



Micropropagation du Caroubier (*Ceratonia siliqua* L.) par culture de bourgeons cotylédonaire

Micropropagation of Carob tree (*Ceratonia siliqua* L.) by cotyledonary buds

R. Saïdi¹, B. El bouzdoudi², M. B. El Kbiach², A. Maouni¹, A. Badoc³, A. Lamarti²

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 (UAE), M'hannech II, BP 2121, 93002 Tétouan, Maroc.

³Axe MIB (Molécules d'Intérêt Biologique), Unité de Recherche CEnologie EA 4577, USC 1366 INRA, UFR des Sciences Pharmaceutiques, Université de Bordeaux, ISVV (Institut des Sciences de la Vigne et du Vin), 210 Chemin de Leysotte, CS 50008, 33882 Villenave-d'Ornon, France.

Received 18 Nov 2016, Revised 29 Dec 2016, Accepted 30 Dec 2016

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

Summary

In vitro micropropagation of Carob tree (*Ceratonia siliqua* L.) by cotyledonary buds taken from 13 day old seedlings was attempted on Woody Plant Medium (WPM) supplemented with microelements and Murashige and Skoog (MS) vitamins. Comparison of the effect of four cytokinines (benzylaminopurine, zeatin, kinetin and 2-iP) has shown that seedling growth was stimulated by zeatin at 1 mg/L, while organogenesis was better under BAP or zeatin at 1 mg/L. The effect of four auxins (AIA, AIB, ANA and 2,4-D) at low concentrations (0.1 mg/L) combined with BAP at 0.5 mg/L has shown that Naphthalene Acetic Acid (NAA) stimulates better stem formation and growth. Moreover, combination of Gibberellic Acid (GA₃) at different concentrations with BAP at 0.5 mg/L did not show a significant effect on growth. Shoot multiplication was stimulated by medium concentrations of BAP (0.5 - 1 mg/L) alone or with GA₃ at 0.2 mg/L. Among the auxins tested during rooting, Indol-3-Butyric Acid (IBA) (2 mg/L) was found to be the most efficient for root formation.

Key words: Carob tree, *Ceratonia siliqua* L., *Fabaceae*, micropropagation, cotyledonary buds.

Résumé

La micropropagation du Caroubier (*Ceratonia siliqua* L.) par culture de bourgeons cotylédonaire de plantules âgées de 13 jours a été étudiée sur le milieu WPM additionné de microéléments et de vitamines MS. La comparaison de l'effet de quatre cytokinines (BAP, zéatine, kinétine et 2-iP) a montré que la croissance des pousses est surtout stimulée par la zéatine (1 mg/l) ; alors que l'organogenèse se fait mieux en présence de la BAP ou de la zéatine (1 mg/l). L'effet de quatre auxines (AIA, AIB, ANA et 2,4-D) à faible concentration (0,1 mg/l) combinées à la BAP (0,5 mg/l) a été aussi testé, et a montré que l'ANA favorise la croissance des plantules et la néoformation de tiges. Toutefois, l'association de l'AG₃ à différentes concentrations avec la BAP (0,5 mg/l) n'a pas eu d'effet significatif sur la culture de ces explants. La multiplication des pousses a été favorisée par des concentrations moyennes de BAP (0,5 à 1 mg/l) seule ou associée avec l'AG₃ (0,2 mg/l). Parmi les auxines testées au cours de la phase d'enracinement, l'AIB (2 mg/l) s'est avéré la plus efficace pour la rhizogenèse.

Mots clés : Caroubier, *Ceratonia siliqua* L., *Fabaceae*, micropropagation, bourgeons cotylédonaire.

Abréviations :WPM : Woody Plant Medium, MS : Murashige et Skoog, AIA : Acide Indole 3-Acétique, AIB : Acide Indole 3-Butyrique, ANA : Acide 1-Naphtalène Acétique, 2,4-D : Acide 2,4-Dichlorophénoxyacétique, BAP : Benzylaminopurine, 2iP : N⁶-Δ²-isopenténylaminopurine, AG₃ :Acide Gibbérellique.

1. Introduction

Le Caroubier (*Ceratonia siliqua* L.) est une Fabacée Césalpinoïdée [1] thermophile des régions méditerranéennes à climat doux, mais aussi des zones tempérées chaudes et subtropicales [2]. Répandu à l'état naturel, il devient de plus en plus cultivé comme plante agricole et ornementale [3-4]. Au Maroc, il relève de l'étage bioclimatique aride à semi-aride, et se rencontre aussi dans le subhumide où il donne de beaux arbres dans les peuplements de chêne vert, ainsi que dans l'humide à variante chaude et tempérée [5-6]. Il est très sensible au froid, mais supporte bien la sécheresse [7]. Il peut s'adapter à différents types de sol bien qu'il préfère les terrains sablonneux bien drainés [8].

La floraison débute entre août et octobre, avec des fleurs unisexuées sur le vieux bois de pieds généralement dioïques ; la fructification donne lieu à des gousses indéhiscentes appelées caroubes [9-10-11]. Tous les composants de la caroube sont utilisés en nutrition et dans l'industrie agroalimentaire. La composition chimique de la pulpe semble varier en fonction des cultivars, de leur origine et du moment de la récolte [12-13-14-15-16-17-18]. Elle est très riche en hydrates de carbone d'où son utilisation comme ingrédient dans les gâteaux, les biscuits et les produits chocolatés ; elle est aussi riche en éléments minéraux (Fe, Ca, Na, K, P et S) et en composés phénoliques [19-20]. La graine est formée de trois parties, le tégument, l'albumen et l'embryon ou germe, dont les poids en matière sèche sont respectivement 30-33, 42-46 et 23-25 % [21]. L'albumen est utilisé pour l'extraction de la gomme, la production d'additifs alimentaires, la fabrication de produits cosmétiques et pharmaceutiques et en alimentation animale, alors que le tégument fournit des tanins utilisés en tannerie [2-7-22-23].

