

Optimization of a mature cotyledons-based *in vitro* culture system for embryogenic-callus induction in carob (*Ceratonia siliqua* L.)

Optimización de un sistema de cultivo *in vitro* basado en cotiledones maduros para la inducción de callos embriogénicos en algarrobo (*Ceratonia siliqua* L.)

Assia Lozzi^{1*}; Rabha Abdelwahd²; Driss Alami-Halimi¹; Rachid Mentag²; Abdelhadi Abousalim¹

¹Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Département Production, Protection et Biotechnologies Végétales, Laboratoire de la culture des tissus des végétaux. Rabat, Instituts-6654, Morocco.

²Institut National de la Recherche Agronomique, Centre Régional de la Recherche Agronomique, Unité de la Biotechnologie. Rabat- 415, Morocco.

*Corresponding author: assia.lozzi@gmail.com; tel.: +212694954208.

Abstract

Introduction: The carob tree (*Ceratonia siliqua* L.) is one of the most important plant species cultivated in the Mediterranean area. The species is in high market demand, but traditional propagation methods have not been able to satisfy it. Therefore, the use of *in vitro* techniques seems appropriate for the establishment of large-scale carob orchards.

Objectives: To assess the effects of five carob genotypes on embryogenic-calli induction and to optimize culture medium composition for better growth.

Materials and methods: The mature seeds of *C. siliqua* of the variety “Dkar”, which grow in five regions of Morocco, were used as sources of explants of cotyledons. Five genotypes (‘GH’, ‘GO’, ‘GM’, ‘GA’, and ‘GB’) and four culture media (MS, B5, WPM and DKW) supplemented with three 2,4-D concentrations (2.5, 5 and 10 µM) were evaluated in this study. Sucrose and mannitol were also tested at different concentrations (0, 45, 90, 135 and 180 µM).

Results and discussion: All the tested genotypes showed high callus induction levels (75 to 100 %). The Gamborg medium (B5) supplemented with 2.5 µM 2,4-D produced the highest dry weight (32.5 g) of creamy white calli. The highest amount of friable creamy-white calli was obtained in the medium supplemented with 90 mM of sucrose. Histological analysis showed the presence of meristematic centers that became embryogenic masses and globular proembryos.

Conclusion: Mature cotyledons of *C. siliqua* have potential for induction and proliferation of embryonic callus. This study aims to contribute to developing an appropriate protocol for mass propagation of carob.

Resumen

Introducción: El algarrobo (*Ceratonia siliqua* L.) es una de las especies cultivadas más importantes en el área mediterránea. La especie tiene alta demanda en el mercado, pero los métodos tradicionales de propagación no han logrado satisfacerla; por tanto, el uso de técnicas *in vitro* parece apropiado para el establecimiento de huertos a gran escala.

Objetivos: Evaluar los efectos de cinco genotipos de algarrobo en la inducción de callos embrionarios y optimizar la composición del medio de cultivo para un mejor crecimiento.

Materiales y métodos: Las semillas maduras de *C. siliqua* de la variedad “Dkar”, que crecen en cinco regiones de Marruecos, se utilizaron como fuentes de explantes de cotiledones. Se evaluaron cinco genotipos (‘GH’, ‘GO’, ‘GM’, ‘GA’, y ‘GB’) y cuatro medios de cultivo (MS, B5, WPM y DKW) suplementados con tres concentraciones de auxina 2,4-D (2.5, 5 y 10 µM). La sacarosa y el manitol se analizaron en concentraciones de 0, 45, 90, 135 y 180 µM.

Resultados y discusión: Los genotipos mostraron niveles altos de inducción de callo (75 a 100 %). El medio Gamborg (B5) suplementado con 2.5 µM 2,4-D produjo el mayor peso seco (32.5 g) de callos con coloración blanco cremoso. La mayor cantidad de callos friables de color blanco cremoso se obtuvo en el medio suplementado con 90 mM de sacarosa. El análisis histológico mostró la presencia de centros meristemáticos que se convirtieron en masas embriogénicas y proembriones globulares.

Conclusión: Los cotiledones maduros de *C. siliqua* tienen potencial para la inducción y proliferación de callos embrionarios. Este estudio pretende contribuir al desarrollo de un protocolo apropiado para la propagación masiva de algarrobo.

Keywords: Fabaceae; genotype; mineral nutrients; sucrose; histological study.

Palabras clave: Fabaceae; genotipo; nutrientes minerales; sacarosa; estudio histológico.

Introduction

The carob tree (*Ceratonia siliqua* L., Fabaceae) is one of the most important plant species in the Mediterranean region. It is noted for its high capacity to adapt to different drought stress conditions. The economic importance of this species arises from the industrial use of the locust bean gum extracted from its seeds, which is widely used as a natural additive (E-410) in the food industry to function as a stabilizer, thickener, and flavorant (El Bouzdoudi et al., 2017; Fadel et al., 2011). The worldwide production of carob is about 156 800 t·year⁻¹. The main producers are Portugal (25.46 %), Italy (18.24 %), Spain (16.51 %) Morocco (13.89 %), and Turkey (8.45 %) (FAO, 2016). It was also successfully introduced in other Mediterranean-like regions such as the southern United States, Mexico, Chile, Argentina and southern Australia (Benković et al., 2016).

As traditional carob propagation methods have failed to meet market demand, the use of *in vitro* techniques seems appropriate to fulfill the increased demand for plant material (Shahzad, Akhtar, Bukhari, & Perveen, 2017). One of the methods to develop a reproducible system for plantlet regeneration is through callus, which is also considered the most suitable material for somatic embryogenesis, genetic transformation and production of secondary metabolites (Azeez et al., 2017; Mujib, Ali, Tonk, & Zafar, 2017; Reyes-Díaz, Arzate-Fernández, Piña-Escutia, & Vázquez-García, 2017). The efficiency of callus induction is related to plant material (explants and genotypes) and culture medium composition (salt composition, plant growth regulators and carbohydrates). The most widely used explants for callus induction, in *C. siliqua* as well as other species, are immature embryos and cotyledons (Canhoto, Rama, & Cruz, 2006; Custodio & Romano, 2006). This material is laborious to obtain and available only during a very short period of the plant growth cycle. Callus induction from mature seed cotyledons has been successfully achieved in our previous experiments (Lozzi, Abousalim, & Abdelwahd, 2015). This material has the advantage of being easily excised and readily available throughout the year. Furthermore, cotyledon-derived calli from mature seeds are considered a suitable starting material of undifferentiated cells for *in vitro* regeneration into fertile plants (Din et al., 2016).

Like other woody plants, carob is difficult to propagate under *in vitro* conditions and only some success has been achieved so far. Although there are a few reports on embryonic callus induction in *C. siliqua* (Canhoto et al., 2006; Custodio & Romano, 2006; Ksia et al., 2008; Lozzi et al., 2015), all previous studies have concentrated on the influence of plant growth regulators, and little, if anything, is known about the effect of genotype, mineral nutrients and carbohydrates on callus induction in this

Introducción

El árbol de algarrobo (*Ceratonia siliqua* L., Fabaceae) es una de las especies más importantes de la región mediterránea y destaca por su alta capacidad de adaptación a condiciones de estrés por sequía. La importancia económica de esta especie proviene del uso industrial de la goma extraída de sus semillas, que se usa ampliamente como aditivo natural (E-410) en la industria alimentaria como estabilizador, espesante y saborizante (El Bouzdoudi et al., 2017; Fadel et al., 2011). La producción mundial de algarrobo es de aproximadamente 156 800 t·año⁻¹. Los principales productores son: Portugal (25.46 %), Italia (18.24 %), España (16.51 %) Marruecos (13.89 %) y Turquía (8.45 %) (FAO, 2016). También se introdujo con éxito en otras regiones mediterráneas como en el sur de Estados Unidos, México, Chile, Argentina y el sur de Australia (Benković et al., 2016).

