

## (12) BREVET D'INVENTION

- (11) N° de publication : **MA 42316 B1** (51) Cl. internationale : **C05F 11/00; C12N 5/02; C12N 5/00**
- (43) Date de publication : **28.02.2020**

---

(21) N° Dépôt : **42316**

(22) Date de Dépôt : **12.04.2018**

(71) Demandeur(s) : **INSTITUT AGRONOMIQUE ET VETERINAIRE HASSAN II, Direction de la Recherche Scientifique et de la Formation Doctorale - DRSFD, Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Madinat al Irfane Rabat (MA)**

(72) Inventeur(s) : **LOZZI ASSIA ; ABOUSALIM ABDELHADI ; MENTAG RACHID ; ABDELWAHED RABHA**

(74) Mandataire : **GUISSI KHALID**

---

(54) Titre : **FORMULAIRE D'UN NOUVEAU MILIEU NUTRITIF DE BASE ET PROTOCOLE EFFICACE, RAPIDE ET ÉCONOMIQUE POUR LA MICROPROPAGATION IN VITRO DE CAROUBIER**

(57) Abrégé : La présente invention fournit un nouveau milieu nutritif, développé pour la première fois pour la micropropagation in vitro de caroubier. Le milieu nutritif développé contient les éléments essentiels pour la croissance des vitroplants de caroubier à des concentrations appropriées à cette espèce. La présente invention fournit également un procédé simple, rapide et économique pour la micropropagation de caroubier en utilisant le milieu de culture liquide et la technique d'enracinement ex vitro. Ce procédé constitue un outil important qui pourra faciliter la multiplication en masse de vitroplants de qualité chez le caroubier afin de répondre à la demande mondiale croissante en matière de cette espèce.

**L'abrégé**

La présente invention fournit un nouveau milieu nutritif, développé pour la première fois pour la micropropagation in vitro de caroubier. Le milieu nutritif développé contient les éléments essentiels pour la croissance des vitroplants de caroubier à des concentrations appropriées à cette espèce.

La présente invention fournit également un procédé simple, rapide et économique pour la micropropagation de caroubier en utilisant le milieu de culture liquide et la technique d'enracinement ex vitro.

Ce procédé constitue un outil important qui pourra faciliter la multiplication en masse de vitroplants de qualité chez le caroubier afin de répondre à la demande mondiale croissante en matière de cette espèce.

**Titre : Formulaire d'un nouveau milieu nutritif de base et protocole efficace, rapide et économique pour la micropropagation in vitro de caroubier**

### **La Description**

#### **1. Domaine technique auquel se rapporte l'invention :**

La présente invention concerne des procédés et des matériaux pour améliorer la culture in vitro de caroubier (*Ceratonia siliqua* L.).

Cette invention concerne spécifiquement un nouveau milieu nutritif de base qui favorise une croissance et un développement optimale des microboutures de caroubier.

Elle concerne aussi un procédé de micropropagation rapide et économique utilisant un milieu de culture liquide, sans agents gélifiants et un enracinement ex vitro combiné à l'acclimatation des microboutures.

#### **2. Contexte générale et état de la technique antérieur**

Le caroubier est considéré actuellement parmi les arbres les plus importants du bassin méditerranéen. Toutes les parties de la plante sont utiles et ont de valeur dans plusieurs domaines. Son importance s'est considérablement accrue ces dernières années en raison non seulement de son adaptation aux contraintes hydriques et de son indifférence vis-à-vis de la nature du sol, mais surtout pour ses graines qui font l'objet de transactions commerciales et dont la valeur dépasse de loin celle de la production ligneuse. La gomme extraite de l'endosperme de la graine, blanc et translucide, possède des caractéristiques très intéressantes en tant que multi-additif (E 410) dans la fabrication d'un grand nombre de denrées alimentaires. Elle est aussi utilisée dans l'extraction des liants, des stabilisants et des émulsions pour la fabrication de plusieurs produits pharmaceutique et cosmétique. Le Maroc occupe, derrière le Portugal, l'Italie et l'Espagne, le quatrième rang en matière de production de gousses avec 22.032 tonnes par an, soit 13.89% de la production mondiale (Tableau 1) (FAOSTAT, 2016). Tandis qu'il occupe première place mondiale en matière de rendement en graines qui est estimé de 17,4 à 29,4% (Lozzi et al. 2015).

