

# Effet du 2,4-D sur l'induction de l'embryogenèse somatique à partir de cotylédons matures de caroubier (*Ceratonia siliqua* L.)

A. LOZZI<sup>1</sup>, A. ABOUSALIM<sup>1</sup>, R. ABDELWAHD<sup>2</sup>

(Reçu le 12/10/2015; Accepté le 30/11/2015)

## Résumé

La présente étude est le premier rapport sur la production de cals et de structures embryogènes à partir de cotylédons matures de *Ceratonia siliqua*. La régénération est fonction du matériel végétal utilisé et de la concentration de l'auxine. Dans le cas des cotylédons matures, la présence de l'acide 2,4 - dichlorophénoxyacétique a été nécessaire pour l'induction de la callogenèse. Cette auxine a favorisé une initiation rapide d'un cal embryogène très prolifère dans le cas de tous les explants et de toutes les concentrations testées. Le transfert des cals au milieu dépourvu d'auxine a abouti au développement d'un nombre élevé de structures embryonnaires globulaires (SEG), avec un maximum de 126 SEG/g de cals dans le cas d'initiation en présence de 10 µM de 2,4-D. Des niveaux plus élevés de 2,4-D ont été accompagnés d'une hyperhydricité des SEG. Les autres types d'explants testés (graines immatures, feuilles et portions d'épicotyles, d'hypocotyles et de racines) n'ont pas produit de structures embryonnaires.

**Mots-clés:** Caroubier, *Ceratonia siliqua* L., embryogenèse somatique, 2,4-D, cotylédons matures, Fabaceae.

## Abstract

The present study is the first report of the production of embryogenic callus and structures cultures from mature cotyledons of *Ceratonia siliqua*. Regeneration depends on the plant material type and concentration of the auxin. In the case of mature cotyledons, the presence of 2,4 - dichlorophenoxyacetic acid was necessary for callus induction. This auxin promoted a rapid proliferated callus initiation with nodular structure in all explants and concentrations tested. Upon transfer to auxin free medium, the callus formed a large number of globular embryonic structures (SEG). The highest number of SEG (126/g of callus) was produced with 10 µM of 2,4-D. Higher concentrations were accompanied by hyperhydricity of SEG. No embryonic structures occurred from the others types of explants (immature seeds, leaves and portions of epicotyls, hypocotyls and roots).

## INTRODUCTION

Le caroubier (*Ceratonia siliqua* L.) est une espèce xérophYTE typiquement méditerranéenne, largement répartie au Maroc.

Le Maroc occupe la deuxième place à l'échelle mondiale en termes de production des graines, totalisant 4 360 à 4 800 tonnes par an, soit 15% de la production mondiale (Ouchkif, 1988; Battle et al., 1997) et la première place mondiale en matière de rendement en graines qui est estimé de 17,4 à 29,4% (El Batal et al., 2013). Il est également le deuxième pays exportateurs de caroubes ayant généré 500,765 millions de Dh en 2006 (Sbay, 2008).

Des programmes importants d'intensification et d'extension de la culture de caroubier sont prévus dans le cadre du Plan Maroc Vert. L'objectif fixé est d'augmenter la production de plus de 29 000 tonnes par an dans un cer-

tains nombre de régions du Maroc à l'horizon de 2020 (ADA, 2009). La réussite de ces programmes ambitieux est certainement conditionnée par un approvisionnement conséquent en plants de qualité. Les techniques traditionnelles de multiplication de caroubier ne pourraient satisfaire les besoins accentués en plants. Le recours aux biotechnologies, notamment l'embryogenèse somatique, permettrait une production en masse et rapide de génotypes élites, indépendamment des saisons et est aussi d'intérêt pour les programmes d'amélioration génétique (Stasolla et al., 2002; Strosse et al., 2003; Lipavska et al., 2004; Bhattacharya et al., 2010).