Los métodos tradicionales de propagación de algarrobo no han logrado satisfacer la demanda del mercado, por ello, el uso de técnicas *in vitro* para cubrir la demanda alta de material vegetal parece adecuado (Shahzad, Akhtar, Bukhari, & Perveen, 2017). Uno de los métodos para desarrollar un sistema reproducible para la regeneración de plántulas es mediante el callo, que también se considera el material más adecuado para embriogénesis somática, transformación genética y producción de metabolitos secundarios (Azeez et al., 2017; Mujib, Ali, Tonk, & Zafar, 2017; Reyes-Díaz, Arzate-Fernández, Piña-Escutia, & Vázquez-García, 2017). La eficiencia de la inducción de callos está relacionada con material vegetal (explantes y genotipos) y la composición del medio de cultivo (composición de sal, reguladores de crecimiento de las plantas y carbohidratos). En *C. siliqua* como en otras especies, los explantes más utilizados para la inducción de callos son los embriones y cotiledones inmaduros (Canhoto, Rama, & Cruz, 2006; Custodio & Romano, 2006); sin embargo, la obtención de este material es laboriosa y solo está disponible durante un periodo muy corto del ciclo de crecimiento de la planta. Por otra parte, la inducción de callos a partir de cotiledones de semillas maduras se ha logrado con éxito en experimentos anteriores (Lozzi, Abousalim, & Abdelwahd, 2015). Este material tiene la ventaja de extraerse fácilmente y estar disponible durante todo el año. Además, los callos derivados de cotiledones provenientes de semillas maduras se consideran un material inicial adecuado de células no diferenciadas para la regeneración *in vitro* de plantas fértiles (Din et al., 2016).

Al igual que otras plantas leñosas, el algarrobo es difícil de propagar en condiciones *in vitro* y hasta ahora solo se ha logrado cierto éxito. Aunque existen algunos reportes sobre la inducción de callos embrionarios en

plant. Mineral composition of the culture medium is one of the most important factors governing plant growth and morphogenesis (George & De Klerk, 2008; Kim, Gopal, & Sivanesan, 2017). Murashige and Skoog (MS) (Murashige & Skoog, 1962) medium (developed for optimal growth of tobacco callus) is the most widely used in carob as in other plant species (Canhoto et al., 2006; George & de Klerk, 2008). However, this medium is not optimal for all plant tissues (Varshney & Anis, 2014). Carbohydrates are another major component of tissue culture media (Khorsha, Alizadeh, & Mashayekhi, 2016). Sucrose is the most widely used carbon source due to its highly favorable effect on growth and relatively low cost (Sumaryono, Wirdhatul, & Ratnadewi, 2012). All studies on carob have used sucrose as the carbon source at a concentration of 81 mM. However, it has been reported that the *optimum concentration* of sucrose differs among plant species (Thorpe et al., 2008). Mannitol is a naturally occurring 6-carbon sugar alcohol that is widely used in plant tissue culture as an osmotic agent to modify the water potential of a culture medium (Tholalakabavi, Zwiazek, & Thorpe, 1994). This carbohydrate has been applied successfully in several plant species such as in *Cucumis sativus* L. (Lou & Kako, 1995), *Cucumis melo* L. (Nakagawa et al., 2001), *Phoenix dactylifera* L. (Shibli, Subaih, & Abdelrahman, 2005), and *Olea europaea* L. to increase the efficiency of callus induction and somatic embryogenesis (Brhadda, Walali, & Abousalim, 2008).

In this context, the aim of this study was to assess the effects of five genotypes of *C. siliqua* on callus induction and to optimize culture medium composition for better growth of embryonic callus. This in order to provide baseline information for the development of an appropriate protocol of interest for mass propagation of carob via somatic embryogenesis. Histological analysis of induced calli and differentiated structures are also considered in this study.

Materials and methods

Plant material

Mature seeds of selected *C. siliqua* trees of the productive variety “Dkar” growing in five regions of Morocco were used as sources of cotyledonary explants (Table 1).

Preparation of explants

Accessions were stored at 5 °C throughout the experimental period. Seeds were treated with concentrated sulfuric acid (98 %) for 60 min, washed with sterile water 3-4 times and then soaked in sterile distilled water for 24 h. Cotyledons were aseptically

C. siliqua (Canhoto et al., 2006; Custodio & Romano, 2006; Ksia et al., 2008; Lozzi et al., 2015), los estudios se han concentrado en la influencia de reguladores de crecimiento y se sabe poco sobre el efecto del genotipo, nutrientes minerales y carbohidratos en la inducción de callos en esta planta. La composición mineral del medio de cultivo es uno de los factores más importantes que rigen el crecimiento de las plantas y la morfogénesis (George & De Klerk, 2008; Kim, Gopal, & Sivanesan, 2017). El medio Murashige y Skoog (MS) (Murashige & Skoog, 1962), desarrollado para el crecimiento óptimo del callo del tabaco es el más utilizado en el algarrobo y en otras plantas (Canhoto et al., 2006; George & de Klerk, 2008); sin embargo, no es el óptimo para todos los tejidos vegetales (Varshney & Anis, 2014). Los carbohidratos son otro componente importante para los medios de cultivo de tejidos (Khorsha, Alizadeh, & Mashayekhi, 2016); la sacarosa es la fuente de carbono más utilizada, debido a su efecto altamente favorable en el crecimiento y su costo relativamente bajo (Sumaryono, Wirdhatul, & Ratnadewi, 2012). Todos los estudios en algarrobo han usado sacarosa como fuente de carbono en una concentración de 81 mM; sin embargo, la concentración óptima difiere entre las especies de plantas (Thorpe et al., 2008). El manitol es un alcohol de azúcar de seis carbonos de origen natural que se usa ampliamente en el cultivo de tejidos vegetales como agente osmótico, para modificar el potencial hídrico de un medio de cultivo (Tholalakabavi, Zwiazek & Thorpe, 1994). Este carbohidrato ha sido aplicado exitosamente en varias especies de plantas como *Cucumis sativus* L. (Lou & Kako, 1995), *Cucumis melo* L. (Nakagawa et al., 2001), *Phoenix dactylifera* L. (Shibli, Subaih, & Abdelrahman, 2005) y *Olea europaea* L., para aumentar la eficacia de la inducción de callos y la embriogénesis somática (Brhadda, Walali, & Abousalim, 2008).

En tal contexto, el objetivo de este estudio fue evaluar los efectos de cinco genotipos de *C. siliqua* en la inducción de callos y optimizar la composición del medio de cultivo para un mejor crecimiento del callo embrionario. Esto con el fin de proporcionar información de referencia para el desarrollo de un protocolo apropiado de propagación masiva de algarrobos por embriogénesis somática. En este estudio también se consideró el análisis histológico de callos inducidos y las estructuras diferenciadas.

Materiales y métodos

Material vegetal

Las semillas maduras de los árboles seleccionados de *C. siliqua* de la variedad productiva “Dkar”, que crecen en cinco regiones de Marruecos, se utilizaron como fuentes de explantes de cotiledones (Cuadro 1).

Table 1. Geographic origin of Moroccan carob (*Ceratonia siliqua*) trees used in this study.**Cuadro 1. Origen geográfico de los árboles de algarroba marroquí (*Ceratonia siliqua*) utilizados en este estudio.**

Regions/ Regiones	Code/ Código	Geographic region/ Región geográfica	Latitude/ Latitud	Longitude/ Longitud	Elevation (m)/ Altura (m)
El Hoceima	GH	North coastal/Costa norte	35° 11'	3° 57'	50-250
Ouazzane	GO	Rif mountain/Montaña Rif	34° 58'	5° 29'	170-230
Marrakech	GM	High Atlas mountain/Alto atlas	31° 37'	7° 00'	700-1000
Azilal	GA	Middle Atlas mountain/ Atlas medio	32° 12'	6° 28'	400-700
Bni Mellal	GB	Middle Atlas mountain/ Atlas medio	32° 30'	6° 03'	500-800

excised. The endosperm and the embryo axis were removed, and each cotyledon was transversely segmented into four portions of 4-6 mm in length. The explants were placed with the abaxial surface in contact with the culture medium.

Callus initiation medium and culture conditions

For callus initiation, explants were cultured in 90 mm-diameter Petri dishes containing 20 mL of MS medium supplemented with 90 mM sucrose and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) at the optimal concentration reported in our prior study (10 μ M) (Lozzi et al., 2015). Medium was solidified with 0.7 % agar (SIGMA) and the pH was adjusted to 5.8 with 1 M NaOH before autoclaving at 121 °C for 20 min.

Explants of the five carob genotypes were cultivated on callus initiation medium to test their callogenesis capacities. The genotypes showing the best callogenesis response were grown on four culture media: MS, Gamborg (B5) (Gamborg, Miller, & Ojima, 1968), Woody Plant Medium (WPM) (Lloyd & McCown, 1980) and Driver and Kuniyuki (DKW) (Driver & Kuniyuki, 1984) supplemented with three 2,4-D doses (2.5, 5, 10 μ M). Combinations of sucrose and mannitol (0, 45, 90, 120, and 180 mM) were also compared.