Au Maroc, des programmes ambitieux d'intensification et d'extension de la culture de caroubier sont prévus dans le cadre du Plan Maroc Vert. La réussite de ces programmes d'envergure est certainement conditionnée par un approvisionnement important en plants de qualité.

Le semis est la méthode classique la plus utilisée pour la multiplication du caroubier. En effet la germination des graines est facilement réalisable, mais elle engendre une grande hétérogénéité génétique des plants obtenus. De plus, elle est entravée par la difficulté d'identification du sexe de la plante avant la maturation et l'entrée en production tardive, qui peut prendre plus de 7 ans. La multiplication du caroubier par greffage s'est développée ces dernières années pour reproduire les sélections d'intérêt commercial, mais le recours à des porte-greffes issus de semis affecte bien la conformité et la gestion technique des plantations ainsi que le rendement et la qualité de la production. En plus, cette technique ne permet de produire qu'un nombre réduit de plants et pendant une courte période de l'année et ne pourra pas ainsi satisfaire les besoins importants en plants.

Le recours à d'autres moyens plus performants de multiplication de plants, notamment la micropropagation in vitro, permettrait une production rapide de géotypes élites sélectionnés indépendamment des saisons et de satisfaire les besoins très importants en plants s'avère nécessaire. La micropropagation in vitro est une méthode moderne qui s'utilise à l'échelle mondiale pour la multiplication de plusieurs espèces comme le bananier, le palmier dattier, les portes greffes des espèces fruitiers et bien d'autres plants horticoles et forestiers. La prolifération de bourgeons axillaires par microbouturage est la technique la plus utilisée dans la micropropagation commerciale des espèces ligneuses (Gamborg and Phillips, 2013). Au cours des dernières années, certaines tentatives ont été faites pour multiplier le caroubier par microbouturage (Romano and Barros 2002; Saidi et al. 2007; Naghmouchi et al. 2008; Radi et al. 2013). Cependant, un certains nombre de limitation ont été notés : des taux de multiplication faibles, une production de pousses à taille réduite, des problèmes d'enracinement et d'acclimatation des pousses obtenues et l'apparition de certains désordres physiologiques comme la nécrose apicale des pousses. La composition minérale du milieu de culture considéré comme étant le facteur principal qui affecte la croissance in vitro des plantes (George et al. 2008). Le milieu nutritif de Murashige et Skoog (MS) (1962), qui a été formulé pour une croissance optimale des cals de tabac, est généralement le plus utilisé pour la micropropagation de caroubier comme dans le cas de plusieurs espèces. Ce milieu n'est, cependant, pas nécessairement optimal pour la multiplication in vitro de cette espèce. D'autres milieux nutritifs ont également testés pour la propagation de caroubier comme le milieu de Gresshoff et Doy (1972; GD) et le « Woody Plant Medium » (Lloyd et al. 1980) sans amélioration considérable (Romano and Barros 2002; Saidi et al. 2007). Plusieurs chercheurs ont souligné l'importance d'optimiser la composition minérale du milieu de culture selon les exigences spécifiques de chaque espèce afin d'obtenir une croissance optimale (George et al. 2008b; Aranda-Peres et al. 2009). Il n'existe à ce jour aucun travail portant sur la formulation d'un milieu nutritif spécifique à la micropropagation in vitro de caroubier. (Gonçalves et al. 2005) ont formulé un milieu nutritif pour l'enracinement in vitro des micropousses de caroubier, cependant, la multiplication a été réalisée sur le milieu de culture de MS.

D'autre part, l'application des techniques de la micropropagation in vitro pour la multiplication en masse des plantules est souvent limiter par le coût élevé de la production de plants lié entre autre aux constituants de milieu de culture, au procédés de production et au faible taux de viabilité des plantules ex vitro. L'utilisation d'un agent gélifiant comme l'agar dans le milieu de culture augmente significativement le coût de la micropropagation in vitro. Jusqu'à ce jour, tous les travaux publiés sur la micropropagation in vitro de caroubier se sont portés sur un milieu nutritif solide, essentiellement en milieu de culture de MS, contenant un agent gélifiant comme l'agar (0.7 %). L'agar reste le constituant le plus cher du milieu de culture. Elle représente à elle seule entre 70 et 80% du coût (Rathore et al. 2015).

La micropropagation in vitro ne sera compétitive à grande échelle qu'avec un coût plus réduit. D'où la nécessité de développer des procédés efficaces destinés aux applications industrielles pour une production à grande échelle de vitroplants de qualité.