La surface totale de production de caroube dans le monde est estimée à 200 000 ha, dont 74 % soit 148 000 ha se trouvent dans les pays du sud de l'Union Européenne (Espagne, Portugal, Grèce et Italie) ; la production mondiale de caroube en 2013 était de 145389 T, les principaux producteurs étant l'Espagne (40000 T), le Portugal (23000 T), la Grèce (22000 T), le Maroc (20500 T) et la Turquie (14261 T) [24].

La propagation traditionnelle du caroubier se fait par semis, mais vu la dureté du tégument, une scarification par l'eau bouillante est appliquée pour écourter la période de germination [2-8]. Ce type de propagation présente deux inconvénients : d'une part, le sexe du futur arbre n'est pas connu pour rationaliser la plantation des pieds mâles et femelles au sein d'un verger, d'autre part les plantes issues de la reproduction sexuée sont sujettes à des variabilités génétiques pouvant être négatives. Le recours au greffage est l'une des pratiques utilisées pour choisir un sexe approprié ou sélectionner une variété productrice. Il peut être pratiqué sur des sujets coupés préalablement en têtards ou en taillis ou issus directement de graines [3-25-26]. La propagation traditionnelle du Caroubier peut être aussi obtenue par bouturage, mais ses potentialités d'enracinement sont faibles [27-28].

Actuellement, les efforts s'orientent vers la micropropagation pour la production d'une grande quantité de plantes vigoureuse de Caroubiers afin de satisfaire une demande croissante. La micropropagation par culture de bourgeons cotylédonaire n'a jamais été abordée chez le Caroubier, mais elle est pratiquée chez d'autres espèces telles *Eucalyptus camadulensis* [29] et *Acacia albida* [30]. Cette étude vise à maîtriser les procédés de régénération du Caroubier à partir d'un matériel végétal juvénile. Le choix d'un tel explant a été fait dans l'objectif de minimiser les contaminations qui sont fréquentes et gênantes quand on travaille sur un arbre adulte. Pour déterminer les meilleures conditions de micropropagation de cette espèce, nous avons testé trois types de régulateurs de croissance (auxines, cytokinine et gibbérellines) seule ou combinée à des concentrations variées.

2. Matériel et méthodes

2.1 Préparation des explants

Les graines proviennent d'un arbre femelle performant situé dans le Rif occidental marocain (province de Chefchaouen). Leur germination a été réalisée in vitro sur la gélose stérile (0,7 %) après désinfection et scarification par l'acide sulfurique 36 N pendant une heure, suivies de trois lavages de 10 min chacun à l'eau

distillée stérile. Après deux semaines, on enlève l'épicotyle et la majeure partie de l'hypocotyle des jeunes plantules, puis on décapite les deux tiers des feuilles cotylédonaire. Les explants sont alors cultivés dans des flacons de 200 ml contenant 50 ml de milieu de culture WPM [31] additionné des microéléments et vitamines de Murashige et Skoog [32], de 30 g/l de saccharose, 0,1 g/l de myo-inositol et 0,7 % d'agar ; le pH est ajusté à 5,8 avant l'autoclavage 20 min à 121°C. Après 21 jours en salle de culture (photopériode : 16 heures ; intensité lumineuse : 4000 lux ; température : 23 à 25°C le jour et 20°C la nuit), la taille des pousses et le nombre de tiges et de feuilles ont été reportés. Pour chaque condition, trois essais d'une trentaine d'échantillons (n = 30) ont été effectués. Les moyennes obtenues lors des trois essais ont été comparées par analyse de la variance (ANOVA) avec le test Duncan's Multiple Range (coefficient $\alpha = 0,05$). Les pousses sont considérées peu développées quand leur taille est inférieure à 5 mm et quand le nombre de feuilles est inférieur à 2.

2.2 Effets de différents types de régulateurs de croissance

Afin de sélectionner la cytokinine la plus adéquate au développement des explants, la BAP, la zéatine, la kinétine et la 2-iP ont été étudiées à 0,5 et 1 mg/l. Dans un deuxième temps, la cytokinine la plus favorable (BAP 0,5 mg/l) a été combinée à quatre auxines (AIA, AIB, ANA et 2,4-D) à faible concentration (0,1 mg/l) et à différentes concentrations d'acide gibbérellique (0,1 ; 0,2 ; 0,5 ; 1 mg/l).

2.3 Effet de la taille des feuilles cotylédonaire

Pour voir si la longueur des feuilles cotylédonaire influence le développement des explants, des bourgeons avec des feuilles cotylédonaire décapitées des deux tiers ou intactes ont été cultivés en présence d'AIB à 0,1 mg/l avec trois concentrations de BAP testées : 0,5 ; 1 et 1,5 mg/l.

2.4 Multiplication des pousses issues de bourgeons cotylédonaire

Les pousses obtenues par débourrement de bourgeons cotylédonaire ont été repiquées sur le même milieu de base (WPM), en présence de BAP seule (0,1 ; 0,3 ; 0,5 ; 1 ; 1,5 mg/l) ou combinée à 0,5 mg/l avec différentes concentrations d'AG₃ (0,1 ; 0,2 ; 0,3 ; 0,5 ; 1 mg/l).

