



Effets des macroéléments et des auxines sur la micropropagation du Caroubier (*Ceratonia siliqua* L., Leguminosae) par culture d'apex. (Effects of macroelements and auxins on the micropropagation of Carob tree (*Ceratonia siliqua* L., Leguminosae) by shoot tip cultures)

R. Saïdi¹, B. El bouzdoudi², M. B. Kbiach², A. Lamarti², A. Maouni¹

¹Département des Sciences de la Matière et de la Vie, Ecole Normale Supérieure, BP 202, 93150 Martil, Maroc.

²Équipe de Biotechnologie végétale, Département de Biologie, Faculté des Sciences, M'hannech II, BP 2121, 93002 Tétouan, Maroc.

Received 7 May 2015, Revised 14 June 2015, Accepted 15 June 2015

*Corresponding Author. E-mail : rabahsaidi1@gmail.com; Tel: (212666391643)

Résumé

La micropropagation du Caroubier par culture d'apex de jeunes plantules de sept jours a été abordée sur différents types de milieux de culture à base de macroéléments WPM, Durzan modifié ou non, SH, B5, MS, MS/2, Heller modifié, BTM et GD additionnés de microéléments et vitamines MS. Les effets de quatre auxines (AIA, AIB, ANA et 2,4-D) combinées à la BAP ont été aussi testés sur le milieu WPM. Le débourrement des bourgeons a été favorisé par la BAP à 0,5 mg/l comme la cytokinine adéquate notamment sur les milieux WPM et MS. De même la combinaison de cette concentration de BAP avec l'AIB ou à l'AIA à 0,1 mg/l a donné de bons résultats. La multiplication des pousses a été stimulée par des concentrations moyennes de BAP (0,5mg et 1 mg/l) seule ou combinée à une faible concentration d'AIB (0,1 mg/l). L'enracinement direct des pousses issues de la culture d'apex se faisait mieux sans traitement auxinique préalable sur MS/2.

Mots clés : Caroubier, *Ceratonia siliqua*, culture d'apex, micropropagation.

Summary

Micropropagation of *Ceratonia siliqua* (carob) from the apex of 7 days old seedlings was attempted on different growth media based on WPM, Durzan "modified or not", SH, B5, MS, MS/2, modified Heller, BTM and GD supplemented with microelements, vitamins and MS. Four different auxins: AIA, AIB, ANA and 2,4D were tested in conjunction with BAP in WPM for the stimulation of bud development. BAP at 0.5 mg/l as well as cytokine favored bud development mainly in WPM and MS media. Similarly combination of BAP at 0.5 mg/l and AIB or AIA at 0.1 mg/l has given good results. Multiplication was stimulated at low concentrations of AIB (0.1 mg/l) and direct rooting of obtained plantlets was better without any auxin pretreatment in MS/2.

Keywords : Carob, *Ceratonia siliqua*, apex culture, micropropagation.

Abréviations: WPM : Woody Plant Medium, SH: Schenk et Hildebrandt, B5 : Gamborg, MS : Murashige et Skoog, BTM : Broad-leaved Trees Medium, GD : Gresshof et Doy, AIA : Acide Indole 3-Acétique, AIB : Acide Indole 3-Butyrique, ANA : Acide 1 Naphtalène Acétique, BAP : Benzyl Amino Purine, 2,4D : Acide 2,4 Dichlorophénoxyacétique.

Introduction

Le Caroubier (*Ceratonia siliqua* L., Leguminosae) [1] est une espèce agro-sylvo-pastorale ayant d'importants intérêts socio-économiques et écologiques, il est très adapté aux divers climats méditerranéens ainsi qu'à différents types de sol [2- 3- 4]. C'est une espèce généralement dioïque avec quelques formes hermaphrodites. Les fleurs sont généralement unisexuées [5- 6- 7- 8] et le sexe ratio entre pieds mâles et femelles est de 50 % [9- 10]. La première fructification est très retardée, elle a lieu normalement au bout de dix ans, toutefois, si l'arbre est bien entretenu il peut produire à partir de la quatrième année [11]. Toutes les parties de l'arbre (feuilles, écorce, racines, fruits et graines) sont utilisées en alimentation animale et en industrie agro-alimentaire et pharmaceutique ; la production mondiale de caroubes en 2007 a été de 250000 t et celle de graines était de

31500 t ; le Maroc est le premier producteur mondial de graines et le deuxième producteur de caroubes après l'Espagne [12].

