

ESSAIS PRELIMINAIRES DE CULTURE IN VITRO DU CAROUBIER (*CERATONIA SILIQUA L.*) ORIGINAIRE DU NORD-OUEST DU MAROC

*Naoual GHARNIT*¹, *Abdeslam ENNABILI*^{2,3}

¹Laboratoire de Biologie Appliquée et Sciences de l'Environnement, Faculté des Sciences et Techniques, BP 416 – 90 000 Tanger (Maroc). ²Institut National des Plantes Médicinales et Aromatiques, Université Sidi Mohamed Ben Abdellah, BP 8691 – 30100 Fès (Maroc)

³Correspondance : Tél. / Fax: +212 (0)35932946 – aennabili@yahoo.fr

Résumé

Le caroubier (*Ceratonia siliqua L.*) est une *Caesalpiniaceae* à croissance lente et de grande importance économique. Des essais de propagation *in vitro*, menés chez cette espèce, ont montré que la culture d'apex a généré des plants caulogènes. Parmi les milieux testés, le milieu WPM s'est avéré le plus favorable. Les autres milieux favorisent la reprise de l'activité de l'apex, mais non pas le développement des plants. La culture menée sur les milieux MS, GD et WPM, additionnés ou non de la BAP, a montré que le milieu WPM additionné de 0.1 mg/l BAP est le plus favorable au développement des plantules enracinées. L'addition des auxines favorise le développement des cals, affectant ainsi la croissance des bourgeons.

Mots- clés

Ceratonia siliqua L., culture d'apex

Abréviations

AIA Acide Indole Acétique; **AIB** Acide Indole Butyrique; **ANA** Acide Naphto-Auxinique; **BAP** Benzyl Amino Purine; **B5** Gamborg; **D** Durzan; **GD** Gresshoff & Doy's; **H** Heller; **MS** Murashige & Skoog; **SH** Schenk & Hildbrandt; **WPM** Woody Plant Medium.

Summary

Preliminary assays of *in vitro* culture in carob tree (*Ceratonia siliqua L.*) from the NW of Morocco. Carob species (*Ceratonia siliqua L.*, *Caesalpiniaceae*) has a low growth rate and only varieties producing carobs are economically important in NW of Morocco. *In vitro* propagation of this species would facilitate regeneration of its productive types. Shoot culture generated caulogenous plantations and the WPM medium was the most advantageous. Other tested mediums favored activity renewal of terminal buds, but did not aid development of plantations. Cultures led on the MS, GD and WPM mediums, added or not with the BAP, showed that the WPM medium added of 0.1 mg.l⁻¹ BAP was more propitious to develop deep-rooted plantlets. Addition of auxins encouraged cal development affecting buds growth.

Keywords

Ceratonia siliqua L., shoot culture

Abbreviations

AIA Acetic Indole Acid; **AIB** Butyric Indole Acid; **ANA** Naphto-Auxinic Acid; **BAP** Benzyl Amino Purine; **B5** Gamborg; **D** Durzan; **GD** Gresshoff & Doy's; **H** Heller; **MS** Murashige & Acid Skoog; **SH** Schenk & Hildbrandt; **WPM** Woody Plant Medium

Introduction

Le caroubier (*Ceratonia siliqua* L.) est une Caesalpiniaceae arborescente, spontanée ou cultivée, et de grande importance économique ; elle tolère bien la sécheresse expliquant sa grande répartition dans les régions arides et semi-arides du climat méditerranéen (Correia & Martins Louçao, 1994 ; Lo Gullo & Salleo, 1988 ; Gharnit et al. 2001, 2006).

Quatre types infra-spécifiques ont été mis au point chez le caroubier originaire du Nord-Ouest du Maroc dont deux sont productifs de caroubes : “dkar” productif et “lanta” (Gharnit et al. 2001). La régénération in vivo de ces deux types via la germination des graines est possible avec un taux de survie élevé ; mais le greffage systématique des semis à un âge précoce demeure nécessaire pour garantir la production des caroubes une fois à maturité. Malgré que le bouturage in vivo chez ces deux types ait aussi donné de meilleurs résultats de reprise, l’enracinement n’a pas eu lieu même après une année de culture (Gharnit et al. sous presse).