Cultures were maintained completely in the dark in the culture room at 25 \pm 2 °C for five weeks. Callus samples of known fresh mass were dried to constant weight in an oven set at 60 °C for 24 h. The morphology was observed using a stereomicroscope (SZ2-ILST, Olympus, Japan).

Histological analysis

For histological examination, callus was fixed for at least 24 hours in Formaldehyde–Acetic acid– Ethanol (5:5:90/v:v:v) mixture, dehydrated in ethanol-butanol series and embedded in paraffin wax as described by Cob-Uicab et al. (2011). Sections (7 μ m) were cut using a rotary microtome (Leica) and stained with 0.05 %

Preparación de explantes

Las accesiones se almacenaron a 5 °C durante el periodo experimental. Las semillas se trataron con ácido sulfúrico concentrado (98 %) durante 60 min, se lavaron con agua estéril tres a cuatro veces y, posteriormente, se sumergieron en agua destilada estéril durante 24 h. Los cotiledones se extirparon asépticamente. Se quitó el endospermo y el eje del embrión, y cada cotiledón se segmentó transversalmente en cuatro porciones de 4 a 6 mm de longitud. Los explantes se colocaron con la superficie abaxial en contacto con el medio de cultivo.

Medio de iniciación del callo y condiciones del cultivo

Para la iniciación del callo, los explantes se cultivaron en placas de Petri de 90 mm de diámetro, las cuales contenían 20 mL de medio MS suplementado con 90 mM de sacarosa y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) a la concentración óptima reportada en nuestro estudio anterior (10 μ M) (Lozzi et al., 2015). El medio se solidificó con agar a 0.7 % (SIGMA) y el pH se ajustó a 5.8 con 1 M de NaOH antes de su esterilización en autoclave a 121 °C durante 20 min.

Los explantes de los cinco genotipos de algarrobo se cultivaron en un medio de iniciación de callos para analizar sus capacidades de callogénesis. Los genotipos que mostraron la mejor respuesta de callogénesis se cultivaron en cuatro medios de cultivo: MS, Gamborg (B5) (Gamborg, Miller & Ojima, 1968), Woody Plant Medium (WPM) (Lloyd & McCown, 1980) y Driver y Kuniyuki (DKW) (Driver & Kuniyuki, 1984), suplementados con tres dosis de 2,4-D (2.5, 5 y 10 μ M). También se compararon combinaciones de sacarosa y manitol (0, 45, 90, 120 y 180 mM).

Los cultivos se mantuvieron completamente en la oscuridad en el cuarto de cultivo a 25 \pm 2 °C durante cinco semanas. Las muestras de callos de masa fresca conocida se secaron hasta peso constante en un horno a 60 °C durante 24 h. La morfología se observó utilizando un estereomicroscopio (SZ2-ILST, Olympus, Japón).

Toluidine blue O. The sections were dried and observed under a Euromex ZE-1657 stereomicroscope.

Statistical analysis

A completely randomized factorial design was used in this study. The results were expressed as means \pm standard deviation calculated from three independent experiments, each consisting of at least 16 explants. The data obtained were analyzed statistically by analysis of variance (ANOVA) for the three repeated measures using SPSS software, V. 21 (SPSS, 2012) and differences among means were evaluated by Duncan's multiple range test ($P = 0.05$). Percentage data were transformed to arcsin before analysis.

Results

Mature cotyledons started to swell after one week in the callus induction medium. During the second week of culture, calli started to emerge mainly from the cut ends of explants that were not in contact with the medium (Figure 1). According with Table 2 the five genotypes induced a high rate of callus (75 to 100 %) and, genotypic differences in dry weight were observed. The highest values were recorded in 'GH', 'GM' and 'GB' calli. With regard to callus color, 'GB' produced a higher creamy-white biomass (27.3 mg), whereas the other genotypes produced mainly creamy-brown callus. Thus, this genotype was used in the subsequent experiments. Some explants from 'GH', 'GM' and 'GB' genotypes showed root initiation (2 - 6.7 %) from induced calli.

Análisis histológico

Para el examen histológico, el callo se fijó durante al menos 24 horas en una mezcla de formaldehído-ácido acético-etanol (5:5:90/v:v:v) y se deshidrató en series de etanol-butanol; posteriormente, se incluyó en cera de parafina como lo describe Cob-Uicab et al. (2011). Las secciones (7 μ m) se cortaron utilizando un microtomo rotatorio (Leica) y se tiñeron con 0.05 % de azul de toluidina O, después se secaron y se observaron bajo un estereomicroscopio Euromex ZE-1657.

Análisis estadístico

En este estudio se utilizó un diseño completamente al azar con arreglo factorial. Los resultados se expresaron como medias \pm desviación estándar, calculadas a partir de tres experimentos independientes, cada uno con al menos 16 explantes. Los datos se analizaron estadísticamente mediante un análisis de varianza (ANOVA) para las tres medidas repetidas utilizando el software SPSS, V. 21 (SPSS, 2012) y las diferencias entre las medias se evaluaron mediante la prueba de rangos múltiples de Duncan ($P = 0.05$). Los datos porcentuales se transformaron con la función arcoseno antes del análisis.

Resultados

Los cotiledones maduros comenzaron a hincharse después de una semana en el medio de inducción de callos. Durante la segunda semana de cultivo, los callos comenzaron a surgir principalmente de los extremos cortados de los explantes que no estuvieron

Table 2. Callus induction from mature cotyledons of five different genotypes of *Ceratonia siliqua* after five weeks in Murashige and Skoog medium supplemented with 10 μ M of 2,4-D.

Cuadro 2. Inducción de callos a partir de cotiledones maduros de cinco genotipos de *Ceratonia siliqua* después de cinco semanas en medio Murashige y Skoog suplementado con 10 μ M de 2,4-D.

Genotype/ Genotipo	Callus induction (%)/ Inducción de callo (%)	Callus dry weight (mg)/ Peso seco del callo (mg)	Callus color/ Color del callo	Morphology/ Morfología	Root induction (%)/ Inducción de la raíz (%)
GH	100 \pm 0	26.5 \pm 3.0a	Creamy-Brown/ Café cremoso	Compact/ Compacto	6.7 \pm 4.4
GO	100 \pm 0	16.5 \pm 1.1bc	Creamy-White/ Blanco cremoso	Compact/ Compacto	0.0
GM	75 \pm 6.9	24.9 \pm 3.5a	Creamy-Brown/ Café cremoso	Compact/ Compacto	4.2 \pm 6.3
GA	87.5 \pm 4.2	21.6 \pm 3.5ab	Creamy-Brown/ Café cremoso	Compact/ Compacto	0.0
GB	100 \pm 0	27.3 \pm 5.3a	Creamy-White/ Blanco cremoso	Compact/ Compacto	2.0 \pm 2.2

GH = El Hoceima, GO = Ouazzane, GM = Merrakech, GA = Azilal, GB = Elksiba. Mean values followed by the same letters are not significantly different from each other according to Duncan's Multiple Range Test ($P = 0.05$).

GH = El Hoceima, GO = Ouazzane, GM = Merrakech, GA = Azilal, GB = Elksiba. Los valores medios seguidos por las mismas letras no son significativamente diferentes entre sí de acuerdo con la prueba de rango múltiple de Duncan ($P = 0.05$).