La multiplication traditionnelle du caroubier se fait généralement par semis avec greffage précoce pour garantir la production de caroubes, cette technique longue et délicate ne peut satisfaire le besoin croissant en cette plante. D'où l'intérêt de développer les techniques de multiplication par le biais des biotechnologies.

Les premiers travaux de micropropagation du caroubier n'ont débuté que dans les années quatre-vingt [13-14-15], depuis lors, plusieurs recherches ont été publiées sur la culture *in vitro* de cet arbre en utilisant différents types d'explants [16-17-18-19-20-21-22-23].

Cette étude vise à faire progresser les connaissances et/ou les biotechnologies de multiplication du caroubier *in vitro* pour la production de vitroplants vigoureux aptes à s'acclimater dans le milieu naturel.

Dans l'objectif d'optimiser les conditions de sa micropropagation, nous avons varié les conditions minérales et hormonales afin de définir les meilleures conditions pour la caulogénèse. L'apex des jeunes germinations a été choisi en partant du fait que cette partie renferme le méristème caulinaire qui a une grande capacité organogène.

2. Matériels et méthodes

2.1. Préparation des explants

Les graines ont été récoltées à partir d'un arbre élite de la région de BniMtil située dans le rif occidental marocain. La germination a été réalisée dans des flacons d'eau gélosée stérile (0,7 %) après désinfection et scarification par l'acide sulfurique 36 N durant une heure, suivie de trois lavages successifs de 10 mn à l'eau distillée stérile. Les apex d'une taille de 4 à 5 mm ont été prélevés à partir de jeunes plantules de sept jours au stade de deux feuilles cotylédonaire. Ils ont été directement repiqués dans des flacons de 200 ml contenant 50 ml de milieu de culture solidifié par l'agar (0,7 %) auxquels ont été additionnés des microéléments et vitamines de Murashige et Skoog (MS)[24], ainsi que 30 g/l de saccharose et 0,1 g/l de myo-inositol. Le pH a été ajusté à 5,8 avant l'autoclavage. La photopériode était de 16 heures de lumière avec 4000 lux et une température de 23 à 25°C le jour et 20°C la nuit. Après 30, 45 et 60 jours, la taille des pousses a été mesurée et le nombre de tiges et de feuilles dénombrés. Pour chaque expérience, trois essais d'une trentaine d'échantillons (n = 30) ont été effectués. Les moyennes obtenues lors des trois essais pour chaque paramètre ont été comparées par analyse de la variance (ANOVA) avec le test Duncan's Multiple Range (coefficient $\alpha = 0,05$). Les pousses ont été considérées peu développées quand leur taille était inférieure à 5 mm et quand le nombre de feuilles était inférieur à 2.

2.2. Effets de différentes solutions de macroéléments sur le développement des pousses

Afin de déterminer la composition minérale la plus favorable au développement des apex du Caroubier, on a étudié une série de milieux de base différents par la composition et/ou par la concentration en macroéléments en présence de la BAP (0,5 mg/l) : MS et MS/2 [24], WPM [25], Durzan et Durzan modifié ($\text{NH}_4\text{NO}_3/2$; $\text{KNO}_3 \times 2 + 0,65\text{g/l KCl}$)[26], SH [27], B5 [28], Heller modifié ($\text{Heller} \times 1,25 + 1,15\text{g/l} (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)[29], BTM [30] et GD [31].

2.3. Effets de différents types d'auxines sur le débournement des apex

Parmi les milieux étudiés, le milieu WPM s'est avéré plus adapté au débournement et au maintien des pousses de caroubier, alors il a été choisi pour tester l'effet de quatre auxines (AIA, AIB, ANA et 2,4-D) sur le développement des apex. La concentration choisie était de 0,1 mg/l pour chaque auxine, concentration à laquelle 0,5 mg/l de BAP a été additionné.

2.4. Multiplication et élongation des pousses

La multiplication des pousses obtenues par culture d'apex a été abordée sur le milieu WPM, au départ cinq concentrations de BAP ont été testées : 0,1 ; 0,3 ; 0,5 ; 1 ; et 1,5 mg/l. Dans un deuxième temps on a étudié les mêmes concentrations de BAP, mais combinées avec l'AIB à faible concentration (0,1 mg/l).