La micropropagation du caroubier a fait l’objet de plusieurs travaux dont particulièrement Thomas & Mehta, (1983), Vinterhalter & Vinterhalter (1992), Belaizi et al. (1994) et Gharnit (1997). Cette étude présente des essais préliminaires de culture d’apex à partir du matériel juvénile, obtenu par germination des graines, en vue d’approcher quelques techniques de micropropagation chez cette espèce avant tout essai de culture du matériel adulte de géotypes élites.

Matériels et méthodes

Les caroubes de *C. siliqua* ont été collectées à partir d’un arbre de type “dkar” productif originaire du Nord-Ouest du Maroc. Les graines récupérées ont été stérilisées (désinfection et scarification) en utilisant de l’acide sulfurique (H_2SO_4 à 36 N). Ce traitement acide est suivi par 3 rinçages à l’eau distillée stérile durant 10, 10 et 15 minutes. Les graines sont ensuite imbibées et maintenues en agitation (10 tours par minute) pendant 48 heures.

Les graines ainsi préparées sont mises à germer d’une façon homogène dans des flacons à raison d’une graine par flacon contenant 50 ml d’eau gélosée à 0.7 %. D’autre part, nous avons testé sept macroéléments afin d’étudier l’influence des différents milieux de culture sur la germination des graines et sur le développement et la croissance des plantules du caroubier. Il s’agit des macroéléments

de MURASHIGE et SKOOG (MS) (1962), HELLER (H) (1953), GAMBORG (B5) (1968), GRESSHOFF et DOY’S (GD) (1972), SCHENK et HILDEBRANDT (SH) (1972) et DURZAN (D) (1973). Les microéléments utilisés sont ceux de MURASHIGE et SKOOG (1962) y compris Fe-EDTA (Acide Ethylène-Diamine-Tétracétique de Fer). Les milieux ajustés à pH 5.8, sont autoclavés à 120°C pendant 20 minutes. Les cultures ont été placées dans une salle climatisée à 26 ± 1 °C. L’éclairage et la photopériode journalière sont maintenus respectivement à 1500 lux et 16 heures.

A partir de jeunes plantules au stade 2 feuilles cotylédonaire, des apex de 4-5 mm ont été prélevés et mis en culture sur des milieux nutritifs. Le test est fait sur les mêmes milieux de culture utilisés pour la germination, en plus de Woody Plant Medium (WPM), et sans phytohormones afin d’identifier le milieu optimal pour le développement des explants. En plus des vitamines, microéléments de MS, saccharose 3 % et myo-inositol 100 mg/l, nous avons ajouté dans les milieux MS, WPM et GD toute une combinaison hormonale contenant la BAP seule ou associée à des auxines (AIA, ANA ou AIB). Les cultures ont été placées sous les mêmes conditions de photopériode, mais à un éclairage plus intense de 3500 lux.

Résultats

Germination des graines

Sur l’eau gélosée, les graines de *C. siliqua* germent à 100 % (n=40) et donnent des racines de 5 à 6 mm de longueur, après 1 jour de la mise en culture. La première feuille primordiale, ou non cotylédonnaire, apparaît à partir du huitième jour de culture pour 45 % des plantules. Dès la deuxième semaine, 20 % des plantules présentent deux feuilles. Après un mois de culture, nous avons noté un pourcentage de 20 % des plantules à quatre feuilles et 10 % à cinq feuilles. D’autre part, 65 % des plantules présentent des feuilles alternes. Tandis que 35 % des plantules présentent des feuilles presque opposées, générant des plantules à entrenœuds courts et d’autres à entrenœuds longs le long de l’axe de l’épicotyle. Contrairement à l’eau gélosée, où les plantules présentent des feuilles alternes à presque opposées, la germination des graines sur d’autres milieux de culture a généré trois types de plants : plants à feuillage basilaire, aérien alterne ou aérien touffu.