L'élimination complète de l'agar et l'utilisation d'un milieu nutritif liquide permettra une réduction considérable du coût de la micropropagation. Le milieu nutritif liquide offre de nombreux avantages par rapport au milieu solidifié avec l'agar: (1) une réduction très importante du coût du milieu de culture, (2) une meilleur croissance des microboutures grâce à une meilleur disponibilité

des nutriments et de l'eau, (3) la dilution des exsudats des plantes et la réduction de l'effet délétère des toxines présent dans certains métabolites, (4) l'absence des impuretés de l'agar qui peuvent entraver la croissance des microboutures, (5) la possibilité de renouveler le milieu de culture sans changer le récipient, (6) la possibilité de stérilisation du milieu de culture avec microfiltration sans utilisation de l'autoclave, (7) un nettoyage plus facile des récipients, (8) des conditions de culture uniformes, (9) les vitroplants sont plus adaptés à l'acclimatation et à la photoautotrophie.

La micropropagation in vitro dans un milieu nutritif liquide commence à être utilisée dans le cas d'un certain nombre d'espèces ligneuses comme l'*Acacia nilotica* (Rathore et al. 2014) et le châtaignier (Cuenca et al. 2017).

L'enracinement et l'acclimatation sont deux phases cruciales qui présentent toujours des difficultés chez les espèces ligneuses. L'enracinement in vitro constitue l'étape la plus coûteuse et la plus délicate dans le procédé de micropropagation. Elle revient à 30% voire 75% du coût total des vitroplants (Ranaweera et al. 2013). Dans tous procédés de micropropagation de caroubier, les vitroplants sont enracinés in vitro. Au Maroc, des niveaux limités d'enracinement in vitro (44,5 et 60,3 %) et d'acclimatation (5 et 60%) ont été rapportés (Saidi et al. 2007; Radi et al. 2013). L'utilisation de la technique d'enracinement ex vitro offre de nombreux avantages par rapport à l'enracinement in vitro notamment, (1) une réduction importante du coût des vitroplants, (2) la réduction du temps de production des vitroplants, (3) une manipulation plus simple suite à l'élimination de la phase d'enracinement in vitro sous des conditions stériles, (4) la production d'un meilleur système racinaire ressemblant aux racines développées dans le système naturel, (5) une acclimatation plus facile avec une meilleure tolérance aux conditions de stress environnementales. Il n'existe à ce jour aucun travail portant sur l'enracinement ex vitro de vitroplants de caroubier.

### **3. Exposé de l'invention, avantages par rapport à l'état antérieur :**

La présente invention constitue un excellent moyen pour obtenir, en temps réduit, et d'une manière plus économique un grand nombre de vitroplants de caroubier de bonne qualité.

La présente invention fournit dans un premier temps un nouveau milieu nutritif, développé pour la première fois pour la micropropagation in vitro de caroubier. Le milieu nutritif développé contient les éléments essentiels pour la croissance des vitroplants de caroubier à des concentrations appropriées à cette espèce. Cependant, le milieu peut aussi être complété avec tout autre additif communément utilisé dans les milieux de culture in vitro comme les hydrates de carbone, les régulateurs de croissance, les acides aminés, les vitamines, le charbon actif, les tampons de pH, etc. Le milieu nutritif développé peut aussi être utilisé dans les autres techniques de la culture in vitro de caroubier comme la micropropagation par culture d'apex ou de bourgeons cotylédonaire, l'organogenèse et l'embryogenèse somatique. Ainsi, le milieu nutritif peut être complété avec des régulateurs de croissance spécifiques au type de réponse morphologique souhaité.

La présente invention décrit également un procédé de multiplication rapide et économique en utilisant un milieu nutritif liquide sans utilisation d'agent gélifiant. La méthode repose sur la mise en culture de la partie basale des microboutures de caroubier dans le milieu nutritif formulé sans agent gélifiant et contenant des régulateurs de croissance.

Les inventeurs ont également montré dans un deuxième temps qu'il était possible d'enraciner les microboutures multipliés par microbouturage in vitro d'une manière rapide et économique, en utilisant la technique d'enracinement ex vitro combiné à l'acclimatation des microboutures. La méthode repose sur un traitement des microboutures avec les auxines, dont la nature même et la concentration sont déterminantes, suivi de leur culture directe dans le substrat de culture.

Le procédé décrit dans la présente invention a été préparé pour une microproagation optimale des micropousses de caroubier, cependant, il n'est plus exclusive à cette espèce. Ainsi, la présente invention peut être également utilisée chez d'autres espèces, essentiellement les Leguminosae.