Les premières tentatives de multiplication de caroubier par embryogenèse somatiques (Carimi et al., 1997) n'ont permis d'obtenir que 16% de cals embryogènes après 10 à 12 mois de la mise en culture des ovules fertiles de caroubier. D'autres travaux publiés par la suite ont utilisé divers types d'explants comme les cotylédons immatures

<sup>1</sup> Laboratoire de culture *in-vitro*, Département de Production, Protection et Biotechnologie Végétales (DPPBV), Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Rabat, Maroc

<sup>2</sup> Institut National de la Recherche Agronomique, CRRAR, Unité de Recherche en Biotechnologie, Rabat, Maroc

(Canhoto et al., 2006), les embryons zygotiques (Custódio et al., 2006) et les graines immatures (Ksia et al., 2008) pour régénérer des embryons somatiques. À noter que ces types d'explants sont difficiles à manipuler et ne sont disponibles que pendant une très courte période de l'année.

Ainsi, l'objectif de ce travail est d'initier un protocole d'embryogenèse somatique pour la production en masse de plants de caroubier à partir de cotylédons de graines mûres. Dans cet essai, l'effet de la concentration de 2,4-D additionnée au milieu d'induction a été investigué.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### Source d'explants et désinfection

Des graines matures de caroubier ont été récoltées de populations sélectionnées de caroubier au niveau de la région d'El Ksiba dans le Moyen Atlas du Maroc. Ces graines ont été scarifiées par immersion dans l'acide sulfurique ( $H_2SO_4$  à 36 N) pendant une heure, puis trempées dans l'eau pendant 48 heures. Elles ont ensuite été désinfectées à l'eau de javel commerciale (7%) pendant 10 min et rincé plusieurs fois à l'eau distillée stérile. Les cotylédons ont été prélevés aseptiquement et chaque cotylédon a été subdivisé en quatre fragments de 4 à 6 mm.

D'autres types d'explants ont été également utilisés dans la présente étude: des feuilles et des fragments d'hypocotyle, d'épicotyle et de racines, prélevés de plantules cultivées *in vitro*, en plus de graines immatures de 4 à 5 mm prélevées aseptiquement de gousses préalablement nettoyées à l'éthanol 90° et désinfectées à l'eau de javel commerciale (30%) pendant 15 min.

### Milieus et conditions de culture

#### Induction des cals

Le milieu MS (Murashige and Skoog, 1962), utilisé en phase d'induction des cals, a été additionné ou non de 2,4-D (Acide 2,4 - Dichlorophénoxyacétique) à 0,5; 1,25; 2,5; 5; 10, 15 et 20  $\mu M$ . Le milieu de culture contenant 30 g/l de saccharose a été solidifié par l'agar (Bactériologique, Difco) à 0,8 %. L'autoclavage a lieu, pendant 20 minutes, à 121 °C après ajustement du pH à 5,8 avec HCl ou NaOH (0,1 N). Les explants ont été placés dans des boîtes de Pétri contenant 20 ml de milieu d'induction. Les cultures ont été maintenues, pendant 6 semaines, à l'obscurité et à  $25 \pm 2$  °C.

Dans le but de confirmer les résultats obtenus, l'essai a été refait avec les trois concentrations 2,5; 5 et 10  $\mu M$  de 2,4-D.

#### Développement des structures embryonnaires

Après 6 semaines de culture dans le milieu d'induction, les cals obtenus ont été transférés dans le milieu MS dépourvu de régulateurs de croissance. L'incubation a lieu à  $25 \pm 2$  °C, sous une photopériode de 16 heures.

### Analyse statistique

Les pourcentages 0 et 100 ont subi, respectivement, la transformation  $(1/4n)$  et  $(1-1/4n)$ ;  $n$  étant le nombre d'explants mis en culture. La transformation arcsin a été appliquée avant de procéder à l'analyse de la variance à un facteur. En cas de différences significatives, les moyennes ont été classées selon le test de Duncan au seuil de probabilité de 5 %.

## RÉSULTATS

### Première expérimentation

#### Induction des cals

Des cals translucides de couleur blanc-crème, caractérisant les cals embryonnaires, se sont formés sur les parties excisées et superficielles des fragments de cotylédons matures à partir de la deuxième semaine de culture dans le milieu d'induction additionné de 2,4-D (Figure 1-A). L'initiation des cals a débuté par une hypertrophie notable des fragments de cotylédons. L'augmentation des dimensions des explants a eu lieu pour tous les niveaux de 2,4-D testés.

Au bout de cinq semaines, tous les explants (100%) ont produit des cals nodulaires en présence de 2,4-D (Figure 1-B). En absence de cette auxine, aucune production de cals n'a été observée.