D’après le tableau 1, le géotropisme positif caractérise 88.8 % des plantules pour le milieu MS et atteint 100 % pour les milieux D et GD. Les plantules à

géotropisme négatif dégénèrent et ne continuent pas leurs croissances et développement. Les plants à feuillage basilaire, fréquents dans le milieu SH, ont une disposition foliaire basilaire au niveau des feuilles cotylédonaire; le nombre des feuilles varie de 2 à 5 ; la foliation aérienne est alterne ou en verticelle-touffue. Les plants à feuillage aérien alterne sont majoritaires pour le milieu D et présentent une

foliation aérienne alterne normale, comme dans le cas de l'eau gélosée. Pour les plants à feuillage aérien touffu, nous notons une abondance dans le milieu MS. Ils présentent une foliation aérienne touffue; le nombre des feuilles varie de 3 à 6 par touffe ou verticelle. La foliation ultérieure est alterne ou touffue.

Tableau I: Fréquence relative des types de plants dans différents milieux de culture.

Types de plants	MS	D	H	GD	SH	B5
% de plants à géotropisme positif	88.8	100	80.0	100	80.0	78.1
% de plants à feuillage basilaire	8.33	7.32	20.0	2.77	30.0	15.6
% de plants à feuillage aérien alterne	5.55	48.7	8.57	36.1	17.5	18.7
% de plants à feuillage aérien touffu	74.9	43.9	51.4	61.1	32.5	43.7
% de plants à géotropisme négatif	11.1	0.00	20.0	0.00	20.0	21.8

Culture d'apex

La reprise de l'apex commence après deux semaines de sa mise en culture. Sur les sept milieux nutritifs utilisés, les résultats obtenus montrent que la régénération, le développement et la croissance

des plantules sont plus favorables dans le milieu WPM (figures 1 et 2) et à moindre degré dans le milieu GD.

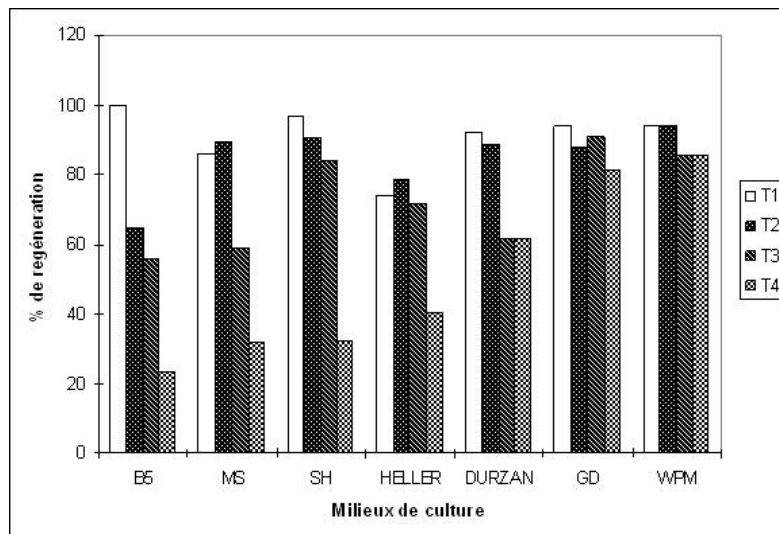


Figure 1: Effet des macroéléments sur la régénération des plantules à partir de la culture d'apex. T1= 2 semaines ; T2= 3 semaines ; T3= 4 semaines ; T4= 5 semaines.

Un autre essai de la culture d'apex, seulement sur les milieux MS, WPM et GD a montré qu'en absence de phytohormones, les explants sont caulogènes à 100 %. Les résultats consignés dans le tableau 2 montrent que le milieu WPM est le plus favorable car les plantules atteignent une longueur moyenne de 5.00 ± 1.78 cm et ont un nombre moyen de 4 bourgeons axillaires par explant avec un pourcentage de nécrose apicale faible (16.6 %). Pour le milieu MS, le taux de nécrose apical atteint 33.3 %

et peut entraîner parfois la dominance de l'activité du bourgeon axillaire. Le pourcentage d'enracinement dans le milieu WPM est proche à celui observé dans le milieu MS. Le nombre moyen des racines par explant est de 4.00 ± 2.28 . Elles sont dotées de racines secondaires et formées dans un même plan, au niveau basal des explants.