Selon l'invention, le milieu nutritif contient les éléments suivants :

	Concentration (mM)
$\text{NO}_3^-$	27.19-31.90
$\text{NH}_4^+$	12.13-17.00
$\text{PO}_4^{3-}$	0.59-3.57
$\text{SO}_4^{2-}$	0.88-1.23
$\text{Cl}^-$	5.98-7.48
$\text{K}^+$	15.92-20.39
$\text{Ca}^{2+}$	4.48-5.11
$\text{Na}^+$	0.44-0.60
$\text{Mg}^{2+}$	0.53-0.88
$\text{BO}_3^{3-}$	0.1-0.2
$\text{Mn}^{2+}$	0.10-0.13
$\text{Fe}^{2+}$	0.10-0.20
$\text{Zn}^{2+}$	0.03-0.09
$\text{Cu}^{2+}$	0.0001-0.0002
$\text{I}^-$	0.002-0.005
$\text{MoO}_4^{-2}$	0.001-0.002
$\text{Co}^{+2}$	0.0001-0.0002
EDTA	0.11-0.22
Myo-inositol	0.55-1.11
Acide nicotinique	0-0.004
Pyridoxine	0.0010-0.003
HCl	
Thiamine	0.0004-0.0019

Selon la présente invention, il est donc fourni un procédé simple, rapide et économique permettant la production de clones conformes au type du plant-mère de caroubier selon les étapes suivantes :

- (i) La multiplication in vitro de microboutures de caroubier dans un nouveau milieu nutritifs liquide sans utilisation d'agent gélifiant.
- (ii) L'enracinement des microboutures produites à partir de l'étape (i) en utilisant la technique de l'enracinement ex vitro combiné à l'acclimatation des microboutures.

Par micropropagation in vitro on entend la culture d'une partie de la plante à propager (cellules, tissus, cals, organes, parties d'organes, graines, embryons et similaires), dénommés explants, dans un milieu de culture nutritif artificiel et stérile. Ce milieu contient des éléments minéraux essentiels pour la croissance et le maintien des explants en plus des régulateurs de croissance qui déterminent l'expression et l'orientation morphogénétique. Les cultures sont maintenues dans des conditions de température et d'éclairage contrôlées.

Par microbouturage on entend une technique de micropropagation in vitro en utilisant comme explant des entrenœuds renfermant un bourgeon axillaire à l'aisselle d'une feuille et/ou des bourgeons et des méristèmes. C'est la technique la plus généralement appliquée en micropropagation des ligneux. Elle permet de régénérer dans de brefs délais, dans un espace réduit et indépendamment des saisons, des milliers de plantes entières conformes génétiquement à la plante mère et donc la formation rapide d'une population d'individus tous semblables que l'on appelle clone.

Par enracinement ex vitro on entend une induction et un développement racinaire combiné à l'acclimatation des plants issues de la phase de multiplication in vitro. Les microboutures sont d'abord traitées avec des auxines avant de les planter directement dans le substrat sous les conditions d'humidité, de température et de lumière contrôlées.

Par MS on entend le milieu nutritif de base de Murashige et Skoog.

Par BAP on entend le 6-benzylaminopurine

Par AIB on entend l'acide 4-(3-indolyl)-butyrique

Par ANA on entend l'acide 1-naphtalène acétique

La présente invention, comparés aux autres procédés de multiplication de caroubier, permet ce qui suit :

- Production à grande échelle de vitroplants uniformes conformes au type du plant-mère de caroubier avec plus d'efficacité et de productivité en un temps et un coût de production nettement réduits.
- Absence de certains désordres physiologiques comme la nécrose apicale, la production de cals dans la partie basale et l'hyperhydricité des microboutures.

- La stimulation de l'échange gazeux en utilisant le coton pour la fermeture des récipients de culture au lieu des couvercles et bouchons. Ceci permet d'obtenir les plantules, ayant des feuilles nettement plus larges et avec plus de chlorophylles que les plantules obtenues par les protocoles conventionnels.
- Production de microboutures plus adaptés à l'acclimatation grâce à l'utilisation du milieu nutritif liquide.
- Production d'un meilleur système racinaire saine et normal, ressemblant aux racines développées dans le système naturel, grâce à la technique de l'enracinement ex vitro.
- Une acclimatation plus facile avec une meilleure tolérance aux conditions de stress environnementales.
- Réduction des coûts de la main d'œuvre et des produits chimiques utilisés dans la préparation des milieux de cultures.
- Accélération des programmes de production de clones supérieurs, par une production à grande échelle de plants de qualité en moins de temps et d'espace.