#### Développement des structures embryonnaires

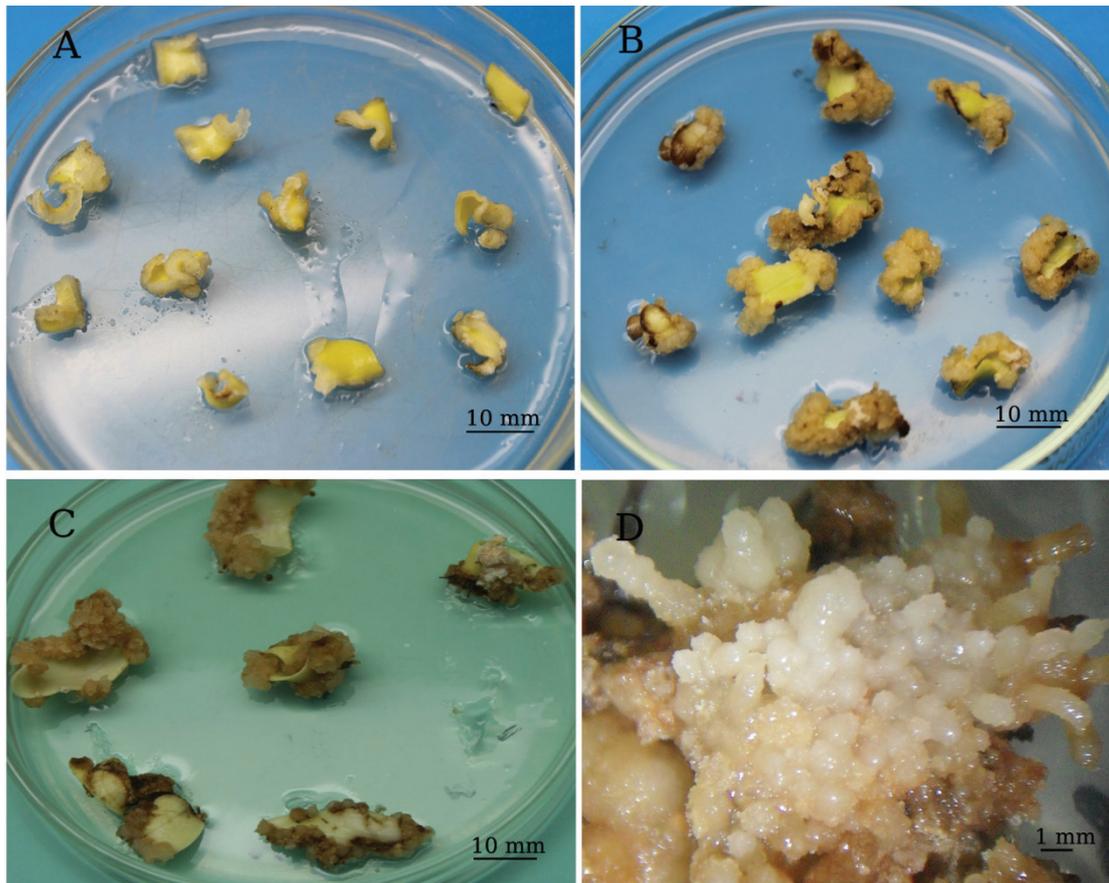
Le repiquage des structures obtenues sur le milieu de développement dépourvu d'auxine a favorisé la différenciation de structures embryonnaires globulaires (SEG) (Figures 1- C,D). L'ajout de concentrations  $\geq 1,25$   $\mu M$  de 2,4-D dans le milieu d'induction a significativement ( $P \leq 0,01$ ) influencé le pourcentage d'explants ayant développé des SEG ainsi que leur nombre. Des niveaux de 86,7 à 100% de SEG ont ainsi été obtenus dans le cas des concentrations  $\geq 1,25$   $\mu M$  de 2,4-D. Des résultats significativement inférieurs (66,7%) ont été obtenus en présence de 0,5  $\mu M$  de 2,4-D (Figure 2). Le nombre moyen de SEG par gramme de cal a varié entre 34,4 (0,5  $\mu M$  de 2,4-D) et 85,6 (2,5  $\mu M$  de 2,4-D) (Figure 3). Il est à signaler que l'augmentation de la concentration de 2,4-D à 15 et 20  $\mu M$  a été accompagnée d'une hyperhydricité des SEG ayant atteint un niveau de 38,5% dans le cas d'initiation en présence de 20  $\mu M$ .