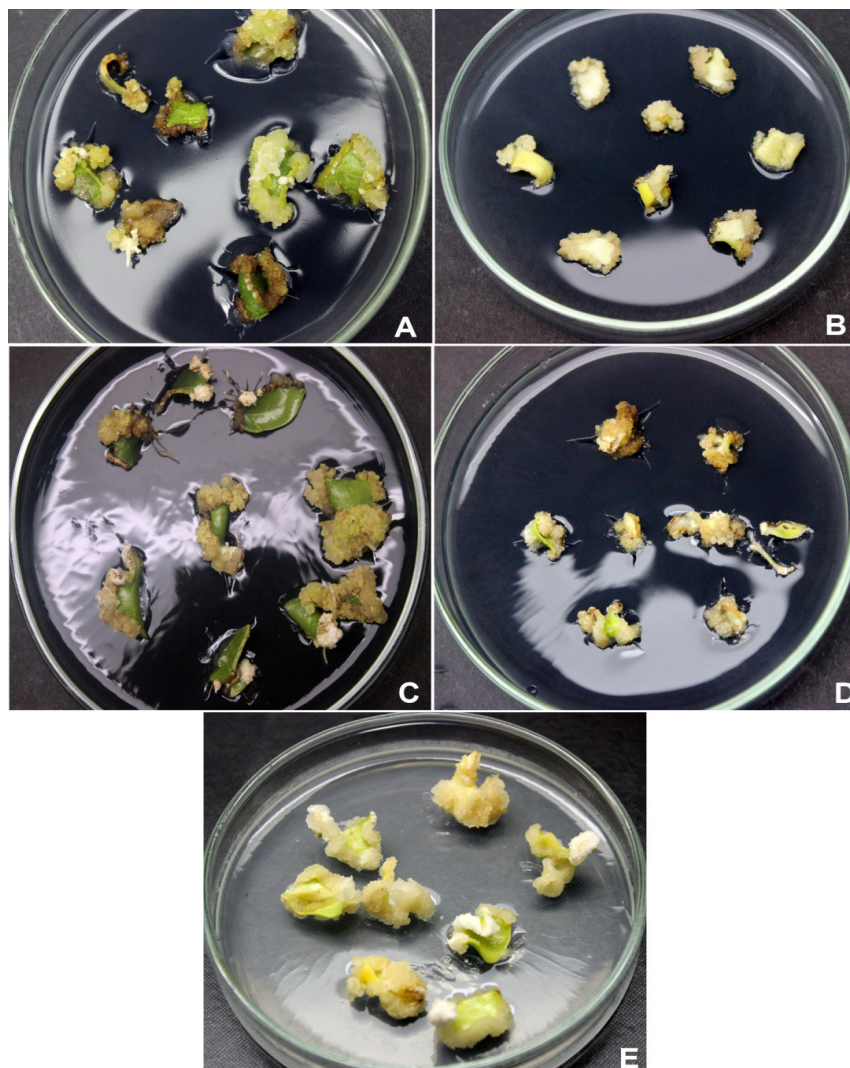


Figure 1. Callus induction from mature cotyledons of five genotypes (A = El Hoceima, B = Ouazzane, C = Merrakech, D = Azilal, E = Elksiba) of *Ceratonia siliqua* after five weeks in Murashige and Skoog medium supplemented with 10 μM of auxin 2,4-D.

Figura 1. Inducción de callos a partir de cotiledones maduros de cinco genotipos (A = El Hoceima, B = Ouazzane, C = Merrakech, D = Azilal, E = Elksiba) de *Ceratonia siliqua* después de cinco semanas en medio Murashige y Skoog suplementado con 10 μM de auxina 2,4-D.

According to Table 3, the experiment designed to compare basal media showed that explants were able to induce calli on all tested salt compositions. Noticeably, only B5 and WPM media permitted the development of friable calli, but WPM scored the lowest dry weights for all auxin concentrations tested. Maximum increase in dry weight (39.1 mg) was recorded when B5 medium supplemented with 10 μM 2,4-D was used, whereas there were no significant differences with lower concentrations. With the same medium, creamy-white calli were obtained with 2.5 μM 2,4-D and higher concentrations turned the calli color to brown (Table 3). With regard to root induction, there was a significant interaction ($P \leq 0.001$) between salt media and 2,4-D concentration. MS medium

en contacto con el medio (Figura 1). Acorde con el Cuadro 2, los cinco genotipos produjeron una tasa alta de callos (75 a 100 %) y se observaron diferencias genotípicas en peso seco; los valores más altos se registraron en los callos 'GH', 'GM' y 'GB'. Con respecto al color del callo, 'GB' produjo una mayor biomasa de color blanco cremoso (27.3 mg), mientras que los otros genotipos produjeron principalmente callos de color café cremoso. En consecuencia, el genotipo 'GB' fue utilizado en los experimentos posteriores. Algunos explantes de los genotipos 'GH', 'GM' y 'GB' mostraron iniciación de raíz (2 a 6.7 %), a partir de callos inducidos.

De acuerdo con el Cuadro 3, el experimento diseñado para la comparación de medios basales mostró que los

Table 3. Effect of culture medium and 2,4-D on callus formation of *Ceratonia siliqua* after five weeks in the induction medium.**Cuadro 3. Efecto del medio de cultivo y la concentración 2,4-D en la formación de callos de *Ceratonia siliqua* después de cinco semanas en el medio de inducción.**

Culture medium/ Medios de cultivo	2,4-D (μ M)	Callus induction (%)/ Inducción de callo (%)	Callus dry weight (mg)/ Peso seco de callo (mg)	Color	Morphology/ Morfología	Root induction (%)/ Inducción de raíz (%)
MS	2.5	100	15.5 \pm 2.2 ef	Creamy-White/ Blanco cremoso	Compact	40.0 \pm 2.32 a
MS	5	100	16.2 \pm 8.9 ef	Creamy-White/ Blanco cremoso	Compact	11.1 \pm 0.32 b
MS	10	100	24 \pm 3.4 cde	Creamy-White/ Blanco cremoso	Compact	0.0b
WPM	2.5	100	9.8 \pm 5.1 f	Creamy-White/ Blanco cremoso	Friable	2.3 \pm 1.6 b
WPM	5	100	14.2 \pm 5.0 ef	Creamy-Brown/ Café cremoso	Friable	4.2 \pm 0.48 b
WPM	10	100	15.6 \pm 1.9 ef	Creamy-Brown/ Café cremoso	Friable	0.0 b
DKW	2.5	100	22.2 \pm 5.3 de	Creamy-White/ Blanco cremoso	Compact	0.0 b
DKW	5	100	24.3 \pm 5.8 cde	Creamy-White/ Blanco cremoso	Compact	5.6 \pm 0.32 b
DKW	10	100	27.8 \pm 6.1 bcd	Creamy-White/ Blanco cremoso	Compact	0.0 b
B5	2.5	100	32.5 \pm 5.3 abc	Creamy-White/ Blanco cremoso	Friable	0.0 b
B5	5	100	34.2 \pm 6.9 ab	Creamy-Brown/ Café cremoso	Friable	0.0 b
B5	10	100	39.1 \pm 4.5 a	Brown/Café	Friable	0.0 b
Significance of differences in two-way ANOVA/Significancia de diferencias en ANOVA de dos vías						
Medium/Medio		NS	$P \leq 0.0001$			$P \leq 0.0001$
	2,4-D	NS	$P \leq 0.05$			$P \leq 0.001$
Medium \times 2,4-D/ Medio \times 2,4-D		NS	NS			$P \leq 0.0001$

Means followed by the same letters are not significantly different from each other according to Duncan's Multiple Range Test. Culture medium: Murashige and Skoog (MS), Gamborg (B5), Woody Plant Medium (WPM) and Driver and Kuniyuki (DKW). Auxin 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid)

Medias seguidas por las mismas letras no son significativamente diferentes entre sí, según la prueba de rango múltiple de Duncan ($P = 0.05$). Medios de cultivo: Murashige y Skoog (MS), Gamborg (B5), Woody Plant Medium (WPM) y Driver y Kuniyuki (DKW). Auxina 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético).

containing 2.5 μ M 2,4-D showed the highest rate root induction (40 %), which declined significantly with the increase of the 2,4-D concentration. No roots developed on B5 medium.

For the carbohydrate combination experiment, all explants induced calli when B5 medium was supplemented with various concentrations of sucrose, regardless of the presence of mannitol (Figure 2). On the other hand, no callus was induced with mannitol

explantes fueron capaces de inducir callos en todas las composiciones de sal analizadas. Cabe destacar que solo los medios B5 y WPM permitieron el desarrollo de callos friables, pero WPM obtuvo los pesos secos más bajos para todas las concentraciones de auxina analizadas. El aumento máximo en peso seco (39.1 mg) se registró cuando se utilizó el medio B5 suplementado con 10 μ M de 2,4-D, mientras que no hubo diferencias significativas con las concentraciones más bajas. Con el mismo medio, se obtuvieron callos de color blanco

alone even after five weeks. Generally, the calli formed were creamy-white and friable. Sucrose concentration significantly ($P \leq 0.05$) affected the callus dry weight with the highest result (38.4 mg) in the presence of 90 mM sucrose and in the absence of mannitol; consequently, the lowest weights were recorded in all media supplemented with mannitol.

Histological observations of the friable creamy-white calli showed the formation of meristematic centers with isodiametric cells, smaller than surrounding cells, having densely stained cytoplasm and nucleus and undergoing anticlinal and periclinal divisions (Figure 3a). After four weeks of culture, small embryogenic masses and globular proembryos were seen on the surface of the calli (Figure 3b). Histological examinations also showed the development of roots with vascular bundles in some induced calli.

