Photo 8), sur milieu MS additionné de 2,22 μM de BAP (Photo 9), sur milieu WPM additionné de 2,22 μM de BAP et 0,5 μM d'AIB (Photo 10). Plantule après une semaine à l'obscurité sur le milieu MS/2 additionné de 10 μM d'AIB suivi d'un transfert un mois à la lumière sur le même milieu sans auxine (Photo 11). Plantule âgée de trois mois après acclimatation sur de la tourbe (Photo 12).

Acclimatation des plantules

L'acclimatation des plantules après la phase de multiplication est délicate. Le pourcentage de survie des plantules ne dépasse pas 60 % (Photo 12).

DISCUSSION ET CONCLUSION

L'utilisation de jeunes plantules issues de germination pour la régénération du Caroubier par culture de nœuds n'a pas posé de problèmes, la désinfection des explants par l'hypochlorite de calcium à 7 % et le chlorure mercurique à 0,1 % étant généralement efficace. Le pourcentage de contamination des cultures a été inférieur à 20 %.

Le débourrement des bourgeons axillaires et leur élévation se fait mieux en présence de la BAP à 2,22 μM , et s'accompagne d'une formation maximale de bourgeons et de feuilles, alors que les autres cytokinines sont moins efficaces. Ces résultats concordent avec ceux obtenus lors de l'étude de l'élévation et de la multiplication des pousses de Caroubier par culture de bourgeons axillaires d'un arbre femelle de la variété 'Mulata' [17].

La combinaison de 2,22 μM d'AG₃ avec 1,44 μM de BAP donne une taille des pousses, un nombre de tiges et de feuilles maximaux. D'autres chercheurs [2] ont montré que la BAP à 2,22 et 4,44 μM associée à l'AG₃ à 0,29 ou 0,72 μM sont favorables à la culture et à la multiplication de pousses issues de bourgeons axillaires de jeunes plantules, contrairement aux concentrations de BAP supérieures à 4,44 μM .

L'organogénèse des pousses des trois clones obtenus tend à se stabiliser à partir de la deuxième subculture. L'organogénèse des pousses du clone 2 est plus importante sur le milieu MS mais les macroéléments WPM s'accompagnent de désordres physiologiques moins fréquents et ont été retenus.

La BAP à 1,33 et 3,1 μM favorise la multiplication des pousses, contrairement aux concentrations élevées qui entraînent une vitrification des explants. La vitrification des pousses du Caroubier de même que

l'apparition de lenticelles sur les entre-nœuds observée sous forme de fines écailles blanches a été évoquée dans d'autres travaux [2,21-22], pour des concentrations de BAP dépassant 2,22 μM .

Combiné à 1,33 μM de BAP, l' AG_3 n'améliore pas la multiplication des pousses du clone sélectionné, contrairement à certaines auxines comme l'ANA à faible concentration (0,5 μM). Cependant, l'auxine entraîne la formation d'un cal basal gênant la micropropagation du Caroubier. Ces résultats rejoignent ceux obtenus au cours de la culture des épicotyles issus d'embryons immatures [21].

L'enracinement des pousses se fait mieux en présence d'AIB que d'AIA pour les deux méthodes testées. L'efficacité de l'AIB pour l'enracinement des pousses du Caroubier a été prouvée dans d'autres travaux [2,17,21]. L'enracinement est maximal en présence de 10 μM d'AIB : on atteint 82,5 % d'enracinement par induction sur milieu solide et 60,2 % par trempage, mais le nombre de racines et leur longueur sont plus élevés à 5 μM .

RÉFÉRENCES

- 1 - Battle (I.), Tous (J.) - Carob tree *Ceratonia siliqua* L. - *Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops*. 17. Gatersleben: Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research ; Rome: International Plant Genetic Resources Institute, 1997, 92 p.
- 2 - Belaizi (M.), Bolen (M.R.), Boxus (P.) - Régénération *in vitro* et acclimatation du caroubier (*Ceratonia siliqua* L.) - *Quel avenir pour l'amélioration des plantes ?* Ed AUPELF-UREF. Paris : John Libbey Eurotext, 1994, p. 227-232.
- 3 - Carimi (F.), Di Lorenzo (R.), Crescimanno (F.G.) - Callus induction and somatic embryogenesis in carob (*Ceratonia siliqua* L.) from ovule culture. - *Sci. Hortic.*, 1997, **70**(1), 73-79.
- 4 - Condit (I.J.) - The carob in California - *Agric. Exper. Station. Bulletin* no. 309. Berkeley: Univ. California Press, 1919, 431-440.