2.5 Elongation des pousses

Parallèlement à la multiplication, un suivi de la croissance des pousses durant quatre semaines a été effectué en présence de trois concentrations de BAP (0,3 ; 0,5 et 1 mg/l) et trois concentrations d'AG₃ (0,1 ; 0,3 ; 0,5 mg/l), associées à 0,5 mg/l de BAP.

2.6 Enracinement des pousses et acclimatation des plantules

L'enracinement des pousses a été abordé en présence de quatre auxines (AIB, AIA, ANA et 2,4-D) par deux méthodes. La première consiste à cultiver les pousses sur le milieu MS dilué de moitié additionné d'auxines à 2mg/l à l'obscurité durant une semaine, suivi d'un transfert en salle de culture sur le même milieu de base mais sans phytohormones. Dans la deuxième méthode, les tiges ont été trempées dans la solution auxinique (2mg/l) durant trois minutes et cultivées sur le milieu MS dilué de moitié et dépourvu de phytohormones. Après une semaine à l'obscurité, les cultures ont été transférées en condition photopériodique. Dans les deux cas, la lecture des résultats a été faite après un mois.

Après trente jours, les plantules vigoureusement enracinées ont été transférées dans des pots contenant de la tourbe et une solution de Benlate à 1 % a été pulvérisée. Des sachets plastiques transparents recouvrant chaque plantule permettent d'assurer un taux d'humidité élevé. Les plantules 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 des régulateurs de croissance

3.1.1 Effet des cytokinines

La croissance des pousses est maximale en présence de la zéatine (1 mg/l) suivie de la 2-iP, alors qu'elle est minimale avec la kinétine et la BAP. Toutefois, la néoformation de tiges et de feuilles est surtout stimulée par la

BAP (1 mg/l) et la zéatine, contrairement à la kinétine et à la 2-iP moins efficaces sur l'organogénèse. Le nombre de feuilles est maximal avec la BAP, mais avec un pourcentage non négligeable de pousses peu développées (Tableau 1 ; Figure 1).

Tableau 1 : Effet des cytokinines sur le développement des bourgeons cotylédonaire de Caroubier après trois semaines de culture sur milieu WPM.

Cytokinines (mg/l)		Taille des pousses (mm)	Nombre de tiges par pousse	Nombre de feuilles par pousse	% de pousses peu développées < 5 mm
Kinétine	0,5	9,2±1,0 ^c	1,33±0,2 ^c	3,33±0,3 ^c	14,67 ^a
	1	10,3±1,1 ^{bc}	1,70±0,2 ^c	4,50±0,4 ^d	0 ^b
2-iP	0,5	11,7±1,2 ^{ab}	1,83±0,2 ^c	5,67±0,5 ^c	0 ^b
	1	8,9±0,9 ^c	1,57±0,2 ^c	4,20±0,3 ^{de}	14,28 ^a
Zéatine	0,5	11,6±1,1 ^{ab}	2,43±0,2 ^b	6,11±0,5 ^c	14,08 ^a
	1	12,7±1,2 ^a	3,67±0,3 ^a	8,00±1,0 ^b	16,67 ^a
BAP	0,5	9,6±1,0 ^c	2,66±0,2 ^b	7,75±1,1 ^b	16,66 ^a
	1	10,7±1,1 ^{bc}	3,50±0,3 ^a	10,89±1,1 ^a	16,70 ^a

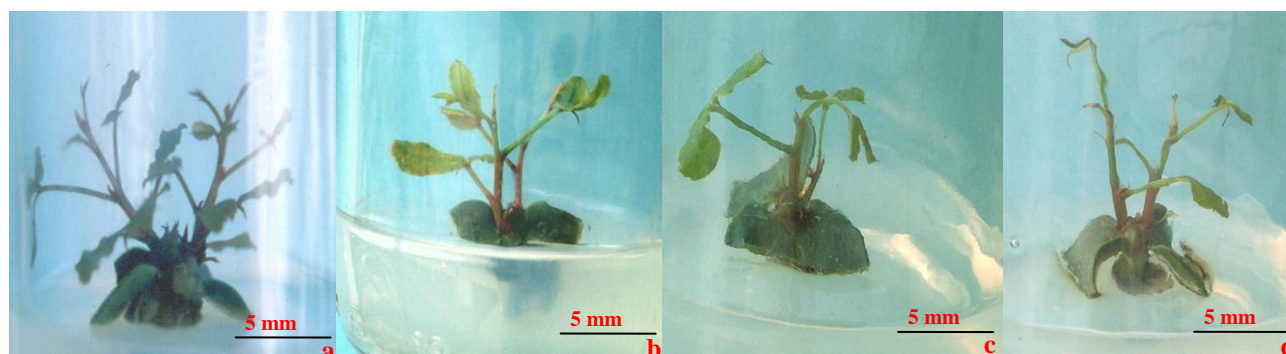


Figure 1 : Pousses de 21 jours obtenues après culture sur milieu WPM en présence de différentes cytokinines (1 mg/l), (a) : BAP ; (b) : Kinétine ; (c) : 2-iP ; (d) : Zéatine.

D'autres chercheurs ont aussi montré lors de la culture de bourgeons axillaires de Caroubier que parmi les cytokinines, la BAP est la plus favorable pour la néoformation de tiges et pour leur élévation, et la kinétine et la 2-iP les plus défavorables [33-34]. L'efficacité de la BAP et de la zéatine sur le développement des explants de caroubier issus de jeunes germinations a été aussi prouvée, mais à une concentration plus élevée (2 mg/l) [35].