2.5. Enracinement direct des pousses issues de la culture d'apex

L'induction de l'enracinement des pousses issues de la culture d'apex a été facilement obtenue en absence de phytohormones ou en présence d'auxines à faible concentration. Dans le premier cas, les apex ont été directement cultivés sur un milieu dilué de moitié composé de macroéléments MS, de microéléments et vitamines MS, de 3 % de saccharose, 0,1 g/l de myo-inositol et 0,7 % d'agar. Dans le deuxième cas, ce milieu renfermait en plus une auxine (AIA, AIB, ANA et 2,4-D) à 0,1 mg/l. La lecture des résultats a été faite après trente jours.

2.6. Acclimatation des plantules

Après trente jours, les plantules vigoureusement enracinées ont été transférées sur des pots contenant de la tourbe et une solution de Benlate à 1 % a été pulvérisée. Des sachets plastiques transparents recouvraient chaque plantule pour assurer un taux d'humidité élevé. Les cultures ont été arrosées une fois par semaine avec la solution minérale MS/2 et maintenues en salle de culture dans les mêmes conditions que précédemment.

3. Résultats et discussion

3.1. Effet de différentes solutions de macroéléments sur le développement des pousses

L'action de différents milieux sur la croissance des pousses semblait être très hétérogène, après le 30^e j, la taille des pousses était maximale sur le milieu MS, suivi des milieux GD, WPM et B5, avec des valeurs similaires. Les autres solutions avaient des actions qui se rapprochaient les unes des autres, mais les milieux les plus défavorables à la croissance étaient ceux de Heller modifié et SH (Tableau 1).

Avec l'âge, l'écart de taille entre les pousses a commencé à se réduire notamment après le 60^e j. Les valeurs ont alors été réparties en trois groupes statistiques (a, b et c). Les milieux qui entraînaient une bonne croissance restaient les mêmes, à savoir Durzan, GD, WPM et MS à l'inverse des autres qui sont moins efficaces (MS/2, Durzan modifié, BTM, B5, Heller modifié et SH).

Tableau 1 : Effets de différentes solutions de macroéléments sur l'élongation des pousses et sur la néoformation des tiges de Caroubier (BAP : 0,5 mg/l) après 30, 45 et 60 jours.

Milieu	Taille des pousses (mm)			Nombre de tiges par pousse		
	30 j	45 j	60 j	30 j	45 j	60 j
WPM	12,7 ± 1,9 b	15,1 ± 2,9 a	17,9 ± 3,5 a	3,74 ± 1,32 a	4,11 ± 1,57 b	5,24 ± 1,3 a
Durzan	8,2 ± 3,4 cd	14,0 ± 2,9 ab	18,4 ± 3,2 a	1,16 ± 0,14g	1,71 ± 0,60 g	1,75 ± 0,69 e
Durzan modifié	9,6 ± 2,1 c	12,7 ± 2,2 bc	14,0 ± 2,8 b	1,29 ± 0,23 efg	1,97 ± 0,91 ef	2,67 ± 0,98 cd
SH	7,0 ± 1,6 de	8,9 ± 1,8 d	11,8 ± 2,4 c	2,40 ± 1,01 c	4,90 ± 1,64 a	5,08 ± 1,45 a
B5	11,6 ± 2,4 b	11,7 ± 2,5 c	12,3 ± 2,9 bc	1,86 ± 0,84 d	1,95 ± 0,88 ef	3,08 ± 1,31 bc
MS	14,8 ± 2,8 a	15,1 ± 2,8 a	17,7 ± 3,8 a	2,59 ± 0,88 b	3,75 ± 1,02 c	4,87 ± 1,24 a
MS/2	8,6 ± 1,9 cd	11,2 ± 2,7 c	14,0 ± 3,7 b	1,36 ± 0,41 ef	2,30 ± 0,77 d	2,63 ± 0,84 cd
Heller modifié	6,3 ± 2,1e	8,7 ± 1,8 d	12,2 ± 2,6 bc	1,30 ± 0,66 efg	2,11 ± 0,78 de	3,44 ± 1,07 b
BTM	7,8 ± 2,7 cde	11,1 ± 2,7 c	13,5 ± 2,3 bc	1,19 ± 0,16 fg	1,47 ± 0,46 h	2,67 ± 1,22 cd
GD	12,8 ± 2,1 b	13,9 ± 3,4 ab	18,1 ± 3,6 a	1,45 ± 0,44 fg	1,80 ± 0,75 fg	2,29 ± 0,82 d