Discussion

This research evaluated the effect of five genotypes of explants and culture medium composition (mineral nutrients, 2,4-D and carbohydrate concentrations) on callus induction and proliferation from mature cotyledons of *C. siliqua*. This plant material has the advantage of being easily excised and available throughout the year.

Studies report that callus proliferation is genotype dependent. This dependency was seen in *Castanea*

cremoso con 2.5 μM de 2,4-D y se observó que las concentraciones más altas de 2,4-D cambiaron el color a café. Con respecto a la inducción de la raíz, hubo interacción significativa ($P \leq 0.001$) entre los medios salinos y la concentración 2,4-D. El medio MS con 2.5 μM de 2,4-D mostró la tasa más alta de inducción de la raíz (40 %), la cual disminuyó significativamente con el aumento de la concentración de 2,4-D. No se desarrollaron raíces con el medio B5.

En el experimento de combinación de carbohidratos, todos los explantes produjeron callos cuando el medio B5 se complementó con varias concentraciones de sacarosa, independientemente de la presencia de manitol (Figura 2). En contraste, no hubo inducción de callo cuando únicamente se utilizó manitol, incluso después de cinco semanas. En general, los callos formados fueron friables y de color blanco cremoso. La concentración de sacarosa afectó significativamente ($P \leq 0.05$) el peso seco del callo, con el resultado más alto (38.4 mg) en presencia de 90 mM de sacarosa y en ausencia de manitol; en consecuencia, los pesos más bajos se registraron en todos los medios suplementados con manitol.

Las observaciones histológicas de los callos friables de color blanco cremoso mostraron la formación de centros meristemáticos con células isodiamétricas más pequeñas que las células circundantes, con núcleo y citoplasma densamente teñido, y con división anticlinal y periclinal (Figura 3a). Después de cuatro semanas de cultivo, se observaron pequeñas masas embriogénicas

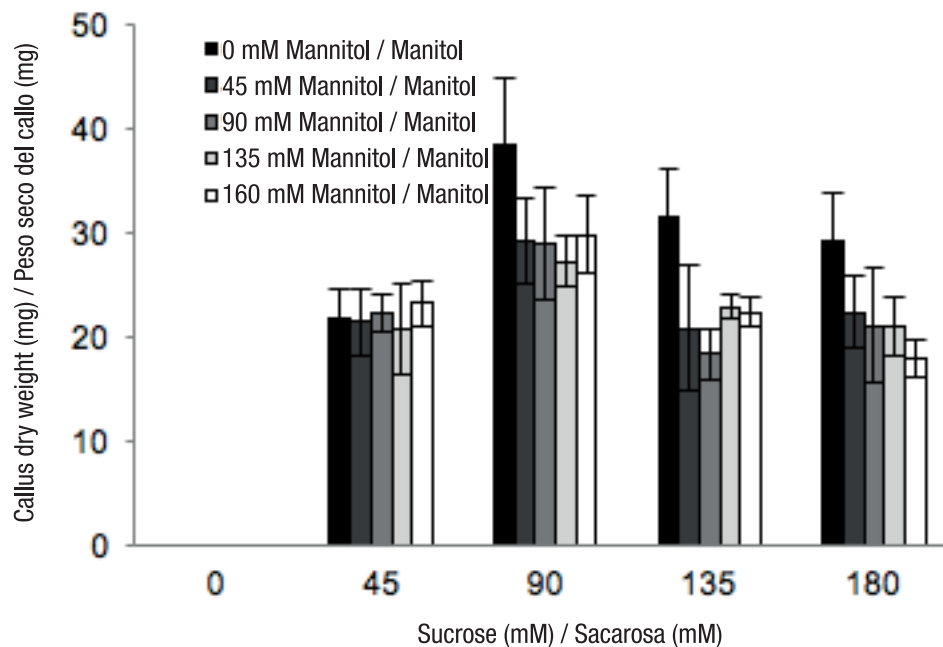


Figure 2. Effect of combinations of sucrose and mannitol on *Ceratonía siliqua* callus induction after five weeks in Gamborg (B5) medium supplemented with 2.5 μM of auxins 2,4-D.

Figura 2. Efecto de las combinaciones de sacarosa y manitol en la inducción del callo de *Ceratonía siliqua* después de cinco semanas en medio Gamborg (B5) suplementado con 2.5 μM de auxina 2,4-D.

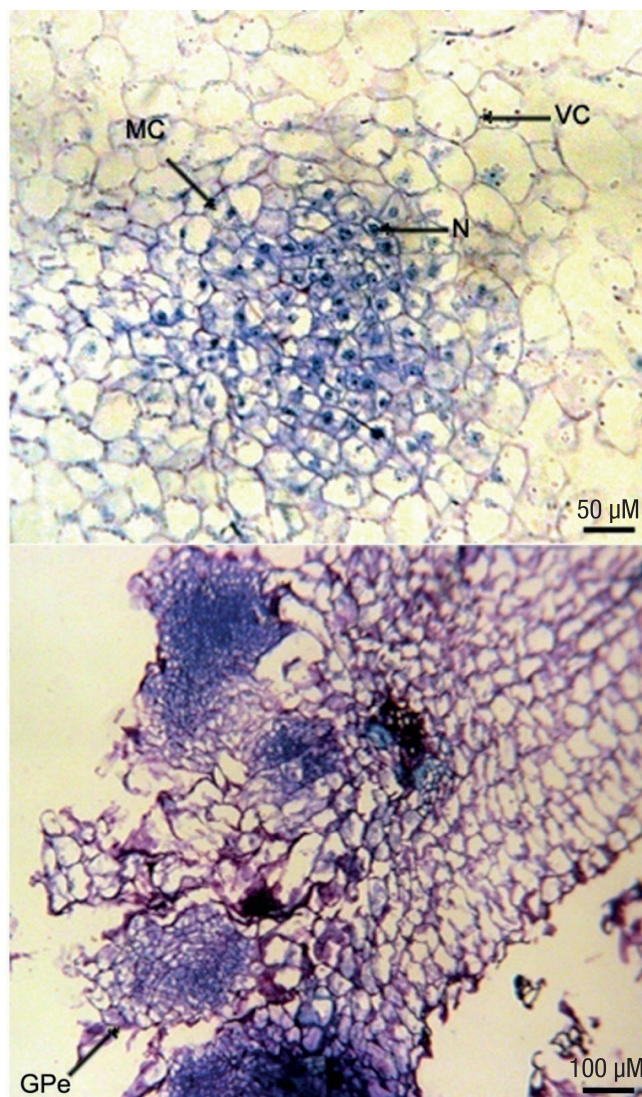


Figure 3. Microscopic observations of calli induced from mature cotyledons of *Ceratonia siliqua*. Meristematic center (MC) initiation with actively dividing cells having densely stained cytoplasm and nucleus (N) surrounded by highly vacuolated cells (VC). Detail of the cells in the globular structures (GPe) obtained on the surface of the calli developed at the cut ends of the explants.

Figura 3. Observaciones microscópicas de los callos inducidos a partir de cotiledones maduros de *Ceratonia siliqua*. Iniciación del centro meristemático (MC) con células en división activa que tienen núcleo (N) y citoplasma densamente teñido rodeados por células altamente vacuoladas (VC). Detalle de las células en estructuras globulares (GPe) de la superficie de los callos desarrollados en los extremos cortados de los explantes

sativa Mill. (Hoque, Biswas, & Alam, 2007), *Vigna subterranea* (L.) Verdc. (Konaté, Koné, Kouakou, Kouadio, & Zouzou, 2013) and *Theobroma cacao* L. (Ramírez, Vasquez, Osorio, Garcés, & Trujillo, 2018). The genotype effect can also induce changes in color, texture and morphogenetic potential of callus and this could occur even among related varieties of the same species (Saeed & Shahzad, 2015; Schween & Schwenkel, 2003; Shahnewaz, Bari, Siddique, & Rahman, 2004). Over the last few years, phenotypic and genetic studies have revealed a high degree of diversity of carob pods and seeds collected from different areas of Morocco (El

y proembriones globulares en la superficie de los callos (Figura 3b). Los exámenes histológicos también mostraron el desarrollo de raíces con haces vasculares en algunos callos inducidos.