Figure 2: Jeune plantule de 9 semaines provenant de la culture d'apex sur le milieu WPM dépourvu de régulateurs de croissance. On observe le développement des racines (x3).

L'addition de la BAP seule, utilisée comme la seule cytokinine dans le milieu de propagation à une concentration de 0.1 mg.l^{-1} , a permis d'obtenir des explants caulogènes et callogènes. Dans le milieu MS, nous notons l'apparition des lenticelles hypertrophiées blanchâtres chez 41.4 % des explants dans les parties basale et moyenne de la tige. Dans le milieu GD, nous assistons au développement des touffes de pousses sur les cals mais à un faible pourcentage (3.33 % des explants) et avec une diminution de la longueur des plants. Dans ce dernier milieu, nous observons un développement des cals, mais cette fois-ci, sans enracinement des explants. En présence de 0.1 mg.l^{-1} de la BAP, concentration favorable à l'établissement des explants pour les trois milieux testés, nous avons dénoté une augmentation de la vigueur des plants avec une diminution du phénomène de la nécrose apicale par rapport au témoin (**tableau 2**); les feuilles sont bien développées. Le milieu WPM additionné de la BAP à une concentration de 0.1 mg.l^{-1} , a donné lieu à un nombre élevé de 4.79 ± 1.60 bourgeons axillaires par explant et la longueur moyenne des jeunes plantules est de $4.02 \pm 1.75 \text{ cm}$ (**figure 3**). Il est à noter que le nombre moyen de bourgeons axillaires par explant est non proportionnel à la longueur moyenne car nous notons une différence dans la longueur des entre-

nœuds des vitroplants due probablement soit à la présence de la BAP soit au comportement des vitroplants vis-à-vis des conditions de culture.



Figure 3: Néoformation de tiges après 4 semaines de culture sur le milieu WPM additionné de 0.1 mg/l de la BAP. On observe le développement du cal. (x 3).

Pour le milieu MS, l'effet de la cytokinine seule ou associée à des auxines sur le pourcentage de la callogenèse et de la caulogénèse est représenté dans la figure 4. Nous avons observé qu'en présence de la BAP seule (0.1 ou 1 mg.l^{-1}), le pourcentage de la callogenèse est inférieur à celui que nous avons obtenu avec l'addition des auxines. L'augmentation de la concentration de la BAP à 1 mg.l^{-1} fait diminuer la caulogénèse. En présence des auxines, la callogenèse augmente et atteint son maximal en présence de 1 mg.l^{-1} de la BAP associée à 0.1 mg.l^{-1} de l'AIA, suivie d'une concentration de 0.1 mg.l^{-1} de l'ANA et enfin de 0.1 mg.l^{-1} de l'AIB. En effet, nous avons noté une différence nette concernant le développement des cals; en présence de la BAP, ils sont petits de couleur vert clair ou brun. Le même cas était observé pour 0.1 mg.l^{-1} de l'AIB. Nous avons abouti à des cals moyens pour 0.1 mg.l^{-1} de l'ANA et de bons cals pour 0.1 mg.l^{-1} de l'AIA. Compte tenu de ces résultats, nous pouvons dire que la présence des auxines dans le milieu de culture augmente la callogenèse. Tandis que la présence de la BAP seule à une concentration de 0.1 mg/l de la BAP augmente le taux de la caulogénèse.

Tableau II : Influence de la cytokinine BAP sur les apex cultivés dans les milieux WP, MS et GD pendant la phase d'établissement après un mois de culture. (n=30).