La néoformation de tiges était nettement dépendante de la composition en macroéléments. En effet, dès le 30^e j, le milieu WPM s'est montré plus favorable au développement des tiges suivi de MS, alors que les milieux Durzan, BTM et GD étaient les plus défavorables. Après 60 j, le milieu SH a donné aussi une valeur proche de celles obtenue sur WPM et MS. Ces trois derniers milieux avaient des effets équivalents sur la néoformation des tiges et ont entraîné des valeurs maximales similaires (Tableau 2).



Figure 1: Pousses d'un mois, obtenue après culture d'apex de caroubier dans différentes conditions, (a) WPM + BAP (0,5 mg/l) ; (b) MS + BAP (0,5 mg/l) ; (c) WPM + BAP (0,5 mg/l) + AIB (0,1 mg/l).

La comparaison des résultats obtenus avec différents milieux ont montré aussi que le milieu WPM semblait avoir un effet spectaculaire sur la néoformation de feuilles dès le 30^e j, suivi du milieu MS, alors que les milieux Heller modifié et SH étaient les plus défavorables. Après le 60^e j, les milieux WPM et MS restaient les plus favorables avec des effets voisins, sans différence significative, contrairement aux autres milieux moins favorables et regroupés dans un même groupe statistique. De même, sur le milieu WPM le pourcentage de pousses peu développées était faible (Figure 1, a et b).

L'efficacité des milieux WPM et MS sur la culture d'apex a été prouvée par d'autres auteurs [32- 23]. La nécrose foliaire et la nécrose apicale qui l'accompagnait parfois étaient deux problèmes majeurs de la culture *in vitro* du Caroubier. La nécrose apicale a été observée chez d'autres dicotylédones, notamment chez le genre *Prunus*. Elle était attribuée à une insuffisance en calcium et en cytokinines et à la présence d'auxines dans le milieu [33]. La présence d'auxines semblait ne pas être responsable de ce problème, au moins pour le Caroubier. Le phénomène a été observé même en présence de BAP seule.

De même, les milieux MS, WPM et GD ont donné de bons résultats pour la régénération d'autres types d'explants de caroubier, soit à partir de bourgeons axillaires [19-21] soit à partir des épicotyles dérivant d'embryons immatures [16].

Tableau 2 : Effets de différentes solutions de macroéléments sur la néoformation des feuilles et sur le développement des pousses de Caroubier (BAP : 0,5 mg/l) après 30, 45 et 60 jours.

Milieu	Nombre de feuilles par pousse			% de pousses peu développées (<5mm)		
	30 j	45 j	60 j	30 j	45 j	60 j
WPM	11,27 ± 1,89 a	17,42 ± 2,85 a	19,54 ± 2,93 a	6,63 d	3,33 e	0 e
Durzan	3,84 ± 0,98 d	6,16 ± 1,44 c	7,14 ± 1,84 b	33,33 b	16 b	20 b
Durzan modifié	3,73 ± 0,89 d	5,58 ± 1,25 cd	8,04 ± 1,82 b	24,40 c	9 d	2 de
SH	3,34 ± 0,78 e	3,54 ± 0,87 f	5,48 ± 1,12 b	0 e	0 f	0 e
B5	4,37 ± 1,08 c	4,50 ± 1,19 e	4,66 ± 1,15 b	7,40 d	7,69 d	6,69 c
MS	10,33 ± 2,01 b	14,07 ± 3,16 b	17,07 ± 3,21 a	37,03 b	3,70 e	0 e
MS/2	4,28 ± 1,44 c	5,52 ± 1,56 cd	8,29 ± 1,81 b	76,91 a	8 d	4 d
Heller modifié	2,84 ± 0,91 f	5,03 ± 1,27 de	6,00 ± 1,48 b	19,23 c	3,44 e	3,70 d
BTM	3,81 ± 0,84 d	5,44 ± 1,23 cd	6,50 ± 1,85 b	20 c	11 c	2 de
GD	4,22 ± 1,18 c	5,41 ± 1,14 cd	6,14 ± 1,75 b	32,12 b	31,21 a	28,57 a

3.2. Effet des auxines sur le débourrement des pousses

En plus des solutions de macroéléments, les auxines influencent aussi la croissance et l'organogenèse des pousses de caroubier. En effet la taille des pousses variait en fonction du type d'auxines et de la période de mesure. Après le 30^e jour, la croissance maximale a été obtenue avec l'AIA et l'AIB, dont les valeurs étaient voisines et sans différence significative. La taille minimale a été observée surtout chez celles cultivées sur milieu sans auxines. Après le 60^e j, la 2,4-D a donné aussi des valeurs proches de celles de l'AIB (Tableau 3).