Discusión

Este estudio evaluó el efecto de cinco genotipos de explantes y composición del medio de cultivo (nutrientes minerales, concentraciones de 2,4-D y carbohidratos) sobre la inducción y proliferación de callos, a partir de cotiledones maduros de *C. siliqua*.

Kahkahi, Zouhair, Ait Chitt, & Errakhi, 2014; Konaté, Filali-Maltouf, & Berraho, 2007; Sidina et al., 2009). In the present investigation, five different regions across Morocco were used as sources of cotyledonary explants. All compared genotypes showed high callus induction levels (75 to 100 %). However, callus morphology varied widely among genotypes. The difference could be attributed to the difference in the endogenous hormone concentration within genotypes (Han, Jin, Wu, & Zhang, 2011; Salehi & Khosh-Khui, 2005).

Salt composition of the medium is another important factor influencing callus induction and proliferation (George & de Klerk, 2008). In this study, all basal media were able to produce calli from mature cotyledon explants of carob. Calli dry weight presented significant differences with the highest results being observed on B5. WPM produced the lowest amount of calli. This medium has a poor salt composition with a lower content of nitrogen, potassium and chloride. It has also a lower total ionic amount compared to the other media. Notably, friable calli were obtained only with B5 and WPM. Development of this callus morphology could be due to the low nitrogen concentration in these media. Similar to the present findings, calli of *Barringtonia racemosa* (L.) Spreng. were friable on WPM and B5 media, and compact on MS medium (Behbahani, Shanehsazzadeh, & Hessami, 2011). In B5 medium, increasing the auxins 2,4-D concentration from 2.5 to 10 μ M improved callus dry weight. Noticeably, creamy-white calli were obtained at the lowest concentration while slightly brownish ones were observed at the highest concentration. The interaction between salt media and 2,4-D concentration was significant in the case of root induction. MS basal medium supplemented with 2.5 μ M 2,4-D showed the highest rate. The percentage of induced roots declined as the concentration of the auxin increased. A high 2,4-D concentration (10 μ M) inhibited the growth of roots for all the media tested. This could be explained by the fact that synthetic auxin at high concentration may produce herbicidal effects which could block the adventitious root initiation (Evans, Coleman, & Kearns, 2003).

In the present study, callus growth was also affected by different concentrations of sucrose and mannitol. B5 medium supplemented with 90 mM of sucrose produced the highest amount of calli. Higher sucrose concentrations appear to reduce callus proliferation, which can be explained by a decrease in the osmotic potential of the medium (Lipavská & Vreugdenhil, 1996). In similar studies conducted in *O. europaea*, callus induction increased when the sucrose concentration was increased from 54 to 243 mM (Brhadda et al., 2008). By contrast, sucrose at 43.8 mM produced the highest amount of callus in *Aquilaria malaccensis* Lam. while a

Este material vegetal tiene la ventaja de ser fácilmente extirpado y estar disponible durante todo el año.

Los estudios informan que la proliferación de callos es genotipo dependiente. Esta dependencia se observó en *Castanea sativa* Mill. (Hoque, Biswas, & Alam, 2007), *Vigna subterranea* (L.) Verdc. (Konaté, Koné, Kouakou, Kouadio, & Zouzou, 2013) y *Theobroma cacao* L. (Ramírez, Vasquez, Osorio, Garcés, & Trujillo, 2018). El efecto del genotipo también puede provocar cambios en el color, textura y potencial morfogenético de los callos, y esto podría ocurrir incluso entre variedades relacionadas de la misma especie (Saeed & Shahzad, 2015; Schween & Schwenkel, 2003; Shahnewaz, Bari, Siddique, & Rahman, 2004). En los últimos años, los estudios fenotípicos y genéticos han revelado un grado alto de diversidad de vainas de algarroba y semillas recolectadas en varias áreas de Marruecos (El Kahkahi, Zouhair, Ait Chitt, & Errakhi, 2014; Konaté, Filali-Maltouf, & Berraho, 2007; Sidina et al., 2009). En este estudio, se utilizaron cinco regiones de Marruecos como fuentes de explantes cotiledonares. Todos los genotipos comparados mostraron niveles altos de inducción de callo (75 a 100 %); sin embargo, la morfología varió ampliamente. La divergencia podría atribuirse a la diferencia en la concentración de hormonas endógenas en los genotipos (Han, Jin, Wu, & Zhang, 2011; Salehi & Khosh-Khui, 2005).

La composición de sal del medio de cultivo es otro factor importante que influye en la inducción y proliferación de callos (George & de Klerk, 2008). En este estudio, todos los medios basales pudieron producir callos a partir de explantes de cotiledones maduros de algarroba. El peso seco de los callos presentó diferencias significativas, obteniendo los resultados más altos con el medio B5. El medio WPM, que produjo la menor cantidad de callos, tiene una composición escasa de sal con un contenido más bajo de nitrógeno, potasio y cloruro; también tiene una cantidad iónica total más baja en comparación con los otros medios. En particular, los callos friables se obtuvieron solo con B5 y WPM. El desarrollo de esta morfología del callo podría deberse a la baja concentración de nitrógeno en dichos medios. Al igual que en el presente trabajo, los callos de *Barringtonia racemosa* (L.) Spreng. fueron friables en WPM y B5, y compactos en el medio MS (Behbahani, Shanehsazzadeh, & Hessami, 2011). En el medio B5, el aumento de la concentración de auxina 2,4-D (2.5 a 10 μ M) mejoró el peso seco del callo. Cabe destacar que los callos de color blanco cremoso se obtuvieron en la concentración más baja, mientras que los ligeramente café se observaron en la concentración más alta. La interacción entre los medios salinos y la concentración 2,4-D fue significativa en el caso de la inducción de raíz. El medio basal MS complementado con 2.5 μ M de 2,4-D mostró la tasa más alta. El porcentaje de raíces

higher level of sucrose had lower results (Jayaraman, Daud, Halis, & Mohamed, 2014). Adding mannitol to medium containing sucrose decreased callus dry weight, whereas no callus was induced in the presence of mannitol alone. This decline could be caused by an excessive osmotic contribution (Thorpe et al., 2008). In the experiments reported here, the use of mannitol with sucrose yielded low results as compared to the use of sucrose alone in the culture medium. Similar results were obtained with callus of *Vitis vinifera* L. (Yancheva & Roichev, 2005). However, when mannitol was used as the sole carbohydrate source, no callus was induced, indicating that sucrose is essential for callus induction in *C. siliqua*. The inability of carob cultures to use this sugar alcohol could be attributed either to the uptake inhibition of these carbohydrates or the absence of genes encoding enzymes involved in polyol catabolism in *C. siliqua* (Steinitz, 1999).

Calli induced in B5 medium assessed by histological analysis showed active centers with embryogenic characteristics. Unlike the non-embryogenic cells which are large, elongated and vacuolated, embryogenic cells are generally small, densely filled with cytoplasm and isodiametric (Brhadda, Walali, & Abousalim, 2007; Kumar, Suri, Sonie, & Ramawat, 2003). After four weeks, these meristematic cells evolved into embryogenic masses and globular proembryos.

Conclusions

This study confirms the high potential of mature cotyledons of *C. siliqua* for embryonic callus induction and proliferation. The expression of this potential is influenced by the genotype, 2,4-D concentration, salt composition of the basal medium and carbohydrates. The obtained callus showed varied texture and color. Histological investigation for induced calli showed active centers with embryogenic characteristics. This study is the first step towards establishing an efficient protocol for carob mass propagation via somatic embryogenesis and shoot formation from mature cotyledons. Further studies including critical factors that would improve the transition from proembryos to somatic embryos and subsequent plant regeneration are being considered.

inducidas disminuyó a medida que la concentración de la auxina aumentaba. Una concentración alta de 2,4-D (10 μ M) inhibió el crecimiento de las raíces en todos los medios evaluados. Esto podría explicarse por el hecho de que la auxina sintética a alta concentración puede producir efectos herbicidas que podrían bloquear el inicio adventicio de la raíz (Evans, Coleman, & Kearns, 2003).