Selon une caractéristique importante de l'invention, les microboutures sont trempées partiellement dans le milieu nutritif liquide développé. Le professionnel du métier pourra utiliser divers matières pour maintenir les microboutures (comme le coton hydrophile, la vermiculite, le papier filtre ou des graines de verre). Il pourra aussi utiliser le coton au lieu des couvercles et bouchons pour la fermeture des récipients. Le milieu de multiplication contient bien étendu des régulateurs de croissance favorisant le développement des pousses à partir des bourgeons. Une cytokinine, le BAP par exemple, seul ou en combinaison avec une auxine peut être utilisé en phase de prolifération des pousses. Le milieu de culture, le support, le récipient et le coton sont stérilisés pendant 20 min sous une température de 121°C. Les cultures sont maintenues dans une chambre de culture sous une température de 26°C ± 2 et une photopériode de 16h/jour.

Selon une autre caractéristique importante de l'invention, les micropousses multipliées sont trempées dans une auxine pour stimuler l'induction des racines puis cultivées dans un substrat préalablement stérilisé. Les cultures sont maintenues dans une chambre de culture à une température de 26°C ± 2 et une humidité optimale, qui sera progressivement réduite. Une fois les racines sont induites, les jeunes plantules sont transférées sous serre.

La présente invention permet de produire les microboutures de caroubier 5 fois plus rapidement que la méthode conventionnelle, en plus de la réduction du coût de production en utilisant le milieu non gélifié et la réduction de la main d'œuvre suite à l'élimination du stade d'enracinement in vitro.

La présente invention permettra d'avoir une croissance rapide et efficace des pousses et des racines et de produire des vitroplants sains avec un meilleur système racinaire et des taux de survie élevés.



**Exemple 1 :**

On donnera ci-après un exemple non limitatif de la préparation de milieu de multiplication:

**A. le milieu nutritif contient les éléments suivants :**

	Concentration (mM)
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	31.90
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	12.13
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	3.57
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	1.23
Cl <sup>-</sup>	5.98
K <sup>+</sup>	20.39
Ca <sup>2+</sup>	4.48
Na <sup>+</sup>	0.44
Mg <sup>2+</sup>	0.88
BO <sub>3</sub> <sup>3-</sup>	0.1
Mn <sup>2+</sup>	0.13
Fe <sup>2+</sup>	0.20
Zn <sup>2+</sup>	0.03
Cu <sup>2+</sup>	0.0001
I <sup>-</sup>	0.005
MoO <sub>4</sub> <sup>-2</sup>	0.001
Co <sup>+2</sup>	0.0001
EDTA	0.22
Myo-inositol	0.55
Acide nicotinique	0.004
Pyridoxine HCl	0.0010
Thiamine	0.0004

**B. Hydrates de carbone :**

30 g/l de saccharose

**C. Cytokinine**

1 mg/l de 6-benzylaminopurine

**D. Autres additifs**

1 g/l de charbon actif

Ce milieu a été comparé avec la méthode la plus communément utilisée pour le microbouturage de caroubier en utilisant le milieu de solide MS additionné de 7g/l de l'agar, en plus du milieu MS sans agar. Tous les milieux ont été supplémentés avec 30g/l de saccharose, 1mg/l de BAP et 1g/l de charbon actif. Les cultures ont été maintenues dans une chambre de culture sous une température de 26 ± 2 °C et une photopériode de 16h/ jour.

	Taille des micropousses (mm)	Taux de multiplication	Taux de nécrose apicale
Système conventionnelle avec MS solide	6.33	1.58	58.33
MS liquide	29.48	2.39	13.04
La présente formulation	54.79	5.60	0

Cet exemple montre que le milieu MS solide, qui est utilisé par défaut dans les protocoles de micropropagation de caroubier, n'est plus approprié à cette espèce. L'utilisation du milieu MS sans agar a permis d'avoir une nette amélioration dans la taille et le taux de multiplication des micropousses, cependant, le nouveau milieu formulé était le plus approprié au microbouturage de caroubier.

Dans cette exemple, le milieu formulé à permet d'obtenir des pousses avec une taille d'au moins 8,6 plus et un taux de production d'au moins 3,5 plus et que ceux obtenue avec la méthode conventionnelle utilisée pour le microbouturage de caroubier.