La néoformation de tiges et de feuilles a surtout été favorisée par l'AIB et l'AIA, quelle que soit la période de mesure. Alors que le nombre de tiges et de feuilles les plus faibles ont été obtenus avec l'ANA et ne présentaient pas de différence significative avec le témoin. Après le 45^e et le 60^e j, l'AIA et l'AIB ont continué à avoir le même effet et ont donné des valeurs maximales à l'inverse de l'ANA et de la 2,4-D (Tableau 4 ; Figure 1c).

Les auxines (AIA et AIB) à faible concentration (0,1 mg/l) ont déjà été utilisées associées à plusieurs concentrations de BAP avec parfois l'AG₃ par d'autres chercheurs et ont donné de bons résultats lors de la culture de microboutures dérivant d'un arbre [13]. Toutefois, d'autres études ont prouvé que même les fortes concentrations d'auxines associées à la BAP et à l'AG₃ donnent de bons résultats pour la culture de jeunes bourgeons [34], ainsi que pour le débourrement des bourgeons apicaux d'un arbre adulte [22].

Tableau 3 : Effet de différents types d'auxines (0,1 mg/l) combinées à la BAP (0,5 mg/l) sur l'élongation des pousses et la néoformation des tiges de Caroubier (WPM) après 30, 45 et 60 jours.

Auxine	Taille des pousses (mm)			Nombre de tige par pousse		
	30 j	45 j	60 j	30 j	45 j	60 j
0	12,4 ± 1,8 c	16,8 ± 2,5 c	17,3 ± 3,1 c	3,57 ± 1,66 b	4,24 ± 1,45 d	5,54 ± 1,74 c
ANA	16,9 ± 1,9 b	19,1 ± 3,3 b	21,5 ± 4,4 b	3,68 ± 1,11 b	5,77 ± 1,52 c	7,23 ± 2,51 b
AIA	19,4 ± 2,8 a	19,7 ± 2,4 b	19,9 ± 2,8 b	5,55 ± 1,82 a	7,42 ± 2,21 ab	8,40 ± 2,04 ab
AIB	18,1 ± 1,8 ab	21,9 ± 4,1 a	24,1 ± 3,5 a	6,00 ± 2,01 a	8,12 ± 2,06 a	9,07 ± 2,68 a
2,4-D	17,1 ± 2,5 b	18,5 ± 1,3 b	23,5 ± 4,1 a	3,56 ± 1,13 b	6,85 ± 1,74 b	7,15 ± 1,97 b

Tableau 4 : Effet des auxines (0,1 mg/l) combinées à la BAP (0,5 mg/l) sur la néoformation de feuilles et sur le développement des pousses de Caroubier (WPM) après 30, 45 et 60 jours.

Auxine	Nombre de feuilles par pousse			% de pousses peu développées (<5mm)		
	30 j	45 j	60 j	30 j	45 j	60 j
0	10,89 ± 1,97 bc	17,34 ± 2,64 c	21,79 ± 3,27 c	8,83 b	4,32 c	0 c
ANA	9,58 ± 2,36 c	17,58 ± 2,85 c	24,85 ± 3,76 b	21,72 a	17,06 a	15,19 a
AIA	14,75 ± 3,05 a	23,82 ± 3,44 ab	28,82 ± 2,94 a	10,64 b	8,33 b	6,82 b
AIB	15,83 ± 2,98 a	24,58 ± 3,46 a	29,27 ± 3,66 a	10,22 b	9,87 b	6,31 b
2,4-D	13,42 ± 2,76 ab	20,44 ± 2,52 b	25,63 ± 3,12 b	10,49 b	8,25 b	5,12 b

3.3. Multiplication et élongation des pousses

La multiplication et l'élongation des pousses dépendent nettement de la concentration de la BAP, en effet la croissance a surtout été favorisée par des concentrations de BAP comprises entre 0,3 et 1 mg/l, la taille des pousses était maximale avec des valeurs qui variaient entre 12,1 et 13,9 mm. L'augmentation de la concentration de la BAP avait un effet inhibiteur sur la croissance des pousses.