En el presente estudio, el crecimiento de los callos también se vio afectado por las concentraciones de sacarosa y manitol. El medio B5 suplementado con 90 mM de sacarosa produjo la mayor cantidad de callos. Las concentraciones más altas de sacarosa parecen reducir la proliferación de callos, lo que puede explicarse por una disminución en el potencial osmótico del medio (Lipavská & Vreugdenhil, 1996). En un estudio similar realizado en *O. europaea*, la inducción del callo incrementó cuando la concentración de sacarosa aumentó de 54 a 243 mM (Brhadda et al., 2008). En contraste, la sacarosa a 43.8 mM produjo la mayor cantidad de callos en *Aquilaria malaccensis* Lam., mientras que un nivel más alto de sacarosa generó resultados más bajos (Jayaraman, Daud, Halis, & Mohamed, 2014). La adición de manitol al medio que contenía sacarosa redujo el peso seco del callo, mientras que no hubo inducción de callo en la sola presencia de manitol. Esta disminución podría ser causada por una contribución osmótica excesiva (Thorpe et al., 2008). En los experimentos desarrollados en este estudio, el uso de manitol con sacarosa arrojó resultados bajos en comparación con el uso de sacarosa sola en el medio de cultivo. Se obtuvieron resultados similares con el callo de *Vitis vinifera* L. (Yancheva & Roichev, 2005); sin embargo, cuando el manitol se usó como única fuente de hidratos de carbono no hubo inducción, lo que indica que la sacarosa es esencial para la inducción del callo en *C. siliqua*. La incapacidad de los cultivos de algarroba para usar este alcohol de azúcar podría atribuirse a la inhibición de la absorción de estos carbohidratos o a la ausencia de genes que codifican enzimas involucradas en el catabolismo del polirol en *C. siliqua* (Steinitz, 1999).

Los callos inducidos en B5, evaluados mediante el análisis histológico, mostraron centros activos con características embriogénicas. A diferencia de las células no embriogénicas que son grandes, alargadas y vacuoladas, las células embriogénicas son generalmente pequeñas, isodiamétricas y densamente llenas de citoplasma (Brhadda, Walali & Abousalim, 2007; Kumar, Suri, Sonie, & Ramawat, 2003). Después de cuatro semanas, estas células meristemáticas se transformaron en masas embriogénicas y proembriones globulares.

End of English version

References / Referencias

- Azeez, H., Ibrahim, K., Pop, R., Pamfil, D., Hârta, M., & Bobis, O. (2017). Changes induced by gamma ray irradiation on biomass production and secondary metabolites accumulation in *Hypericum triquetrifolium* Turra callus cultures. *Industrial Crops and Products*, 108, 183–189. doi: 10.1016/j.indcrop.2017.06.040
- Behbahani, M., Shanehsazzadeh, M., & Hessami, M. J. (2011). Optimization of callus and cell suspension cultures of *Barringtonia racemosa* (Lecythidaceae family) for lycopene production. *Scientia Agricola*, 68(1), 69–76. doi: 10.1590/s0103-90162011000100011
- Benković, M., Srećec, S., Bauman, I., Ježek, D., Karlović, S., Kremer, D., ...Erhatic, R. (2016). Assessment of drying characteristics and texture in relation with micromorphological traits of carob (*Ceratonía siliqua* L.) pods and seeds. *Food Technology and Biotechnology*, 54(4), 432–440. doi: 10.17113/ftb.54.04.16.4475
- Brhadda, N., Walali, D. E. L., & Abousalim, A. (2007). Etude histologique de l'embryogenèse somatique de l'olivier *Olea europaea* cv. Picholine marocaine. *Fruits*, 62(2), 115–124. doi: 10.1051/fruits:2003005
- Brhadda, N., Walali, D. E. L., & Abousalim, A. (2008). Effet du sucre sur l'embryogenèse somatique de l'olivier (*Olea europaea* L.) cv. "Picholine marocaine". *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 12(3), 245–250. Retrieved from <https://popups.uliege.be/1780-4507/index.php?id=2521>
- Canhoto, J. M., Rama, S. C., & Cruz, G. S. (2006). Somatic embryogenesis and plant regeneration in carob (*Ceratonía siliqua* L.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 42(6), 514–519. doi: 10.1079/ivp2006819
- Cob-Uicab, J. V., Sabja, A. M., Ríos-Leal, D., Lara-Aguilar, A., Donoso, P. J., González, M. E., & Escobar, B. (2011). Potencial de la organogénesis como estrategia para la masificación *in vitro* de *Fitzroya cupressoides* en Sudamérica Austral. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 17(3), 423–433. doi: 10.5154/r.rchscfa.2010.11.118
- Custodio, L., & Romano, A. (2006). *In Vitro* morphogenesis in zygotic embryo cultures of carob tree (*Ceratonía siliqua* L.). *Acta Horticulturae*, 725, 477–482. doi: 10.17660/actahortic.2006.725.68
- Din, A. R. J. M., Ahmad, F. I., Wagiran, A., Samad, A. A., Rahmat, Z., & Sarmidi, M. R. (2016). Improvement of efficient *in vitro* regeneration potential of mature callus induced from Malaysian upland rice seed (*Oryza sativa* cv. Panderas). *Saudi Journal of Biological Sciences*, 23(1), S69–S77. doi: 10.1016/j.sjbs.2015.10.022
- Driver, J. A., & Kuniyuki, A. H. (1984). *In vitro* propagation of Paradox walnut rootstock. *HortScience*, 19(4), 507–509. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/235909861_In_vitro_propagation_of_Paradox_Walnut_root_stock
- El Bouzdoudi, B., Saïdi, R., Khalid, E., El Mzibri, M., Nejjar, A. Z., El Kbiach, M. L., ...Lamarti, A. (2017). Mineral composition of mature carob (*Ceratonía siliqua* L.)

Conclusiones

Este estudio confirma el alto potencial de los cotiledones maduros de *Ceratonía siliqua* para la inducción y proliferación de callos embrionarios. La expresión del potencial está influenciada por el genotipo, la concentración 2,4-D, la composición de sal del medio basal y los carbohidratos. El callo obtenido mostró color y textura variada. La investigación histológica de los callos inducidos mostró centros activos con características embriogénicas. Este estudio es el primer paso hacia el establecimiento de un protocolo eficiente para la propagación de algarrobo en masa, mediante embriogénesis somática y formación de brotes, a partir de cotiledones maduros. Se están considerando estudios adicionales que incluyan factores críticos para mejorar la transición de proembriones a embriones somáticos y la posterior regeneración de la planta.

Fin de la versión en español

- Pod: A Study. *International Journal of Food Science and Nutrition Engineering*, 7(4), 91–103. doi: 10.5923/j.food.20170704.04
- El Kahkahi, R., Zouhair, R., Ait Chitt, M., & Errakhi, R. (2014). Morocco carob (*Ceratonía siliqua* L.) populations: Morphological variability of Pods and Kernel. *International Journal of Pure & Applied Bioscience*, 2(4), 38–47. Retrieved from <http://www.ijpab.com/form/2014Volume2,issue4/IJPAB-2014-2-4-38-47.pdf>
- Evans, D. E., Coleman, J. O. D., & Kearns, A. (2003). *Plant cell culture*. London and New York: BIOS Scientific Publisher.
- Fadel, F., Fattouch, S., Tahrouch, S., Lahmar, R., Benddou, A., & Hatimi, A. (2011). The phenolic compounds of *Ceratonía siliqua* pulps and seeds. *Journal of Materials and Environmental Science*, 2(3), 285–292. Retrieved from https://www.jmaterenvironsci.com/Document/vol2/vol2_N3/23-JMES-78-2011-Fadel.pdf
- FAO (2016). Food and Agriculture Organization of the United Nations website. Retrieved April 25, 2018, from <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>
- Gamborg, O. L., Miller, R., & Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, 50(1), 151–158. doi: 10.1016/0014-4827(68)90403-5
- George, E. F., & de Klerk, G. J. (2008). The components of plant tissue culture media I: macro-and micro-nutrients. In E. F. George, M. A. Hall, & G. J. de Klerk (Eds.), *Plant propagation by tissue culture* (3rd ed., pp. 65–114). Netherlands: Springer. doi: 10.1007/978-1-4020-5005-3_3
- Han, Y., Jin, X., Wu, F., & Zhang, G. (2011). Genotypic differences in callus induction and plant regeneration from mature embryos of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of Zhejiang University-Science B*, 12(5), 399–407. doi: 10.1631/jzus.b1000219