Le milieu utilisé a permis aussi de résoudre le problème de la nécrose apicale des micropousses. Ce problème a été déjà rapporté dans plusieurs protocoles de micropropagation de caroubier sur le milieu MS.

**Exemple 2 :**

On donnera ci-après un exemple non limitatif de préparation des microboutures pour l'enracinement ex-vitro et l'acclimatation :

Les microboutures multipliées in vitro sont excisées et rincées avec de l'eau distillée stérile. La partie basale est trempée dans une solution de 3g/l de l'acide 4-(3-indolyl)-butyrique puis implantées dans un mélange de 50% de tourbe et 50 % de sable. Les cultures sont maintenues dans la chambre de culture sous une température de  $26 \pm 2$  °C , une humidité de 90% et une photopériode de 16h/ jour. Les cultures sont arrosées deux fois par semaines avec une solution minérale riche en azote, phosphore et potassium. Après 28 jours, les pousses enracinées sont transférés sous serre.

Cette technique a été comparé avec la méthode conventionnelle de l'enracinement in vitro des micropousses de caroubier.

Dans cette exemple, un taux élevé d'enracinement a été obtenue (91.67%). Ce taux est 2 fois plus que celui obtenu avec la méthode conventionnelle de l'enracinement in vitro de caroubier.

La technique utilisée de l'enracinement ex vitro a aussi permis d'avoir un meilleur système racinaire ressemblant aux racines développées a l'état naturel, contrairement aux racines obtenues in vitro qui étaient épaisses et fragiles.

La technique utilisée a aussi permis de raccourcir la durée du processus de la micropropagation en éliminant l'étape de l'enracinement in vitro.

### Revendications

- 1- Un milieu de culture nutritif de base pour la micropropagation in vitro de caroubier contenant les éléments suivants :

	Concentration (mM)
$\text{CO}_3^{2-}$	27.19-31.90
$\text{NH}_4^+$	12.13-17.00
$\text{PO}_4^{3-}$	0.59-3.57
$\text{SO}_4^{2-}$	0.88-1.23
$\text{Cl}^-$	5.98-7.48
$\text{K}^+$	15.92-20.39
$\text{Ca}^{2+}$	4.48-5.11
$\text{Na}^+$	0.44-0.60
$\text{Mg}^{2+}$	0.53-0.88
$\text{BO}_3^{3-}$	0.1-0.2
$\text{Mn}^{2+}$	0.10-0.13
$\text{Fe}^{2+}$	0.10-0.20
$\text{Zn}^{2+}$	0.03-0.09
$\text{Cu}^{2+}$	0.0001- 0.0002
$\text{I}^-$	0.002-0.005
$\text{MoO}_4^{2-}$	0.001-0.002
$\text{Co}^{+2}$	0.0001- 0.0002
EDTA	0.11-0.22
Myo-inositol	0.55-1.11
Acide nicotinique	0-0.004
Pyridoxine HCl	0.0010-003
Thiamine	0.0004- 0.0019

2. un milieu de culture selon la revendication 1 qui contient additionnellement environ 3% de saccharose.