La néoformation de pousses augmentait avec l'accroissement de la concentration de BAP, mais à partir de 0,5 mg/l, les valeurs obtenues étaient voisines et formaient un même groupe statistique. Le développement des feuilles diminuait globalement avec l'augmentation de la concentration en BAP (Tableau 5).

Tableau 5 : Effet de différentes concentrations de la BAP sur la multiplication des pousses issues de la culture d'apex de Caroubier après culture sur milieu WPM durant 30 jours.

BAP (mg/l)	Taille des pousses (mm)	Nombre de pousses	Nombre de feuilles par pousse	% de pousses peu développées (<5mm)
0	10,5 ± 0,7 b	1,58 ± 0,35 d	5,84 ± 0,72 a	0
0,1	11,9 ± 0,9 b	2,92 ± 0,44 c	4,88 ± 0,73 b	0
0,3	13,9 ± 1,2 a	4,1 ± 0,84 b	3,65 ± 0,61 d	0
0,5	12,2 ± 1,4a b	5,44 ± 1,03 a	4,01 ± 0,50 c	0
1	12,1 ± 1,3 ab	5,71 ± 1,14 a	3,90 ± 0,51c	0
1,5	10,8 ± 0,8 b	5,18 ± 1,05 a	3,11 ± 0,54 e	0

Tableau 6 : Effet de différentes concentrations de BAP combinées à l'AIB (0,1 mg/l) sur la multiplication des pousses de Caroubier après culture sur milieu WPM durant 30 jours.

BAP (mg/l)	Taille des pousses (mm)	Nombre de pousses	Nombre de feuilles par pousse	% de pousses peu développées (< 5mm)
0	18,8 ± 1,3a	2,15 ± 0,29 c	2,90 ± 0,56 b	0 b
0,1	19,9 ± 1,9 a	3,18 ± 0,38 b	3,32 ± 0,51 a	0 b
0,3	14,2 ± 1,6 b	3,83 ± 0,42 b	3,36 ± 0,52 a	5,88 a
0,5	14,1 ± 1,5 b	4,94 ± 0,68 a	3,30 ± 0,44 a	5,88 a
1	13 ± 0,9 b	5,22 ± ,87 a	3,55 ± 0,45 a	7,12 a
1,5	11 ± 1,2 c	3,7 ± 0,51 b	3,01 ± 0,51 b	6,80 a

La combinaison de la BAP avec l'AIB influence surtout la croissance des tiges lorsque la concentration de la BAP était nulle ou faible. Les valeurs obtenues dans le premier cas étaient voisines de celles obtenues quand cette concentration était égale à 0,1 mg/l. L'augmentation de la concentration de BAP conduisait à la diminution de la taille des pousses. Alors que les valeurs obtenues pour l'organogenèse étaient proches de celles obtenues avec la BAP sans AIB (Tableau 6 et Figure 2).



Figure 2: Pousses d'un mois obtenues au cours de la phase de multiplication de caroubier dans différentes conditions, (a) WPM + BAP (0,5 mg/l) ; (b) : WPM + BAP (1 mg/l).

Ces résultats concordent avec ceux obtenus par d'autres chercheurs [17- 14] lors de la multiplication de pousses de caroubier. Ces auteurs ont montré que les concentrations moyennes de BAP (0,5 à 1 mg/l) étaient les plus favorables, alors que les concentrations supérieures à 1 mg/l entraînaient la formation de cals et l'apparition de la vitrification.

3.4. Enracinement direct et acclimatation des pousses

Les pousses issues de la culture d'apex s'enracinent spontanément en l'absence de phytohormones, le taux d'enracinement a atteint 68%. L'application d'auxines à faible concentration n'améliore pas le pourcentage d'enracinement (Tableau 7 et Figure 3a).

D'autres recherches ont déjà signalé la capacité de caroubier à s'enraciner sans auxines [32-16].

L'acclimatation des plantules enracinées obtenues directement après culture d'apex n'a pas posé de problèmes, et a été réussie dans 95 % des cas. Les 5 % de plantules qui n'arrivaient pas à se maintenir étaient souvent attaquées par des champignons (Figure 3, b et c).