Caractéristiques des explants	WPM	WPM	MS	MS	GD	GD
	+0 BAP	+0.1 BAP	+ 0 BAP	+ 0.1 BAP	+ 0 BAP	+ 0.1 BAP
Bourgeons vitrifés (%)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Vitroplants ayant des lenticelles hypertrophiés(%)	0.00	0.00	0.00	41.4	0.00	0.00
Explants présentant la nécrose apicale (%)	16.6	3.57	33.3	17.2	16.6	10.3
Bourgeonnement basilaire massif (%)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	3.33
Longueur moyenne des plantules (±SD cm)	5.00	4.02	1.98	3.07	2.53	2.39
Nombre moyen de bourgeons axillaires/explant (±SD cm)	±1.78	±1.75	±0.61	±0.95	±0.66	±0.67
Pourcentage de reprise (%)	4.17	4.79	3.37	5.50	3.77	4.77
Pourcentage d'enracinement	±0.89	±1.60	±0.69	±2.18	±0.78	±1.05
Nombre moyen de racines par explant (±SD cm)	100	96.6	88.8	93.3	100	86.6
	83.3	3.45	87.5	0.00	66.6	0.00
	4.00	4.00	2.00	0.00	2.50	0.00
	±2.28		±0.92		±1.12	

Le milieu WPM additionné de régulateurs de croissance (**figure 5**) a montré qu'en présence de la BAP seule, la caulogénèse est maximale (100 %). En effet, le pourcentage de la callogénèse est faible en présence de 0.1 mg.l⁻¹ de la BAP et les cals sont blancs à la base et verts au sommet, durs et présentent un développement moyen. En présence de 0.5 mg.l⁻¹ de la BAP, les cals, très peu développés, sont verts parfois bruns- durs à la base et friables au sommet. L'addition des auxines diminue le degré de

la caulogénèse mais d'une manière peu marquée par rapport aux résultats obtenus sur le milieu MS (**figure 4**). Alors, les cals verts ou bruns et parfois blancs, en présence de l'AIB sont peu développés, friables et parfois durs. En présence de l'ANA, ils ont une taille moyenne et sont verts, friables ou durs. Enfin, les cals verts en présence de l'AIA, ont une grande taille et sont friables.

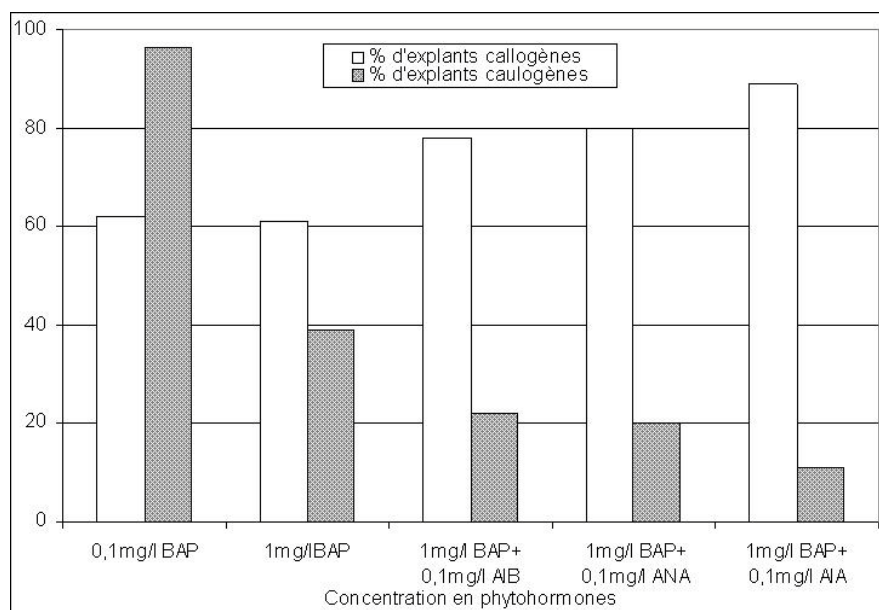


Figure 4: Influence de la BAP seule ou associée à trois auxines (AIA, AIB et ANA) sur le développement des apex après un mois de culture sur le milieu MS (n=30).