- Hoque, A., Biswas, M. K., & Alam, S. (2007). Variation of callus induction through anther culture in water chestnut (*Trapa* sp.). *Turkish Journal of Biology*, 31(1), 41–45. Retrieved from <http://journals.tubitak.gov.tr/biology/issues/biy-07-31-1/biy-31-1-7-0606-7.pdf>
- Jayaraman, S., Daud, N. H., Halis, R., & Mohamed, R. (2014). Effects of plant growth regulators, carbon sources and pH values on callus induction in *Aquilaria malaccensis* leaf explants and characteristics of the resultant calli. *Journal of Forestry Research*, 25(3), 535–540. doi: 10.1007/s11676-014-0492-8
- Khorsha, S., Alizadeh, M., & Mashayekhi, K. (2016). The usefulness of apricot gum as an organic additive in grapevine tissue culture media. *Advances in Horticultural Science*, 30(2), 111–118. doi: 10.13128/ahs-19137
- Kim, D. H., Gopal, J., & Sivanesan, I. (2017). Nanomaterials in plant tissue culture: The disclosed and undisclosed. *RSC Advances*, 7(58), 36492–36505. doi: 10.1039/c7ra07025j
- Konaté, I., Filali-Maltouf, A., & Berraho, E. B. (2007). Diversity analysis of Moroccan carob (*Ceratonia siliqua* L.) accessions using phenotypic traits and RAPD markers. *Acta Botanica Malacitana*, 32, 79–90. Retrieved from <http://www.biolveg.uma.es/abm/volumenes/vol32/32.ceratonia.pdf>
- Konaté, S., Koné, M., Kouakou, H. T., Kouadio, J. Y., & Zouzou, M. (2013). Callus induction and proliferation from cotyledon explants in *Bambara groundnut*. *African Crop Science Journal*, 21(3), 255–263. Retrieved from <https://www.ajol.info/index.php/acsj/article/view/91326>
- Ksia, E., Harzallah-Skhiri, F., Verdeil, J. L., Gouta, H., Alemanno, L., & Bouzid, S. (2008). Somatic embryo production from immature seeds of carob (*Ceratonia siliqua* L.). *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 83(4), 401–406. doi: 10.1080/14620316.2008.11512398
- Kumar, S., Suri, S. S., Sonie, K. C., & Ramawat, K. G. (2003). Establishment of embryonic cultures and somatic embryogenesis in callus culture of guggul-*Commiphora wightii* (Arnott.) Bhandari. *Indian Journal of Experimental Biology*, 41(1), 69–77. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/8442728_Establishment_of_embryonic_cultures_and_somatic_embryogenesis_in_callus_culture_of_guggul-Commiphora_wightii_Arnott_Bhandari
- Lipavská, H., & Vreugdenhil, D. (1996). Uptake of mannitol from the media by *in vitro* grown plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 45(2), 103–107. doi: 10.1007/bf00048751
- Lloyd, G., & McCown, B. (1980). Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Proceedings of the International Plant Propagators' Society*, 30, 421–427. Retrieved from <https://www.pubhort.org/ipps/30/99.htm>
- Lou, H., & Kako, S. (1995). Role of high sugar concentrations in inducing somatic embryogenesis from cucumber cotyledons. *Scientia Horticulturae*, 64(1–2), 11–20. doi: 10.1016/0304-4238(95)00833-8
- 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.). *Revue Marocaine Des Sciences Agronomiques et Vétérinaires*, 3, 24–29. Retrieved from http://www.agrimaroc.org/index.php/Actes_IAPH2/article/download/394/341
- Mujib, A., Ali, M., Tonk, D., & Zafar, N. (2017). Nuclear 2C DNA and genome size analysis in somatic embryo regenerated gladiolus plants using flow cytometry. *Advances in Horticultural Science*, 31(3), 165–174. doi: 10.13128/ahs-21956
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473–497. doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- Nakagawa, H., Saijyo, T., Yamauchi, N., Shigyo, M., Kako, S., & Ito, A. (2001). Effects of sugars and abscisic acid on somatic embryogenesis from melon (*Cucumis melo* L.) expanded cotyledon. *Scientia Horticulturae*, 90(1–2), 85–92. doi: 10.1016/s0304-4238(00)00259-4
- Ramírez, A. M. H., Vasquez, T., Osorio, T. M. O., Garcés, L. A., & Trujillo, A. I. U. (2018). Evaluation of the potential of regeneration of different Colombian and commercial genotypes of cocoa (*Theobroma cacao* L.) via somatic embryogenesis. *Scientia Horticulturae*, 229, 148–156. doi: 10.1016/j.scienta.2017.10.040
- Reyes-Díaz, J. I., Arzate-Fernández, A. M., Piña-Escutia, J. L., & Vázquez-García, L. M. (2017). Media culture factors affecting somatic embryogenesis in *Agave angustifolia* Haw. *Industrial Crops and Products*, 108, 81–85. doi: 10.1016/j.indcrop.2017.06.021
- Saeed, T., & Shahzad, A. (2015). High frequency plant regeneration in Indian *Sirisvia* cyclic somatic embryogenesis with biochemical, histological and SEM investigations. *Industrial Crops and Products*, 76, 623–637. doi: 10.1016/j.indcrop.2015.07.060
- Salehi, H., & Khosh-Khui, M. (2005). Effects of genotype and plant growth regulator on callus induction and plant regeneration in four important turfgrass genera: a comparative study. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 41(2), 157–161. doi: 10.1079/ivp2004614
- Schween, G., & Schwenkel, H.G. (2003). Effect of genotype on callus induction, shoot regeneration, and phenotypic stability of regenerated plants in the greenhouse of *Primula* ssp. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 72(1), 53–61. doi: 10.1023/A:1021227414880
- Shahnewaz, S., Bari, M. A., Siddique, N. A., & Rahman, M. H. (2004). Effects of genotype on induction of callus and plant regeneration potential *in vitro* anther culture of rice (*Oryza sativa* L.). *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 7(2), 235–237. doi: 10.3923/pjbs.2004.235.237
- Shahzad, A., Akhtar, R., Bukhari, N. A., & Perveen, K. (2017). High incidence regeneration system in *Ceratonia siliqua* L. articulated with SEM and biochemical analysis during developmental stages. *Trees*, 31(4), 1149–1163. doi: 10.1007/s00468-017-1534-6

- Shibli, R. A., Subaih, W. S., & Abdelrahman, N. (2005). Effect of different carbohydrates on *in vitro* maintenance of date palm embryogenic callus. *Advances in Horticultural Science*, 19(3), 172–175. Retrieved from <http://www.jstor.org/stable/42882411>
- Sidina, M. M., El Hansali, M., Wahid, N., Ouatmane, A., Boulli, A., & Haddioui, A. (2009). Fruit and seed diversity of domesticated carob (*Ceratonia siliqua* L.) in Morocco. *Scientia Horticulturae*, 123(1), 110–116. doi: 10.1016/j.scienta.2009.07.009
- SPSS, Corp. (2012). IBM SPSS Statistics for Windows, Version 21.0. Armonk, NY: IBM Corp.
- Steinitz, B. (1999). Sugar alcohols display nonosmotic roles in regulating morphogenesis and metabolism in plants that do not produce polyols as primary photosynthetic products. *Journal of Plant Physiology*, 155(1), 1–8. doi: 10.1016/S0176-1617(99)80133-3
- Sumaryono, Wirdhatul, M., & Ratnadewi, D. (2012). Effect of carbohydrate source on growth and performance of *In Vitro* sago palm (*Metroxylon sagu* Rottb.) plantlets. *HAYATI Journal of Biosciences*, 19(2), 88–92. doi: 10.4308/hjb.19.2.88
- Tholakalabavi, A., Zwiazek, J. J., & Thorpe, T. A. (1994). Effect of mannitol and glucose-induced osmotic stress on growth, water relations, and solute composition of cell suspension cultures of poplar (*Populus deltoides* var. *occidentalis*) in relation to anthocyanin accumulation. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 30(3), 164–170. doi: 10.1007/bf02632208
- Thorpe, T., Stasolla, C., Yeung, E. C., de Klerk, G.-J., Roberts, A., George, E. F. (2008). The components of plant tissue culture media II: organic additions, osmotic and pH effects, and support systems. In E. F. George, M. A. Hall, & G.-J. de Klerk (Eds.), *Plant propagation by tissue culture* (pp. 115–173). Netherlands: Springer. doi: 10.1007/978-1-4020-5005-3_3
- Varshney, A., & Anis, M. (2014). *Trees: Propagation and Conservation*. New Delhi, India: Springer. doi: 10.1007/978-81-322-1701-5
- Yancheva, S. D., & Roichev, V. (2005). Carbohydrate source can influence the efficiency of somatic embryogenesis in seedless grapes (*Vitis vinifera* L.). *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 19(2), 62–66. doi: 10.1080/13102818.2005.10817192