L'utilisation de graines immatures, de feuilles et de fragments d'hypocotyles, d'épicotyles et de racines et de feuilles a été accompagnée d'un brunissement et mort des explants après une semaine de la mise en culture.

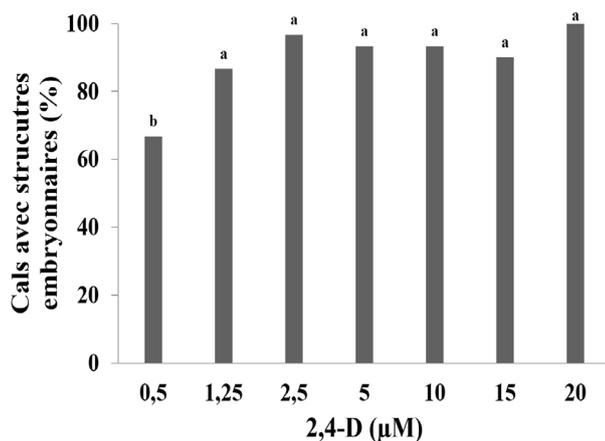
### Deuxième expérimentation

#### Induction des cals

Au bout de cinq semaines de culture, tous les explants (100%) ont produit des cals nodulaires embryogènes pour les trois concentrations de 2,4-D testées.

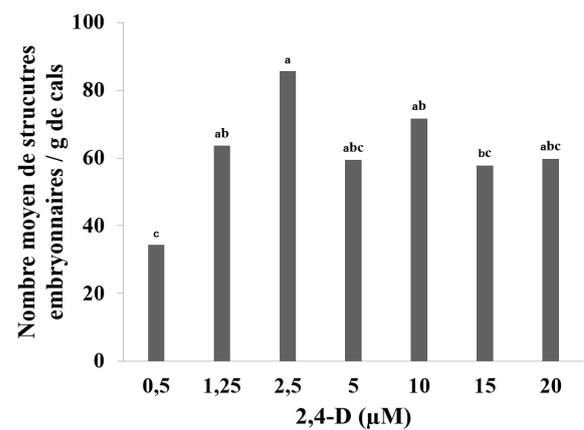


**Figure 1: Structures régénérées à partir de cotylédons matures de *Ceratonia siliqua* L.-**  
**A. Cals obtenus après 2 semaines de culture dans le milieu d'induction additionné de 10 µM 2,4-D;**  
**B. Cals embryogènes obtenus après 6 semaines de culture dans le milieu d'induction additionné de 10 µM 2,4-D;**  
**C. Structures embryonnaires globulaires obtenues après 6 semaines de culture dans le milieu d'induction additionné de 10 µM de 2,4-D suivies d'une semaine dans le milieu sans hormones;**  
**D. Structures embryonnaires globulaires et bipolaires obtenues après 6 semaines de culture dans le milieu d'induction additionné de 15 µM de 2,4-D suivies de 10 semaines dans le milieu sans hormones.**



**Figures 2: Effets de la concentration de 2,4-D sur la production de cals avec structures embryonnaires à partir de cotylédons matures de *Ceratonia siliqua* L.**

Les pourcentages suivis par la même lettre ne diffèrent pas significativement d'après le test de Duncan au seuil de 5 % (n=36).

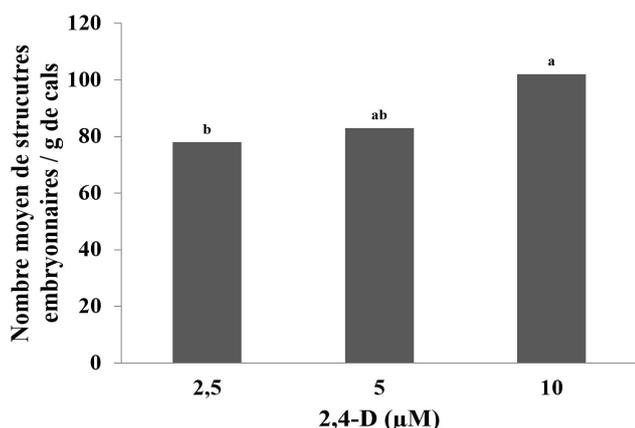


**Figure 3: Effets de la concentration de 2,4-D sur le nombre moyen de structures embryonnaires obtenues à partir de cotylédons matures de *Ceratonia siliqua* L. par gramme de cals**

Les pourcentages suivis par la même lettre ne diffèrent pas significativement d'après le test de Duncan au seuil de 5 % (n=36).