Il en découle que le milieu WPM additionné de 0.1 mg.l^{-1} de la BAP reste le plus adéquat pour l'établissement des vitroplants et pour leur enracinement puisque nous avons mis en évidence une production de bourgeonnement à 100 % avec un taux plus faible aussi bien de la nécrose apicale que de la callogenèse. La comparaison entre les trois

milieux testés en présence de la même concentration de la BAP a montré que la callogenèse est optimale pour le milieu MS, suivie en terme de pourcentage du milieu GD, où les cals verts ou bruns, ont une petite taille et un taux beaucoup plus faible enregistré dans le milieu WPM (**figures 4 et 5**).

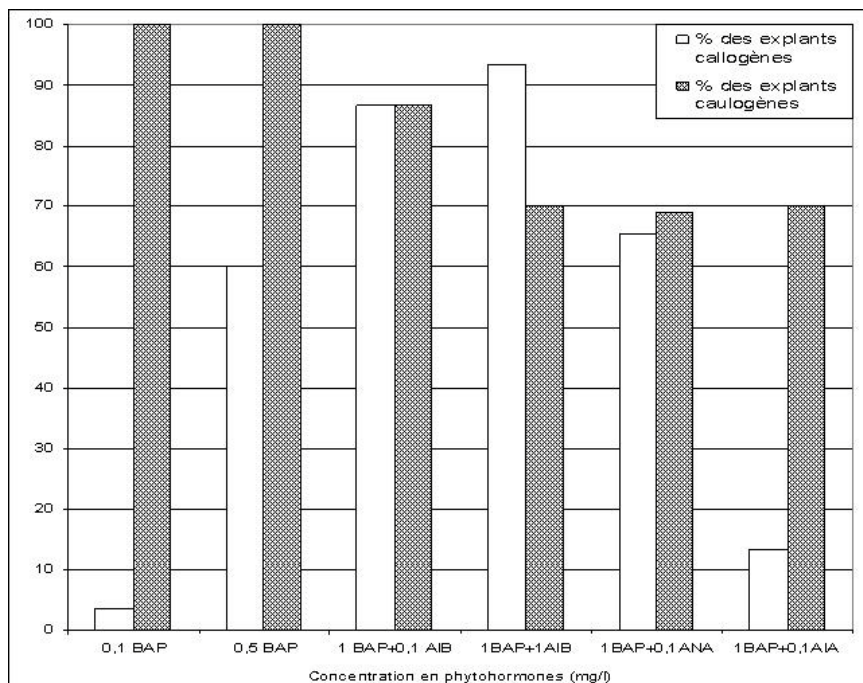


Figure 5: Influence de la BAP seule ou associée à trois auxines (AIA, AIB et ANA) sur le développement des apex après un mois de culture sur le milieu WPM (n=30).

Discussion

Les plantules obtenues, à partir de la germination sur eau gélosée, diffèrent entre eux par la longueur des entre-nœuds qui sont parfois courts ou longs. Ceci paraît être lié à la nature de cette plante au cours de sa voie de croissance normale ou peut-être aux conditions de la culture. Ainsi, le taux de la germination a atteint 100 %. Cette synchronisation serait due à la méthode de traitement des graines que nous avons utilisée permettant une germination rapide. Tandis que la germination des graines sur les six milieux nous a permis d'obtenir trois types de plants. Ces derniers ont été identifiés selon le nombre de feuilles et leur mode de disposition sur l'axe caulinaire.

La reprise et le développement des explants, à partir d'apex, sont plus favorables dans le milieu WPM, suivi du milieu GD. Cette différence de la reprise et du développement de l'apex observée entre les milieux de culture utilisés découlerait

certainement de la différence dans leur composition minérale. Manzanera *et al.* (1990) ont montré que les milieux à concentrations faibles en ions sont plus souhaitables pour la croissance et la prolifération des explants de *Quercus suber* eu égard à d'autres milieux riches en ions. Cela veut dire que les jeunes explants n'ont pas besoin d'un milieu très riche en minéraux pour se développer. De plus, l'excès en minéraux, couplé à l'absence de phytohormones, entraînent la nécrose progressive des plants et la réduction de la taille des feuilles.