- 5 - Correia (P.M.), Martins-Loução (M.A.) - Preliminary studies on mycorrhizae of *Ceratonia siliqua* L. In *Mycorrhizas in integrated systems from genes to plant development*. Bronx, NY: New York Botanical Gardens, 1994, 86-88.
- 6 - Dellaporta (S.L.), Calderon-Urrea (A.) - Sex determination in flowering plants. - *Plant Cell*, 1993, **5**(10), 1241-1251. <http://www.plantcell.org/cgi/reprint/5/10/1241.pdf>
- 7 - Gharnit (N.), El Mtili (N.), Ennabili (A.), Sayah (F.) - Floral characterization of carob tree (*Ceratonia siliqua* L.) from the province of Chefchaouen (NW of Morocco). - *Moroccan J. Biol*, 2004, 41-51.
- 8 - Hartmann (H.T.), Kester (D.E.) - Plant propagation, principles and practices. 4th Ed. Englewood Cliffs, NJ: Prentice Hall, 1983.
- 9 - Hillcoat (D.), Lewis (G.), Verdcourt (B.) - A new species of *Ceratonia* (Leguminosae-Caesalpinioideae) from Arabia and the Somali Republic. - *Kew Bull.*, 1980, **35**(2), 261-271.
- 10 - Irwin (H.S.), Barneby (R.C.) - Cassieae, advances in legume systematics. - *Royal Botanic Gardens, Kew*, Vol. 1, Polhill (R.M.), Raven (P.H.) (Eds.), England, 1981, p. 97-106.
- 11 - Lee (C.L.), Paul (J.L.), Hackett (W.P.) - Promoting of rooting in stem cuttings of several ornamental plants by pretreatment with acid or base. - *HortScience*, 1977, **12**(1), 41-42.
- 12 - McCown (B.H.), Lloyd (G.) - Woody plant medium (WPM) - A mineral nutrient formulation for microculture of woody plant species. - *HortScience*, 1981, **16**(3), 453.
- 13 - Murashige (T.), Skoog (F.) - A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. - *Physiol. Plant.*, 1962, **15**(3), 473-497.
- 14 - Rejeb (M.N.) - Le caroubier en Tunisie : Situation et perspectives d'amélioration - *Quel avenir pour l'amélioration des plantes ?* Ed. AUPELF-UREF. Paris : John Libbey Eurotext, 1995, p. 79-85.
- 15 - Retana (J.), Ramoneda (J.), García del Pino (F.), Bosch (J.) - Flowering phenology of carob, *Ceratonia siliqua* L. (Caesalpinaceae). - *J. Hortic. Sci.*, 1994, **69**(1), 97-103.
- 16 - Romano (A.), Barros (S.), Martins-Loução (M.A.) - Micropropagation of the Mediterranean tree *Ceratonia siliqua*. - *Plant Cell, Tissue Organ Cult.*, 2002, **68**(1), 35-41.

- 17 - Sebastian (K.T.), McComb (J.A.) - A micropropagation system for carob (*Ceratonia siliqua* L.). - *Sci. Hortic.*, 1986, **28**(1-2), 127-131.
- 18 - Tucker (S.C.) - The developmental basis for sexual expression in *Ceratonia Siliqua* (*Leguminosae: Cesalpinoideae: Cassieae*). - *Am. J. Bot.*, 1992, **79**(3), 318-327.
- 19 - Thomas (V.), Metha (A.R.) - Effect of phloroglucinol on shoot growth and initiation of roots in carob tree cultures grown *in vitro*. - In Sen (S.K.), Giles (K.L.) (Eds.), *Proc. Int. Plant Cell Cult. Crop Improvement*, Calcutta India. New York and London: Plenum Press, 1983, p. 451-457.
- 20 - Vinterhalter (D.), Vinterhalter (B.) - Factors affecting *in vitro* propagation of carob (*Ceratonia siliqua* L.). - *Arch. Biol. Sci*, Belgrade, 1992, **44**(3-4), 177-186.
- 21 - Vinterhalter (D.), Grubisic (D.), Bojovic-Cvetic (D.), Budimir (S.) - Lenticel hypertrophy in shoot cultures of *Ceratonia siliqua* L. - *Plant Cell, Tissue Organ Cult.*, 1992, **31**(2), 111-114.

ABSTRACT

Micropropagation of carob (*Ceratonia siliqua*) by axillary bud culture arising from young plantlets

The micropropagation of carob by axillary bud culture arising from seven-month-old plantlets was studied on a medium with WPM macronutrients supplemented with MS micronutrients and vitamins. The budding of axillary buds was assumed with BA as cytokinine and was improved with the combination 1.44 μM GA - 2,22 μM BA. Shoot multiplication of one of the clones obtained was facilitated with 2.22 μM BA, alone or combined with 0.5 μM ANA or IBA. Shoot rooting on MS/2 was promoted by 10 μM IBA.

Key-words: carob, *Ceratonia siliqua*, micropropagation.