Tableau 7 : Effet de différentes auxines (0,1 mg/l) sur l'enracinement des plantules de Caroubier après culture sur milieu MS/2 durant 30 jours.

Auxines	Taille des tiges (mm)	Nombre de tiges par pousse	Nombre de feuilles par pousse	% d'enracinement	Nombre de racines	Longueur des racines (mm)
0	12,9 ± 3,7	1	3,21 ± 0,85 a	68 a	2,92 ± 0,84	43,8 a
ANA	13,5 ± 4,3	1	3,4 ± 0,66 a	50 b	2,7 ± 0,78 b	9,3 c
AIA	12,6 ± 4,9	1	3,2 ± 0,93 a	65 a	2,25 ± 0,66	28,7 b
AIB	13,0 ± 5,6	1	3,24 ± 1,04 a	48 b	3,2 ± 0,90	42,0 a
2,4-D	8,7 ± 4,0 b	1	2,4 ± 0,99 b	20 c	3,75 ± 0,87a	8,0 c



Figure 3: Plantules obtenues par culture d'apex de caroubier, (a) enracinement sur milieu WPM sans phytohormones après un mois ; (b) acclimatation sur la tourbe après trois mois ; (c) acclimatation sur la tourbe après sept mois.

Conclusion

La culture du bourgeon apical issu d'une jeune plantule nous a offert une bonne possibilité de micropropagation du Caroubier dans différentes conditions, sans avoir été gêné par le problème de contamination, fréquent quand on travaillait sur des explants obtenus à partir de plantules germées sur la tourbe ou à partir d'un arbre adulte.

La comparaison de l'effet de différentes solutions de macroélément a montré que les milieux WPM et MS étaient les plus favorables à la culture *in vitro* du Caroubier. D'une part, ils favorisaient l'organogenèse, d'autre part, les pourcentages de nécrose foliaire et de vitrification y étaient faibles.

La combinaison de la BAP à 0,5 mg/l avec les auxines (0,1 mg/l) favorisait la néoformation de tiges et leur élongation. L'addition d'auxines conduisait à la formation d'un cal basal qui s'accompagnait de débourrement de plusieurs bourgeons adventifs et il en est résulté une augmentation du nombre de tiges et de feuilles.

Donc les auxines, notamment l'AIB et l'AIA, pourraient être additionnées à la BAP pour favoriser l'organogenèse chez le Caroubier.

La multiplication des tiges obtenue par culture d'apex se faisait sans aucun problème sur le milieu WPM en présence de BAP. La croissance des pousses et la néoformation de tiges et de feuilles étaient favorisées par les concentrations 0,5 et 1 mg/l de BAP.

La combinaison de l'AIB à faible concentration (0,1 mg/l) avec différentes concentrations de BAP n'améliorait pas le taux de multiplication des pousses. Cependant, elle favorisait leur croissance quand la concentration de BAP était faible, donc cette condition (BAP : 0,1 mg/l, AIB : 0,1 mg/l) pourrait être utilisée pour la préparation des pousses afin de lancer l'enracinement.

Contrairement aux pousses issues de la culture de bourgeons axillaires, qui nécessitaient des auxines pour s'enraciner, celles issues de la culture d'apex s'enracinaient mieux sans traitement auxinique préalable avec une taille maximale des racines. L'enracinement des pousses sans traitement auxinique pourrait être attribué à une synthèse d'AIA par les apex.

Remerciements - Ce travail de recherche a été réalisé dans le laboratoire de l'Équipe de Biotechnologie Végétale, Département de Biologie, Faculté des Sciences, Tétouan, Maroc ; sous la direction de monsieur Ahmed Lamarti. Il a été financé par le pôle de compétence microbiologie des sols et biotechnologie des plantes (MiSoBioP) dans le cadre d'un projet fédérateur intitulé : utilisation des biotechnologies pour la protection et l'amélioration de la production de plantes à intérêt socio-économique.