## Développement des structures embryonnaires

Après deux semaines de culture dans le milieu de développement dépourvu d'auxine, les cals obtenus ont tous produit des SEG. L'augmentation de la concentration de 2,4-D à 10  $\mu\text{M}$  dans le milieu d'induction a significativement ( $P \leq 0,01$ ) amélioré le rendement en SEG produites (102/g) en comparaison avec 2,5 (78/g) et 5  $\mu\text{M}$  (83/g) (Figure 4). À noter que l'utilisation de 2,5  $\mu\text{M}$  de 2,4-D s'est accompagnée d'une production de niveaux élevés de nécrose (58%) et de racines (25%) comparativement aux milieux contenant 5 et 10  $\mu\text{M}$  (19%).



**Figure 4:** La réponse des portions de cotylédons matures de *Ceratonia siliqua* L. aux différentes concentrations de 2,4-D. Les pourcentages suivis par la même lettre ne diffèrent pas significativement d'après le test de Duncan au seuil de 5 % ( $n=50$ ).

## DISCUSSION

L'originalité de la présente étude réside dans le fait que c'est la première fois, à notre connaissance, qu'un protocole prometteur permettant l'induction et le développement de structures embryonnaires à partir de graines matures de caroubier a été mis au point. Ce type d'explant présente l'avantage de disposer d'un matériel végétal toute l'année et qu'est facile à manipuler. L'utilisation des cotylédons matures pour obtenir des embryons somatiques a été rapportée chez d'autres espèces, entre autres, le manioc (Konan et al., 1994), l'arachide; (Venkatachalam et al. 1999), le noisetier (Berros et al. 2005), l'olivier (Brhadda et al., 2008) et l'aubergine (Swamynathan et al. 2010).

La régénération des embryons somatiques est fonction du matériel végétal utilisé et de la concentration de 2,4-D. La présence du 2,4-D seul dans le milieu d'induction a été suffisante pour l'induction de la callogenèse dans le cas des cotylédons matures. Au bout de cinq semaines, tous les explants ont produits des cals embryogènes pour tous les niveaux de concentrations testées. En absence de cette auxine, aucune production de cals n'a été obtenue.

Le 2,4-D est la principale auxine favorisant l'induction des cals chez la plupart des plantes ligneuses pour lesquelles l'embryogenèse somatique a été obtenue (Dunstan et al., 1995). Ceci est aussi valable pour les plantes de la famille des *Fabaceae* (Han et al., 1999). Chez le caroubier, le 2,4-D a été utilisé avec succès pour l'embryogenèse somatique à partir des embryons zygotiques (Custódio et al., 2006)

et des graines immatures (Ksia et al., 2008). Dans notre cas, aucune production de structures embryogènes n'a été obtenue dans le cas des graines immatures, des feuilles et des portions d'épicotyles, d'hypocotyles et de racines.

Le transfert des cals obtenus au milieu dépourvu d'auxine a permis le développement des structures embryonnaires globulaires, avec un maximum de 100% dans le cas d'initiation en présence de 10  $\mu\text{M}$  de 2,4-D. L'effet inhibiteur de l'auxine sur le développement des embryons somatiques a été rapporté par plusieurs auteurs (De Vries et al., 1988; Nomura et al., 1995; Filonova et al., 2000; Von Arnold et al., 2002; Machakova et al., 2008). Par ailleurs, il est nécessaire de transférer les cultures embryogènes à un milieu dépourvu d'auxine pour stimuler davantage la croissance des embryons somatiques (Von Arnold et al., 2002). Selon Zimmerman (1993), la réduction de niveau de l'auxine permet d'arrêter le blocage de l'expression des gènes responsables du passage des cultures embryogènes au stade de pré-maturation. Dans le cas de la carotte, il est nécessaire d'enlever le 2,4-D ou de réduire sa concentration pour stimuler le développement de la polarité embryonnaire (Fehér et al., 2003).