3.1.2 Effet des auxines combinées à la BAP

La combinaison de la BAP à différentes auxines a montré que l'ANA favorise le mieux la croissance des plantules et la néoformation de tiges et de feuilles. L'AIB et l'AIA se placent en deuxième position avec des valeurs voisines, souvent sans différences significatives, et le 2,4-D arrive en dernier. Cependant, le pourcentage de plantes peu développées ou non développées est relativement élevé en présence d'ANA, d'AIA et de 2,4-D, ce qui n'est pas le cas en présence d'AIB (Tableau 2). De plus, en présence d'ANA, la nécrose foliaire est fréquente. Ces résultats concordent avec [36] où la BAP (0,5 mg/l) est associée avec l'AIA et l'AIB à faible concentration (0,1 mg/l). Dans d'autres travaux [35-37], la combinaison de la BAP (0,5 mg/l) à différentes concentrations d'auxines (AIA, AIB et ANA) a montré aussi que l'association AIB-BAP était la plus adéquate.

Tableau 2 : Effet de quatre auxines (0,1 mg/l) combinées à la BAP (0,5 mg/l) sur le développement des bourgeons cotylédonaire de Caroubier après 21 jours de culture sur milieu WPM.

Auxines	Taille des pousses (mm)	Nombre de tiges par pousses	Nombre de feuilles par pousse	% de pousses peu développées < 5 mm	% d'explants non développés
0	10,2±1,0 ^b	2,66±0,4 ^c	7,75±1,0 ^c	16,43 ^b	2,69 ^d
AIB	10,6±1,1 ^b	3,42±0,4 ^b	10,42±1,1 ^b	15,38 ^b	1,14 ^d
ANA	13,0±1,2 ^a	4,35±0,4 ^a	12,30±1,2 ^a	25,45 ^a	23,08 ^b
AIA	10,5±1,2 ^b	3,19±0,4 ^b	9,48±1,1 ^{bc}	24,21 ^a	12,5 ^c
2,4-D	10,8±1,2 ^b	2,82±0,2 ^c	8,27±1,1 ^c	27,52 ^a	56 ^a

3.1.3 Effet de l'AG₃ combiné à la BAP

Contrairement aux auxines, la combinaison de différentes concentrations d'AG₃ à la BAP (0,5 mg/l) n'a pas amélioré l'organogenèse des plantules. Les résultats obtenus sont globalement voisins de ceux du témoin, et parfois même inférieurs, notamment pour la néoformation des feuilles. De plus, le pourcentage de pousses peu développées augmente avec la concentration d'AG₃ (Tableau 3).

Tableau 3 : Effet de l'AG₃ combinée à la BAP (0,5 mg/l) sur le développement des bourgeons cotylédonaire de Caroubier après 21 jours de culture sur milieu WPM.

AG ₃ (mg/l)	Taille des pousses (mm)	Nombre de tiges par pousse	Nombre de feuilles par pousse	% de pousses peu développées
0	9,8±1,1 ^a	2,70±0,4 ^a	7,68±1,0 ^a	13,70 ^c
0,1	8,1±0,8 ^{ab}	2,56±0,3 ^a	6,47±1,1 ^b	15,79 ^b
0,2	7,1±0,7 ^b	2,47±0,3 ^a	5,48±1,2 ^c	34,78 ^a
0,5	9,1±1,1 ^a	2,86±0,2 ^a	7,00±1,1 ^{ab}	27,27 ^a
1	8,7±1,1 ^a	2,55±0,2 ^a	6,76±1,2 ^b	35,83 ^a

Dans d'autres travaux [38-39], la combinaison de la BAP (0,5 mg/l) avec l'AG₃ (0,3 et 1 mg/l) a cependant nettement amélioré l'organogenèse et le maintien des pousses.

3.2. Effet de la longueur des feuilles cotylédonaire

La longueur des feuilles cotylédonaire influence surtout la croissance des pousses. En effet, la taille des tiges lorsque les cotylédons sont intacts est supérieure, quelle que soit la concentration de BAP. La néoformation de tiges et de feuilles est moins influencée par l'état des feuilles. Les valeurs obtenues se rapprochent souvent et forment un même groupe statistique pour différentes concentrations de BAP étudiées (Tableau 4, Figure 2). Mais lorsque les feuilles cotylédonaire sont intacts, elles s'incurvent parfois et finissent par soulever l'explant qui perd son contact avec le milieu.

3.3. Multiplication des pousses issues de la culture de bourgeons cotylédonaire

3.3.1 Effet de la BAP

La croissance des tiges est favorisée par des concentrations moyennes de BAP (0,3 et 0,5 mg/l); au-delà de 0,5 mg/l, la BAP inhibe l'accroissement. La néoformation de tiges est meilleure à 0,5 et 1 mg/l, qui donnent des valeurs maximales sans différence significative, alors que le nombre de feuilles par pousse est maximal à 0,1 mg/l (Tableau 5, Figure 4a). A 1,5 mg de BAP, le pourcentage des plantes peu développées atteint 18 % et les tiges sont peu nombreuses et deviennent violettes, avec apparition de lenticelles.

Tableau 4 : Effet des feuilles cotylédonaires décapitées (**FD**) ou complètes (**FC**) sur le développement des bourgeons de Caroubier après 21 jours de culture (WPM: BAP + AIB (0,1 mg/l)).