Il est souvent admis que la cytokinine (BAP) doit être présente pour le développement des explants de *Quercus suber* (Manzanera *et al.*, 1990). Le niveau optimal souligné par ces auteurs est de $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$ de la BAP. En effet, l'ajout de $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$ de la BAP dans le milieu de culture a permis un bon développement des explants de *C. siliqua* en diminuant le taux de la nécrose apicale. L'élongation dans les milieux WPM et GD est significativement plus élevée que dans le milieu MS. Des résultats similaires ont été obtenus

par plusieurs auteurs ayant travaillé sur différentes plantes ligneuses (*in Romano, 1992*). Chez quelques explants qui développent des racines vigoureuses, le rôle de la dominance apicale est pris par les bourgeons axillaires, généralement ceux qui sont près de l'apex et la plante survit. Nos observations concordent avec celles de Vieitez *et al.* (1989) qui ont souligné que la nécrose apicale survient durant l'enracinement et durant la phase d'élongation des apex en utilisant un milieu sans BAP.

L'apparition rapide de la nécrose apicale au stade ultime de la croissance vigoureuse des plants, d'après Vieitez *et al.* (1989) et Vinterhalter & Vinterhalter, (1992), indique que ce désordre peut être causé par l'épuisement rapide de quelques nutriments du milieu. Néanmoins, Vinterhalter & Vinterhalter, (1992) ont supposé que l'implication de l'éthylène et d'autres gaz dans ce processus serait possible car des auteurs ont confirmé que les tissus de calcs formés produisent des quantités significatives de l'éthylène (*in Vinterhalter & Vinterhalter (1992)*). Il apparaît donc que le caroubier ne nécessite pas d'auxines pour s'enraciner. Nos résultats coïncident avec ceux obtenus par Vinterhalter & Vinterhalter (1992) chez le caroubier, et Alderson *et al.* (1987) chez *Prunus tenella*. Ces derniers ont souligné que les racines peuvent se développer dans un milieu sans phytohormones. L'utilisation des auxines désavantage la croissance des pousses car elle favorise la croissance des calcs, mais débilite le développement. C'est pourquoi le pourcentage de réussite de plantules régénérées par cal demeure faible.

La prolifération des lenticelles rapportée par Vinterhalter *et al.* (1992) dans le cas du caroubier cultivé *in vitro*, est un mécanisme spécifique d'adaptation qui tient les explants survivants sous des conditions de ventilation réduite. Ces auteurs ont pu établir aussi la corrélation entre la formation des lenticelles et la présence de la BAP dans le milieu. Cependant dans notre cas, les lenticelles n'apparaissent ni dans le milieu GD additionné de 0.1 mg.l⁻¹ de BAP ni dans le milieu WPM additionné de 0.1 mg.l⁻¹ de BAP. Mais, elles apparaissent dans le milieu MS additionné de 0.1 mg.l⁻¹ de BAP. Donc, ça peut être lié à la concentration élevée en minéraux qui stresse les vitroplants en augmentant indirectement l'humidité à l'intérieur des flacons de culture.

Il ressort de ces essais préliminaires que la micropropagation de *C. siliqua* est possible à partir du matériel juvénile. Elle permet d'avoir une information sur le milieu propice et les conditions

qui pourraient être appliquées aux explants des pieds matures. Les plantules sur lesquelles nous avons pratiqué la vitroculture proviennent de la germination des graines dont nous ne connaissons pas le sexe ; alors que ce sont les deux types productifs du caroubier qui ont une importance socio-économique pour les agriculteurs locaux. Il faudrait donc développer une procédure efficace et reproductible en vue de régénérer par culture *in vitro* des plantules entières à partir d'organes végétatifs adultes âgés ou rajeunis à caractéristiques agronomiques connues. A ce propos, des expériences supplémentaires sont nécessaires en retenant le milieu de culture à concentration favorable de cytokinine et en menant des semi-cultures pour confirmer la stabilité et le taux de prolifération des vitroplants.

Références

Alderson, P.G. *et al.* 1987. Micropropagation of *Prunus tenella* cv. Firehill. *Acta Horticultural*, 211: 463-468.