## Références citées

- Aranda-Peres AN, Peres LEP, Higashi EN, Martinelli AP (2009) Adjustment of mineral elements in the culture medium for the micropropagation of three *Vriesea bromeliads* from the Brazilian Atlantic Forest: the importance of calcium. *HortScience* 44:106–112.
- Cuenca B, Sánchez C, Aldrey A, et al (2017) Micropropagation of axillary shoots of hybrid chestnut (*Castanea sativa* × *C. crenata*) in liquid medium in a continuous immersion system. *Plant Cell, Tissue Organ Cult* 1–14.
- FAO (2016) FAOstat. URL <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. (accessed 13. 02. 18).
- Gamborg OL, Miller R, Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* 50:151–158.
- George EF, De Klerk GJ (2008) The components of plant tissue culture media I: macro-and micro-nutrients. In: George, EF, Hall MA, De Klerk GJ (eds) *Plant Propagation by Tissue Culture The background*. Springer, Dordrecht, pp 65-113.
- Gonçalves S, Correia PJ, Martins-Loução MA, Romano A (2005) A new medium formulation for in vitro rooting of carob tree based on leaf macronutrients concentrations. *Biol Plant* 49:277–280.
- Gresshoff PM, Doy CH (1972) Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum* (tomato). *Planta* 107:161–170.
- Lloyd G, McCown B, others (1980) Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Comb Proc Intern Plant Proc Soc* 30:421–427.
- Lozzi A, Abousalim A, Abdelwahd R (2015) Effet de 2, 4-D sur l'induction de l'embryogenèse somatique à partir de cotylédons matures de caroubier (*Ceratonia siliqua* L.). *Rev Marocaine des Sci Agron Vétérinaires* 3:24–29.
- Martin K (2003) Rapid in vitro multiplication and ex vitro rooting of *Rotula aquatica* Lour., a rare rhoeophytic woody medicinal plant. *Plant Cell Rep* 21:415–420.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473–497.
- Naghmouchi S, Khouja ML, Rejeb MN (2008) Effect of growth regulators and explant origin on in vitro propagation of *Ceratonia siliqua* L. via cuttings. 12:251–258.
- Radi A, Echchgadda G, Ibjibijen J, Rochd M (2013) In vitro propagation of Moroccan carob (*Ceratonia siliqua* L.). *J Food Agri Env* 11:1103–1107.
- Ranaweera KK, Gunasekara MTK, Eeswara JP (2013) Ex vitro rooting: A low cost micropropagation technique for Tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntz) hybrids. *Sci Hortic* 155:8–14.
- Rathore JS, Phulwaria M, Rai MK, et al (2015) Use of liquid culture medium and ex vitro rooting for micropropagation of *Acacia nilotica* (L.) Del. ssp. cupressiformis. *Indian J Plant Physiol* 20:172–176.
- Rathore JS, Rai MK, Phulwaria M, Shekhawat NS (2014) A liquid culture system for improved micropropagation of mature *acacia nilotica* (L.) Del. ssp. indica and ex vitro rooting. *Proc Natl Acad Sci India Sect B - Biol Sci* 84:193–200.
- Romano A, Barros S (2002) Micropropagation of the Mediterranean tree *Ceratonia siliqua*. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 35–41.
- Saidi R, Lamarti A, Badoc A (2007) Micropropagation du caroubier (*Ceratonia siliqua* L.) par culture de bourgeons axillaires issus de jeunes plantules. *Bull Soc Pharm* 146:113–129.
- Sebastian KT, McComb JA (1986) A micropropagation system for carob (*Ceratonia siliqua* L.). *Sci Hortic* 28:127–131.

3. Procédé pour la micropropagation in vitro de caroubier (*Ceratonia siliqua* L.) comprenant la prolifération de bourgeons axillaires par microbouturage dans un nouveau milieu nutritifs liquide préparé selon la revendication 1.

4. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que la multiplication in vitro des microboutures est réalisée en milieu nutritif liquide sans agent gélifiant, avec un trempage partiel de la partie basale des microboutures dans le milieu nutritifs contenant une cytokinine et /ou une auxine, sans ou avec support pour le maintien des explants si nécessaire. Les cultures sont maintenues à une température de  $26^{\circ}\text{C} \pm 2$  et sous une photopériode de 16h/jour ; la durée entre les subcultures est d'environ 28 jours.

5. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que la cytokinine appartient au groupe constitué du BAP, Kinétine, la Zéatine et de leurs mélanges.

6. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que l'auxine appartient au groupe constitué de l' AIB, AIA, ANA et de leurs mélanges.

7. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que le support utilisé consiste à un coton hydrophile, la vermiculite, le papier filtre ou tout support naturel ou synthétique.


8. Procédé pour l'enracinement des micropousses obtenues de la culture in vitro, par la technique de l'enracinement ex vitro combiné à l'acclimatation des micropousses.

9. Procédé selon la revendication 8, caractérisée en ce que les parties basales des micropousses obtenues de la culture in vitro sont trempées dans une auxine avant d'être implantées directement dans un substrats de culture stérile. Les cultures sont maintenues dans une chambre de culture pendant environ quatre semaines sous une température comprise entre 23 et 28 °C et une photopériode de 16h/jour avant d'être transféré sous une serre. Les cultures sont pulvérisés environ deux fois par semaine avec une solution nutritive riche en azote, phosphore et potassium.

10. Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que l'auxine appartient au groupe constitué de l'AIB, AIA, ANA et de leurs mélanges.