BAP (mg/l)	Etat des feuilles	Taille des pousses (mm)	Nombre de pousses	Nombre de feuilles par pousse	% pousses peu développées
0,5	FD	10,6±1,0 ^c	3,42±0,3 ^a	10,42±1,1 ^a	15,38 ^{ab}
	FC	13,0±1,3 ^a	3,11±0,3 ^a	9,23±1,1 ^{ab}	17,86 ^{ab}
1	FD	11,0±1,1 ^{bc}	2,29±0,3 ^b	7,71±1,1 ^b	12,34 ^a
	FC	14,0±1,3 ^a	3,48±0,4 ^a	10,03±1,2 ^a	8,69 ^b
1,5	FD	10,3±1,0 ^c	2,56±0,3 ^b	9,22±1,1 ^{ab}	21,74 ^a
	FC	12,7±1,2 ^{ab}	2,62±0,3 ^b	8,05±1,1 ^b	23,81 ^a

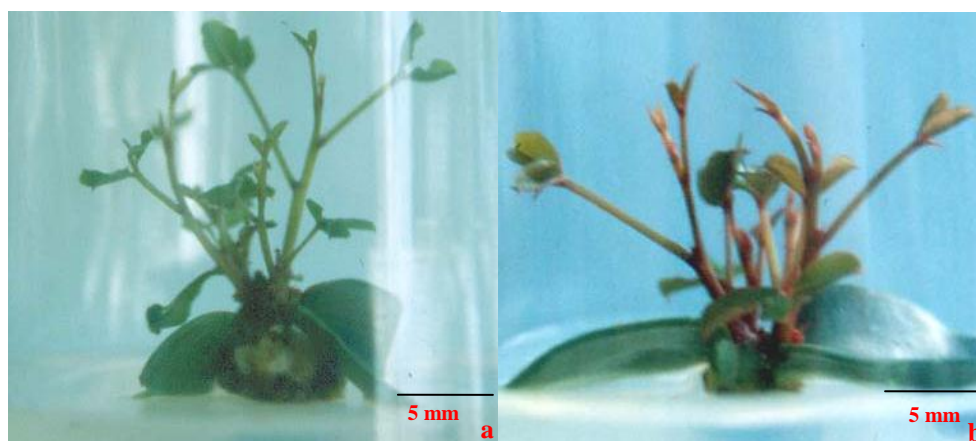


Figure 2 : Pousses de 21 jours obtenues après culture sur le milieu WPM additionné d'AIB (0,1 mg/l) en présence de 0,5 mg/l de BAP, (a) : cotylédons décapités ; (b) : cotylédons entiers.

Tableau 5 : Effet de la BAP sur la multiplication des pousses issues de la culture des bourgeons cotylédonaires de Caroubier après un mois de culture sur milieu WPM.

BAP (mg/l)	Taille des pousses (mm)	Nombre de pousses	Nombre de feuilles par pousse	% de pousses peu développées
0	9,8±1,0 ^c	1,00±0,0 ^c	4,19±0,5 ^b	15,82 ^{ab}
0,1	10,3±1,0 ^c	1,00±0,0 ^c	4,66±0,5 ^a	10,12 ^{bc}
0,3	15,1±1,2 ^a	3,44±0,3 ^b	3,01±0,4 ^d	5,37 ^c
0,5	13,8±1,1 ^{ab}	4,52±0,3 ^a	3,66±0,3 ^c	13,35 ^{ab}
1	12,2±1,1 ^{bc}	4,37±0,4 ^a	4,04±0,4 ^b	11,54 ^b
1,5	11,3±1,0 ^c	3,38±0,3 ^b	4,09±0,4 ^b	18,30 ^a

Ces résultats concordent en partie avec ceux obtenus par d'autres chercheurs lors de la phase de multiplication des explants de Caroubier : ils ont montré, au cours de l'étude de différentes concentrations de BAP, que le taux de multiplication est maximal à 0,5 mg/l [34-40-41-42].

3.3.2 Effet de l'AG₃ combiné avec la BAP

La combinaison de l'AG₃ avec la BAP n'a pas amélioré significativement l'élongation des pousses. Leur taille reste voisine de celle du témoin, avec des valeurs qui forment un même groupe statistique quelle que soit la concentration d'AG₃. L'augmentation de la concentration d'AG₃ s'accompagne d'une diminution du nombre de pousses (Tableau 6).

Tableau 6 : Effet de l'AG₃ combiné à la BAP (0,5 mg/l) sur la multiplication des pousses issues de la culture de bourgeons cotylédonaire de Caroubier après un mois de culture sur milieu WPM.

AG ₃ (mg/l)	Taille des pousses (mm)	Nombre de pousses	Nombre de feuilles par pousse	% de pousses peu développées
0	13,4±1,1 ^a	4,33±0,4 ^{ab}	3,65±0,3 ^a	14,28 ^a
0,1	13,2±1,2 ^a	4,91±0,5 ^a	3,45±0,3 ^a	17,39 ^a
0,2	13,4±1,3 ^a	5,04±0,5 ^a	3,48±0,3 ^a	13,04 ^a
0,3	13,7±1,3 ^a	4,36±0,4 ^{ab}	3,32±0,3 ^a	4,54 ^c
0,5	14,4±1,4 ^a	3,59±0,4 ^b	3,36±0,3 ^a	7,40 ^{bc}
1	13,1±1,1 ^a	3,12±0,4 ^b	3,74±0,4 ^a	12,53 ^{ab}

Une diminution du nombre de pousses à forte concentration d'AG₃ a été signalée lors de la multiplication de pousses issues de bourgeons axillaires de Caroubier [34], alors que d'autres chercheurs [38-39] ont signalé que la combinaison de BAP (0,5 mg/l) et d'AG₃ (1 mg/l) favorise l'organogenèse.

3.4 Elongation des pousses

3.4.1 Effet de la BAP

L'élongation des pousses au cours de la phase de multiplication se fait mieux en présence de faibles concentrations de BAP. La taille des tiges est maximale à 0,3 mg/l, puis diminue et devient minimale à 1 mg/l. La croissance des pousses est accélérée entre la deuxième et la troisième semaine, et se traduit par une forte pente qui tend à s'amortir après cette période (Figure 3a).