Des formations racinaires ont été obtenues dans le cas des explants cultivés en présence de 2,5  $\mu\text{M}$  de 2,4-D. Ce phénomène a également été observé chez d'autres espèces comme *Panax ginseng* (Choi et al., 1996) et le soja (Hartweck et al., 1988; Fernando, et al., 2002). La formation des racines le long de la surface des explants cotylédonaire de *Panax ginseng* s'est produite à cause d'un faible niveau hormonal dans cette région (Choi et al., 1996). Dans le cas du soja, les structures globulaires obtenues s'allongent en donnant des embryons somatiques ou des racines. Cette variation des structures morphogénétiques serait liée selon Fernando, et al., (2002) à l'accumulation polaire d'une hormone endogène. L'étude histologique de ce type de malformations a indiqué une absence du méristème végétatif et la présence d'un seul méristème racinaire. Ceci peut être associé à une utilisation prolongée de l'auxine sans cytokinine (Hartweck et al., 1988). Il a aussi été suggéré que la présence d'un méristème racinaire et la formation occasionnelle d'un méristème végétal chez les embryons somatiques anormaux serait dues à une germination précoce caractérisée par le développement de la racine et de l'interruption anticipée de l'activité méristématique à l'apex végétatif (Suhasini et al., 1996; Passos et al., 1999).

La production d'embryons somatiques à partir des portions de cotylédons matures de caroubier ouvre une nouvelle voie prometteuse pour la propagation en masse de cette espèce. D'autres études sont en cours pour améliorer la production et la qualité des embryons somatiques et permettre leur reconversion en plantules.

## BIBLIOGRAPHIE

- ADA (Agence pour le Développement Agricole) (2009). *Plan Agricole par région, Ministère de l'Agriculture et de la Pêche Maritime, Maroc* (28/04/2015).
- Berros B., Hasbún R., Radojevic L., Salajova T., Cañal M.J. and Rodríguez R. (2005). Protocol for hazelnut somatic embryogenesis. In: Jain S.M. and Gupta P.K., eds. *Protocol for Somatic Embryogenesis in Woody Plants*. The Netherlands: Springer. 413-126.