**RAPPORT DE RECHERCHE DEFINITIF AVEC OPINION SUR  
LA BREVETABILITE**

Établi conformément à l'article 43.2 de la loi 17-97 relative à la  
protection de la propriété industrielle telle que modifiée et complétée  
par la loi 23-13

<b>Renseignements relatifs à la demande</b>	
N° de la demande : 42316	Date de dépôt : 12/04/2018 ;
Déposant : INSTITUT AGRONOMIQUE ET VETERINAIRE HASSAN II	
Intitulé de l'invention : FORMULAIRE D'UN NOUVEAU MILIEU NUTRITIF DE BASE ET PROTOCOLE EFFICACE, RAPIDE ET ÉCONOMIQUE POUR LA MICROPROPAGATION IN VITRO DE CAROUBIER	
Classement de l'objet de la demande : CIB : C05F11/00, C12N 5/02, C12N5/00	
Le présent rapport contient des indications relatives aux éléments suivants :	
Partie 1 : Considérations générales	
<input checked="" type="checkbox"/> Cadre 1 : Base du présent rapport <input type="checkbox"/> Cadre 2 : Priorité	
Partie 2 : Opinion sur la brevetabilité	
<input type="checkbox"/> Cadre 3 : Remarques de clarté <input type="checkbox"/> Cadre 4 : Observations à propos de revendications modifiées qui s'étendent au-delà du contenu de la demande telle qu'initialement déposée <input type="checkbox"/> Cadre 5 : Défaut d'unité d'invention <input type="checkbox"/> Cadre 6 : Observations à propos de certaines revendications exclues de la brevetabilité <input checked="" type="checkbox"/> Cadre 7 : Déclaration motivée quant à la Nouveauté, l'Activité Inventive et l'Application Industrielle	
Examineur: Redouane TELLAA	Date d'établissement du rapport : 23/01/2019
Téléphone: (+212) 5 22 58 64 14	

**Partie 1 : Considérations générales****Cadre 1 : base du présent rapport**

Les pièces suivantes servent de base à l'établissement du présent rapport :

- Demande telle qu'initialement déposée
- Demande modifiée suite à la notification du rapport de recherche préliminaire :
- Revendications  
10
- Observations à l'appui des revendications maintenues
- Observations des tiers suite à la publication de la demande
- Réponses du déposant aux observations des tiers
- Nouveaux documents constituant des antériorités :
- Suite à la recherche complémentaire (Couvrant les documents de l'état de la technique qui n'étaient pas disponibles à la date de la recherche préliminaire)
  - Suite à la recherche additionnelle (couvrant les éléments n'ayant pas fait l'objet de la recherche préliminaire)
- Observations à l'encontre de la décision de rejet

**Partie 2 : Opinion sur la brevetabilité****Cadre 7 : Déclaration motivée quant à la Nouveauté, l'Activité Inventive et l'Application Industrielle**

Nouveauté	Revendications 1 - 10 Revendications aucune	Oui Non
Activité inventive	Revendications 1 - 10 Revendications aucune	Oui Non
Application Industrielle	Revendications 1 - 10 Revendications aucune	Oui Non

Il est fait référence aux documents suivants:

D1 : EP1404810

D2 : EP0829199

**1. Nouveauté**

Aucun document de l'art antérieur ne décrit un milieu nutritif tel que décrit dans la revendication 1 de la présente demande.



Par conséquent, l'objet des revendications 1-10 est nouveau au sens de l'article 26 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13.

## **2. Activité inventive**

Le document D1 est considéré comme l'état de la technique le plus proche de l'objet de la revendication 1 de la présente demande, il a pour objet un milieu de culture pour végétaux et cellules, tissus et organes végétaux renfermant une source d'azote organique et une source de phosphore sous forme d'ester phosphorique acide ou salifié.

L'objet de la revendication 1 de la présente demande diffère de D1 en ce que le milieu est destiné à la micro propagation in vitro de caroubier ainsi qu'il contient des constituants et des proportions différentes.

Le problème que la présente demande se propose de résoudre peut être considéré comme la fourniture d'un milieu alternatif pour la micro propagation in vitro de caroubier.

La solution proposée dans la revendication 1 de la présente demande implique une activité inventive pour les raisons suivantes :

Aucune incitation pour l'homme de métier n'existe dans les documents de l'art antérieur pour résoudre le problème ci-dessus en proposant la solution de la revendication 1, les tests 1 et 2 des pages 7-9 montrent que le problème a été résolu sur toute la portée revendiquée.

Par conséquent, l'objet des revendications 1-10 implique une activité inventive au sens de l'article 28 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13

## **3. Application industrielle**

L'objet de la présente invention est susceptible d'application industrielle au sens de l'article 29 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13, parce qu'il présente une utilité déterminée, probante et crédible.