3.4.2 Effet de la BAP combinée à l'AG₃

La combinaison de l'AG₃ avec la BAP n'a pas un grand effet sur l'élongation des pousses. Les tailles obtenues sont souvent voisines de celles enregistrées avec la BAP seule. La taille des tiges est maximale pour 0,5 mg/l d'AG₃. Comme précédemment, la croissance des tiges est maximale entre la deuxième et la troisième semaine (Figure 3b).

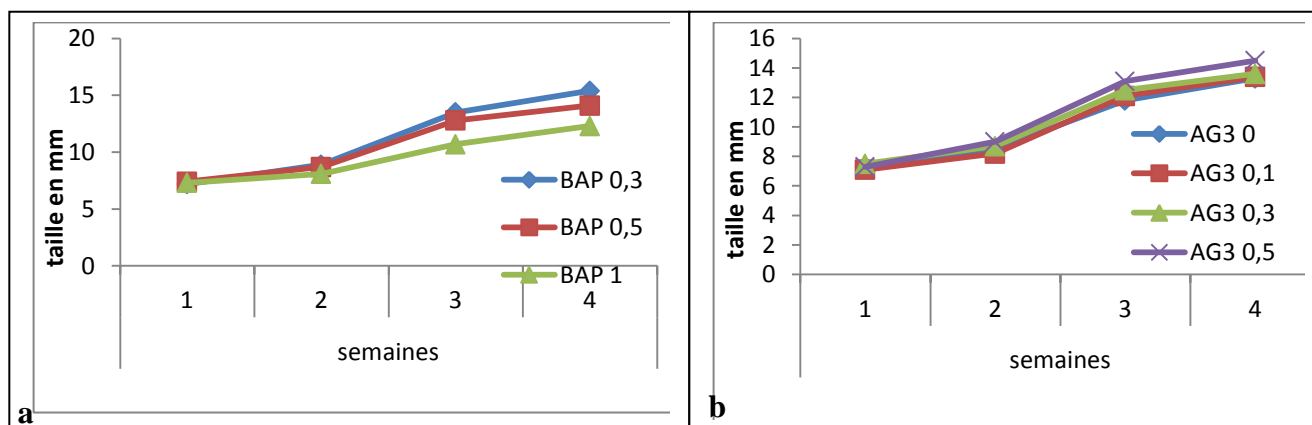


Figure 3 : Elongation hebdomadaire des pousses de Caroubier au cours de la phase de multiplication, (a) : Effet de la BAP (mg/l) ; (b) : Effet de l'AG₃ (mg/l) combiné à la BAP (0,5 mg/l).

3.5 Enracinement des pousses et acclimatation des plantules

3.5.1 Enracinement

L'induction de l'enracinement sur milieu auxinique solide a montré que l'AIB est plus favorable. En effet, le pourcentage d'enracinement atteint 90 %, avec un nombre maximal de racines relativement longues. L'AIA se place en deuxième position avec un pourcentage d'enracinement de l'ordre de 55 %, alors que le 2-4 D est le plus défavorable (Tableau 7 ; Figure 4b).

L'induction de l'enracinement par trempage dans une solution auxinique, confirme les résultats obtenus par la première méthode et montre que l'AIB est l'auxine la plus favorable, suivie de l'AIA, l'ANA et enfin le 2,4-D. Toutefois les valeurs enregistrées sont inférieures à celles observées sur milieu auxinique solide (Tableau 7). L'efficacité de l'AIB sur l'enracinement des pousses du Caroubier a été prouvée dans plusieurs travaux sur le Caroubier [33-34-35-40-43]. Certains chercheurs [38] ont travaillé sur le milieu de Quoirin et Lepoivre dépourvu de NH_4NO_3 et ont obtenu des résultats similaires. Toutefois, [44] a obtenu un enracinement maximal en présence d'ANA à 4 mg/l.

Tableau 7 : Effet des auxines (2 mg/l, MS/2) sur l'enracinement des pousses de Caroubier (induction durant une semaine sur milieu solide à l'obscurité et trempage dans une solution auxinique durant 3 min et séjour durant une semaine sur milieu solide à l'obscurité).

Auxines	Taille des pousses (mm)	Nombre de tiges par pousse	Nombre de feuilles par pousse	% d'enracinement	Nombre de racines par plantule	Longueur des racines (mm)
Induction durant une semaine sur milieu solide à l'obscurité						
AIB	15,6±1,2 ^a	1,12±0,1 ^{ab}	5,64±0,3 ^a	90,47 ^a	4,05±0,5 ^a	33,7±3,2 ^a
AIA	14,3±1,1 ^{ab}	1,20±0,1 ^a	4,38±0,3 ^{bc}	55,53 ^b	2,20±0,2 ^b	13,5±1,4 ^b
ANA	13,1±1,0 ^b	1,00±0,0 ^b	4,91±0,3 ^{ab}	36,50 ^c	1,50±0,2 ^b	30,6±2,6 ^a
2,4-D	12,8±1,1 ^b	1,00±0,0 ^b	3,54±0,3 ^c	28,32 ^c	1,33±0,1 ^b	11,6±1,1 ^b
Trempage dans une solution auxinique durant 3 min et séjour durant une semaine sur milieu solide à l'obscurité						
AIB	14,7±1,3 ^a	1,00±0,0 ^a	4,82±0,3 ^a	75,50 ^a	3,16±0,3 ^a	40,3±0,4 ^a
AIA	12,2±1,1 ^b	1,00±0,0 ^a	4,89±0,3 ^a	49,18 ^b	1,16±0,1 ^c	20,5±2,1 ^c
ANA	14,2±1,2 ^a	1,00±0,0 ^a	4,10±0,3 ^{ab}	40,1b ^c	1,72±0,1 ^b	32,6±2,9 ^b
2-4D	11,7±1,1 ^b	1,00±0,0 ^a	2,92±0,2 ^b	32,24 ^c	1,48±0,2 ^{bc}	13,6±1,2 ^d

3.5.2 Acclimatation des plantules

L'acclimatation des plantules après la phase de multiplication est souvent délicate. Les tiges enracinées sont souvent de petite taille. Un recouvrement de longue durée par des sachets en plastique est indispensable pour améliorer le pourcentage de survie des plantules. Il passe de 30 à 65 % si le recouvrement est de 3 mois au lieu de 2 (Figure 4c).