References

- 1- Fennane M., Ibn Tattou M., Matherz J., Ouyahya A., Eloualidi J., "Flore pratique du Maroc, Manuel de détermination des plantes vasculaires" (volume 2), Editions OKAD, Maroc (2007) 636 p.
- 2- Lo Gullo M., Salleo S., *New Phytol.* 108 (1988) 267.
- 3- Correia P. M., Martins-Loução M. A., *New York Botanical Gardens, Bronx.* (1994) 86.
- 4- Russo G., Polignano G. B., *Genetic Resources and Crop Evolution* 43 (1996) 525.
- 5- Tucker S. C. *Am. J. Bot.* 79 (1992) 318.
- 6- Dellaporta S. L., Calderon-Urrea A., *Plant. Cell.* 5 (1993) 1241.
- 7- Retana J., Ramoneda J., García del Pino F., Bosch J., *J. Hortic. Sci.* 69 (1994) 97.
- 8- Gharnit N., El Mtili N., Ennabili A., Sayah F., *Moroccan J. Biol.* (2004) 41.
- 9- Condit I.J., *Agr. Exp. Sta. Univ. California Press, Berkeley* 309 (1919) 431.
- 10- Battle, I., Tous, J., Carob tree. *Ceratonia siliqua* L. promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 17. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research. Gatersleben/International Plant Genetic Resources Institute, Rome (1997) 79p.
- 11- Rejeb M. N., *Ed. AUPELF-UREF. Paris : John Libbey Eurotext,* (1995) 79.
- 12- Ait Chitt M., Belmir, H., Lazrak, A., *In Bulletin mensuel d'information et de liaison du PNTTA MAPM/DERD.* 153 (2007) 1.
- 13- Thomas V., Mehta A. R. In Sen S.K., Giles K.L., Eds., *Proc. Int. Plant Cell Cult. Crop Improvement, Calcutta India. Plenum Press, New York, and London* (1983) 451.
- 14- Sebastian K.T., McComb J.A., *Scientia-Hort.* 28/1-2 (1986)127.
- 15- Alorda M., Medrano H. *In Actas del II Congreso Nacional de la Sociedad Española de Ciencias Hortícolas (SECH). Córdoba, Spain* (1986) 919.
- 16- Vinterhalter D., Vinterhalter B. *Arch. Biol. Sci, Belgrade* 44/3-4 (1992) 177.
- 17- Belaizi M., Bolen M. R., Boxus P., *Ed AUPELF-UREF. Paris : John Libbey Eurotext,* (1994)227.
- 18- Carimi F., Di Lorenzo R., Crescimanno F. G., *Scientia horticultrae* 70/1 (1997) 73.
- 19- Romano A., Barros S., Martins-Loução M.A., *Plant Cell, Tissue Organ Cult.*, 68/1 (2002) 35.
- 20- Canhoto J. M., Rama S. C., Cruz G. S., *Cell. Dev. Biol. Plant.* 42 (2006) 514.
- 21- Saïdi R., Lamarti A., Badoc A., *Bulletin – Société de Pharmacie de Bordeaux* 146 (2007) 113.
- 22- Naghmouchi S., Khouja M. L., Romero A., Boussaid M., *Acta Botanica Gallica: bulletin de la Société botanique de France* 159/3 (2012) 357.
- 23- Radi A., Echchgadda G., Ibijbijen J., Rochd M., *J. Food Agri. & Environ.* 11/1 (2013) 1103.
- 24- Murashige T., Skoog F. *Physiol. Plant.* 15 (1962) 473.
- 25- McCown B. H., Lloyd G., *HortScience*, 16/3 (1981) 453.
- 26- Durzan D.J., Chafe SC., Lopushanski SM. *Planta (Berl.)* 113 (1973) 241.
- 27- Schenk R. V., Hildebrandt A. C. *Can. J. Bot.* 50 (1972)199.
- 28- Gamborg O. L., *Can. J. Biochem.* 44 (1966) 791.
- 29- Heller R., *Ann. Sci. Nat., Bot. Biol. Vég.* 14 (1953) 1.
- 30- Chalupa V., *Commun. Inst. For. Cech.* 12 (1981) 255.
- 31- Gresshoff P. M., Doy C. H., *Planta* 107/2 (1972) 161.
- 32- Gharnit N., Ennabili A. *Biomatec Echo* 3/6 (2009) 18.
- 33- Barghchi M., Alderson P.G., *J. Hortic. Sci.* 60 (1985) 425.
- 34- Hakim L., Islam M. R., Mamun A. N. K., Ahmed G., Khan R., *Bangladesh J. Bot.* 39/1 (2010) 15.