- Bhattacharya S., Bandopadhyay T.K. and Ghosh P.D. (2010). Somatic embryogenesis in *Cymbopogon pendulus* and evaluation of clonal fidelity of regenerants using ISSR marker. *Sci. Hortic.* 123: 505–513.
- Battle I. and Tous J. (1997). Carob tree - *Ceratonia siliqua*. 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.
- Canhoto J.M., Rama S.C. and Cruz G. S. (2006). Somatic embryogenesis and plant regeneration in carob (*Ceratonia siliqua* L.). *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant.* 42: 514-519.
- Carimi F., Di Lorenzo R. and Crescimanno F. G. (1997). Callus induction and somatic embryogenesis in carob (*Ceratonia siliqua* L.) from ovule culture. *Sci. Hortic.* 70: 73-79.
- Choi Y. E. and Soh W. Y. (1996). Effect of plumule and radicle on somatic embryogenesis in the cultures of ginseng zygotic embryos. *Plant Cell Tiss. Organ. Cult.* 45:137-143.
- Custódio L. and Romano A. (2006). In Vitro Morphogenesis in Zygotic Embryo Cultures of Carob Tree (*Ceratonia siliqua* L.). *Acta Hort.* 725: 477-481.
- De Vries S.C., Booij H., Meyerink P., Huisman G., Wilde D. H., Thomas T.L. and van Kammen A. (1988). Acquisition of embryogenic potential in carrot cell-suspension culture. *Planta.* 176: 196–204.
- Dunstan D.I., Tautorius T. E. and Thorpe T. A. (1995). Somatic embryogenesis in woody plants. In: Thorpe T. A., eds. *In vitro embryogenesis in plants*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 471-538.
- El Batal H., Hasib A., Ouattmane A., Boulli A., Dehbi, F. and Jaouad A. (2013). Yield and composition of carob bean gum produced from different Moroccan populations of carob (*Ceratonia siliqua* L.). *J. Mater. Environ. Sci.* 4 (2): 309-314.
- Fehér A., Pasternak T.P., Dudits D. (2003). Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell Tiss. Organ. Cult.* 74: 201–228.
- Fernando J., Vieira M., Geraldi I. and Appezzato-da-Glória B. (2002). Anatomical Study of Somatic Embryogenesis in *Glycine max* (L.) Merrill. *Braz. arch. biol. Technol.* 45 (3): 277-286.
- Filonova L., Bozhkov P. and von Arnold S. (2000). Developmental pathway of somatic embryogenesis in *Picea abies* as revealed by time-lapse tracking. *J. Exp. Bot.* 51: 249–264.
- Han K.H. and Park Y.G. (1999). Somatic embryogenesis in Black locust (*Robinia pseudoacacia* L.). In: Jain S. M., eds. *Somatic embryogenesis in woody plant*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 49-161.
- Hartweck L. M., Lazzeri P. A., Cui D. G., Collins B. and William E. (1988). Auxin-orientation effects on somatic embryogenesis from immature soybean cotyledons. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 24(8): 821-828.
- Konan N. K., Sangwan R. S. and Sangwan B. S. (1994). Somatic embryogenesis from cultured mature cotyledons of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Plant Cell Tiss. Organ. Cult.* 37(2): 91-102.
- Ksia E. Harzallah-skhir F., V. J. (2008). Somatic embryo production from immature seeds of carob (*Ceratonia siliqua* L.): histological evidence. *J Hortic. Sci. Biotechnol.* 83: 401–406.
- Lipavska H. and Konradova H. (2004). Somatic embryogenesis in conifers: the role of carbohydrate metabolism. *In Vitro Cell. Cell. Dev. Biol.-Plant.* 40 (23): 30.
- Machakova I., Zazimalova E. and George E.F. (2008). Somatic embryogenesis. In : Edwin F.G., eds. *Plant propagation by Tissue Culture*. Dordrecht, The Netherlands: Springer, 335-354.
- Nomura K. and Komamine A. (1985). Identification and isolation of single cells that produce somatic embryos at a high frequency in a carrot suspension culture. *Plant Physiol.* 79: 988–991.
- Ouchkif M. (1988). Etude sur le caroubier. Append number 8 of Project Oued Srou. MARA (Morocco)-GTZ (Germany), DPA of Khenifra.
- Passos I. R. S., Appezzato-da-Glória B. and Vieira M. L. C. (1999). Embryogenic responses of *Vitis* spp.: Effects of genotype and polyvinylpyrrolidone. *Vitis.* 38: 47-50.
- Sbay H. (2008). Le caroubier au Maroc Un arbre d'avenir. CRF Collection Maroc Nature.
- Serairi-Beji R., Mekki-Zouiten L., Tekaya-Manoubi L., Loueslati M.H., Guemira F. et Ben Mansour A. (2000). Can carob powder be used with oral rehydration solution for the treatment of acute diarrhea. *Med. Top:* 60-125.
- Stasolla C., Kong L., Yeung E.C. and Thorpe T.A. (2002). Maturation of somatic embryos in conifers: morphogenesis, physiology, biochemistry, and molecular biology. *In Vitro Cell Dev. Biol.-Plant.* 38: 93–105.
- Strosse H., Domergue R., Panis B., Escalant J.V. and Côte F. (2003). Suspensions cellulaires embryogènes de bananiers et bananiers plantain. In : Vézina A. and Picq C., eds. *Guides techniques INIBAP* 8. Montpellier (France).

- Suhasini K., Sagare A. P. and Krishnamurthy K. V. (1996). Study of aberrant morphologies and lack of conversion of somatic embryos of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *In Vitro Cell. and Dev. Biol.* 32 (6): 6-10.
- Swamynathan B., Nadanakunjidam S., Ramamourti A., Sindhu K. and Ramamoorthy D. (2010). *In-Vitro* Plantlet Regeneration Through Somatic Embryogenesis in *Solanum melongena* (Thengaithittu Variety). *Acad. J. Plant Sci.* 3(2): 64-70.
- Venkatachalam P., Geetha N., Khandelwal A., Shaila M. S. and Lakshmi Sita G. (1999). Induction of direct somatic embryogenesis and plant regeneration from mature cotyledon explants of *Arachis hypogaea* L. *Current Science.* 77(2): 269-273.
- Von Arnold S., Sabala I., Bozhkov P., Dyachok J. and Filonova L. (2002). Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell Tiss. Organ. Cult.* 69: 233–249.
- Zimmerman J.L. (1993). Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. *Plant Cell.* 5: 1411–1423.