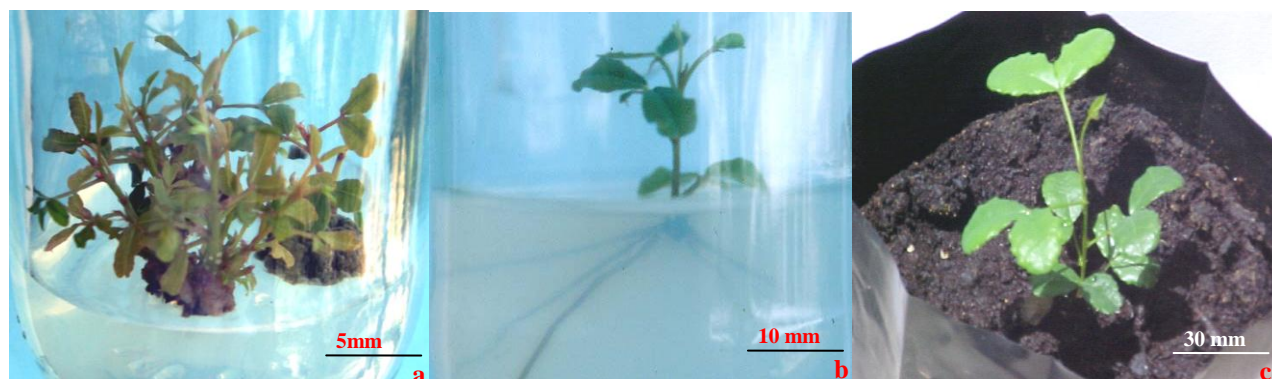


Figure 4 : Multiplication des pousses, enracinement et acclimatation des plantules de caroubier, (a) pousse âgée d'un mois (BAP : 0,5 mg/l, WPM) ; (b) plantule âgée d'un mois (AIB : 2 mg/l, MS/2 solide) ; (c) plantule âgée de trois mois (acclimatation sur la tourbe).

Conclusions

La micropropagation du Caroubier par débourement de bourgeons cotylédonaire est une bonne technique pour l'obtention de plusieurs pousses par explant de taille voisine et facile à multiplier. Cette méthode de multiplication végétative est appliquée pour la première fois chez le Caroubier. L'étude de l'effet de différents types de cytokinines a montré que le débourement de bourgeons cotylédonaire est favorisé par la BAP qui permet une néoformation maximale de tiges et de feuilles, alors que l'élongation des pousses est surtout favorisée par la zéatine.

La combinaison de la BAP avec certaines auxines (ANA et AIB) à faible concentration (0,1 mg/l) paraît améliorer l'organogenèse chez ces explants. Toutefois, en présence d'ANA, la callogenèse est plus importante et le pourcentage de plantes peu développées relativement élevé. La combinaison BAP-AIB est donc la plus adéquate pour améliorer le taux de multiplication des explants. L'association de l'AG₃ avec la BAP n'a d'effet positif ni sur la multiplication des pousses ni sur leur élongation.

La longueur des feuilles cotylédonaire a surtout un impact sur la croissance des bourgeons débourents. La taille des pousses est maximale lorsque ces feuilles sont intactes mais pour des raisons pratiques, il est préférable qu'elles soient décapitées, pour éviter la perte de contact entre l'explant et le milieu de culture, après soulèvement de l'explant suite à l'incurvation des feuilles cotylédonaire.

La multiplication des pousses obtenues par débourement de bourgeons cotylédonaire et leur élongation se font mieux en présence de concentrations moyennes de BAP, et l'addition d'AG₃ avec la BAP n'a pas un grand effet sur l'organogenèse. Mais à plus de 0,5 mg/l de BAP, on observe certains désordres physiologiques tels que l'augmentation du taux de nécrose foliaire, l'apparition de lenticelles le long des tiges et la callogenèse devient plus importante, ce qui gêne le maintien des pousses.

L'AIB est l'auxine la plus adaptée pour l'enracinement des plantules du Caroubier, de préférence sur un milieu solide et non par trempage dans une solution auxinique.

Remerciements

Ce travail de recherche a été financé par deux pôles de compétence (MiSoBioP et RéPAM) et par l'Académie Hassan II des Sciences et Technique dans le cadre d'un projet intitulé : Etude de la variabilité génomique du Chêne-liège (*Quercus suber* L.) et multiplication clonale par embryogenèse somatique.