Belaizi, M., M.R. Bolen & P. Boxus 1994. Régénération *in vitro* et acclimatation du caroubier (*Ceratonia siliqua* L.). Dans « Quel avenir pour l'amélioration des plantes ? », J. Dubois et Y. Demerly (eds). J. Libbey Eurotext. P : 227-232.

Correia, P.M. & M.A. Martins-Loucao 1994. Preliminary studies on Mycorrhizae of *Ceratonia siliqua* L. In New York Botanical Gardens: Mycorrhizas in integrated systems from genes to plant development. NY Bronx. 86 - 88.

Durzan, D.J., S.C. Chafe & S.M. Lopushanski 1973. Effects of environmental changes on sugar, tannins, and organized growth in cell suspension cultures of white spruce. *Planta*, 113: 241-249.

Gamborg, O.L., R.A. Miller & K. Ojima 1968. Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell. Res.*, 50:148-151.

Gharnit, N. 1997. Le caroubier (*Ceratonia siliqua* L.) : essais de propagation *in vitro* et intérêt socio-économique au Cercle de Mokrisset (NW du Maroc). Mémoire DESA, N° 576. 5, GHA., Université Abdelmalek Essaadi, Faculté des Sciences de Tétouan (Maroc). 48 p.

Gharnit, N., N. El Mtili, A. Ennabili & F. Sayah 2006. Importance socio-économique du caroubier (*Ceratonia siliqua* L.) dans la Province de Chefchaouen (nord-ouest du Maroc). *J. Bot. Soc. Bot. France* 33 : 43-48

Gharnit, N., N. El Mtili, A. Ennabili & F. Sayah. sous presse. Essais de culture *in vivo* du caroubier (*Ceratonia siliqua* L.) originaire du Nord-Ouest du Maroc. *Revue AFN Maroc*, 2-3.

Gharnit, N., N. El Mtili, A. Toubi Ennabili, A. Ennabili 2001. Social characterisation and exploitation of carob tree

(*Ceratonia siliqua* L.) from Mokrisset and Bab Taza (NW of Morocco). *Science Letters* 3(2): 10 p.

Gresshoff, P.M. & C.H. Doy 1972. Développement and differentiation of haploid *Lycopersicum esculentum* (tomato). *Planta*, 107: 161-170.

Heller, R. 1953. Recherches sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivés *in vitro*. *Annales de Sc. Nat. Bot. Biol. Végétale*, 14: 1-223.

Lo Gullo, M.A. & S. Salleo 1988. Different strategies of drought resistance in tree Mediterranean sclerophyllous trees growing in the same environmental conditions. *New Phytol.* 108: 267-276.

Manzanera, J.A. & J.A. Pardos 1990. Micropropagation of juvenile and adult *Quercus suber* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 21: 1-8.

Mc Cown, B.H. et D.G. Lloyd 1981. A mineral nutrient formulation for micro-culture of woody plant species. *Hort. Sci.*, 16 (3), 453

Murashige, T. & F. Skoog 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.*, 15: 473-497.

Romano A. *et al.* 1992. Influence of growth regulators on shoot proliferation in *Quercus suber* L. *Annals of Botany* 70(6): 531-536.

Shenk, R.U. & A.C. Hildebrandt 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can. J. Bot.*, 50: 199-204.

Thomas, V. & A.R. Mehta 1983. Effect of phloroglucinol on shoot growth and initiation of roots in carob tree culture grown *in vitro*. In: *Plant Cell Culture in Crop Improvement*. Basic Life Sciences, (Sen S.K. and Giles K.L. Eds.) Plenum Press, New York, London. 22: 451-457.

Vieitz, A.M. *et al.* 1989. Prevention of shoot-tip necrosis in shoot cultures of chestnut and oak. *Scientia Horticulturae* 41: 151-159.

Vinterhalter D. *et al.* 1992. Lenticel Hypertrophy in shoot cultures of *Ceratonia siliqua*. *Plant cell Tissue and organ culture* 31(2): 111-114.

Vinterhalter, D. & B. Vinterhalter 1992. Factors affecting *in vitro* propagation of carob (*Ceratonia siliqua* L.). *Arch. Biol. Sci. Belgrade*, 44(3-4): 177-186.