Références

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. 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) 79 p.
3. Battle I., Tous, J. Cultivares autóctonos de algarrobo (*Ceratoniasiliqua* L.) en Cataluña. *Investig. Agrar. Prod. Prot. Veg.*, 5/2 (1990), 223.
4. Ait Chitt M., Belmir H., Lazrak A. *In Bulletin mensuel d'information et de liaison du PNTTA MAPM/DERD*. 153 (2007) 1.
5. Boudy P. Guide du forestier en Afrique du Nord. Ed. la Maison rustique (1952) 505 p.
6. M'hirit O., Et-Tobi M. Evaluation des arbres hors forêts au Maroc. Une contribution au rapport sur l'évaluation des ressources forestières 2000. Division des ressources forestières. Service de la conservation, de la recherche et de l'enseignement forestier, FAO, Rome (2000) 29 p. + annexes.
7. Evreinoff V.A. *Rev. Int. Bot. Appl. Agric. Trop.*, 27 (1947) 389.
8. Ouchkif M. Append number 8 of Project Oued Srou. (Maroc – GTZ Germany), DPA of Khenifra (unpublished) (1988).
9. Linskens H.F., Scholten, W. *Portug. Acta Biol. (A)*, 16/1-4 (1980) 95.
10. Gharnit N., El Mtili N., Ennabili A., Sayah F. *Moroccan J. Biol.*, (2004) 41.
11. Tucker S.C. *Am. J. Bot.*, 79/3 (1992) 318.

12. Orphanos P.I., Papaconstantinou J. The carob varieties of Cyprus. Volume 5 Technic. Bull., Cyprus Agricultural Research Institute, Ministry of Agriculture and Natural Resources (1969) 27 p.
13. Davies W.L.N., Orphanos P.I., Papaconstantinou J. *J. Sci. Food Agric.*, 22/2 (1971) 83.
14. Vardar Y., Seçmen Ö., Ahmed M. *Qual. Plant. Mater. Veg.*, 21/4 (1972) 367.
15. Calixto F.S., Cañellas J. *J. Sci. Food Agric.*, 33/12 (1982) 1319.
16. Albanell E., Caja G., Plaixats J. CIHEAM, *Options Médit., Sér.A, Sémin. Médit.*, 16 (1991) 135.
17. Haddarah A., Ismail A., Bassal A., Hamieh T., Ioannou I., Ghoul M. *Eur. Sci. J.*, 9/8 (2013) 353.
18. Hasib A., El Batal H. *Int. J. Emerging Technol. Adv. Engin.*, 4/3 (2014) 855.
19. Youssef M.K.E., El-Manfaloty M.M., Ali H.M. *Food Public Health*, 3/6 (2013) 304.
20. Khlifia M., Bahloul A., Kitane S. *J. Mater. Environ. Sci.*, 4/3 (2013) 348.
21. Neukom H. Proc. II Int. Carob Symp. (P. Fito and A. Mulet, Eds.), Valencia, Spain (1988) 551.
22. Rejeb M.N. *Ed. AUPELF-UREF. Paris: John Libbey Eurotext*, (1995) 79.
23. El Batal H., Hasib A., Ouatmane A., Boulli A., Dehbi F., Jaouad A. *J. Mater. Environ. Sci.*, 4/2 (2013) 309.
24. FAOSTAT 2013
25. Brito de Carvalho J.H., Graça J. M. Proc. II Int. Carob Symp. (P. Fito and A. Mulet, Eds.) Valencia, Spain, (1988) 225.
26. Aafi A. Le caroubier : Caractères botaniques, groupement végétaux, techniques d'élevage en pépinière, traitement et soins culturaux, utilisation et production. Centre National de la Recherche Forestière, Rabat, Maroc (1996) 7 p.
27. Lee C.L., Paul J.L., Hackett W.P. *HortScience*, 12/1 (1977) 41.
28. Hartmann H.T., Kester D.E. Plant Propagation. Principles and Practices. 4th edition. Prentice Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey (1983).
29. Diallo N., Duhoux E. *Plant Physiol.*, 115/3 (1984) 177.
30. Duhoux E., Davies D. *Plant Physiol.*, 121/2 (1985) 175.
31. McCown B.H., Lloyd G. *HortScience*, 16/3 (1981) 453.
32. Murashige T., Skoog F. *Physiol. Plant.*, 15 (1962) 473.
33. Romano A., Barros S., Martins-Loução M.A. *Plant Cell, Tissue Organ Cult.*, 68/1 (2002) 35.
34. Saïdi R., Lamarti A., Badoc A. *Bull. Soc.Pharm.Bordeaux*, 146/1-2 (2007) 113.
35. Radi A., Echchgadda G., Ibijbijen J., Rochd M. *J. Food Agric. Environ.*, 11/1 (2013) 1103.
36. 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.
37. El-Shafey Y.H., Elshihy O.M., Youssef E.M., Gad M.M. *Arab J. Biotechnol.*, 1/1 (1998) 77.
38. Belaizi M., Bolen M.R., Boxus P. *Ed. AUPELF-UREF. Paris: John Libbey Eurotext* (1994)227.
39. Hakim L., Islam M.R., Mamun A.N.K., Ahmed G., Khan R. *Bangladesh J. Bot.*, 39/1 (2010) 15.
40. Vinterhalter D., Vinterhalter B. *Arch. Biol. Sci., Belgrade*, 44/3-4 (1992) 177.
41. El Deen E.M.Z., El-Sayed O.M., El-Sayed A.E.R.I., Hegazi G.A.E.M. *J. Agric. Vet. Sci.*, 7/5 (2014) 31.
42. Saïdi R., El Bouzdoudi B., Kbiach M.B., Lamarti A., Maouni A. *J. Mater. Environ. Sci.*, 6/8 (2015) 2330.
43. Naghmouchi S., Khouja M.L., Rejeb M.N., Boussaid M. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 12/3 (2008) 258.
44. Naghmouchi S., Khouja M.L., Romero A., Boussaid M. *ActaBot.Gallica*, 159/3 (2012) 357.