

Vers un test de sélection précoce de porte-greffes d'agrumes vis-à-vis des contraintes abiotiques (calcaire et salinité) / N. Maalouf ; sous la direction du Dr L. Chalak. — Extrait de : Annales de recherche scientifique. — N° 4 (2003), pp. 205-220.

Bibliographie. Tableaux.

I. Plantes — Micropropagation. II. Agrumes — Porte-greffes. III. Biotechnologie agricole.

Chalak, L.

PER L1049 / FA132414P

VERS UN TEST DE SÉLECTION PRÉCOCE DE PORTE-GREFFES D'AGRUMES VIS A VIS DES CONTRAINTES ABIOTIQUES (CALCAIRE ET SALINITÉ)

N. MAALOUF

Université Saint Esprit de Kaslik,
Faculté des Sciences Agronomiques.

Sous la direction du Dr L. CHALAK

Institut de Recherches Agronomiques, Zahlé.

RÉSUMÉ

Ce travail consiste en une mise au point technique d'une méthode d'évaluation in vitro du comportement du bigaradier vis-à-vis des stress abiotiques, laquelle sera extrapolée ultérieurement au porte-greffe Flhorag en vue d'étudier sa tolérance au sel et au calcaire. Les cultures de Flhorag ont été initiées à partir de noeuds sur le milieu de Murashige et Skoog contenant de la BAP associée à l'ANA ou à l'AIB. Une récalcitrance de ce porte-greffe aux manipulations in vitro a été notée. Quant à la callogenèse, elle a été expérimentée à partir de graine, d'épicotyle, de feuille et de racine chez le bigaradier et à partir d'entre-nœud, de feuille et de pétiole chez Flhorag. Sept milieux de culture ont été testés pour cette étape. Chez le bigaradier, l'épicotyle s'est révélé le plus réactif avec 97% d'explants callogènes; chez Flhorag l'entre-nœud a présenté le meilleur taux d'explants callogènes avec 73%. Le milieu ayant favorisé la callogenèse a été celui qui contient de la zéatine associée à l'ANA. Concernant l'effet des agents stressants chez le bigaradier, leur présence dans les milieux de culture a influencé la germination des graines ainsi que la callogenèse. Les taux de graines germées ont été inversement proportionnel aux concentrations croissantes de NaCl et de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ présentes dans le milieu de culture, variant entre 0 et 60%. De même les taux d'explants

callogènes ont varié entre 0 et 93%. Toutefois, une meilleure tolérance du bigaradier au stress calcaire par rapport au stress salin a été notée, démontrant ainsi une corrélation entre le comportement de ce porte-greffe dans les conditions in vitro et in vivo.

Mots clés: *Bigaradier. Flhorag. Culture in vitro. Callogénèse. Embryogenèse somatique.*

ABSTRACT

This study consisted to develop a method of evaluation of the in vitro behaviour of sour orange against abiotic stresses which would be later applied to Flhorag in the aim to study its tolerance to salt and calcareous stresses. In the case of Flhorag, cultures were initiated from buds on Murashige and Skoog medium supplemented with BAP in association with AIB or ANA. This rootstock showed a recalcitrance to the in vitro manipulations. As to callogenesis, it was experimented on seed, epicotyl, leaf and root explants of sour orange and on internode, leaf and petiol explants of Flhorag. Seven cultural media were tested for this stage. In the case of sour orange, the epicotyl segments were the best for callus induction with 97% of reactivity; in the case of Flhorag, the internode showed the best results with 73% of reactivity. Best callus induction were obtained on the media supplemented with zeatin associated with ANA. Concerning the effect of stressing agents in the case of sour orange, their presence in the cultural media influenced seed germination and callogenesis. In fact, germination rates varied according to the increasing levels of NaCl and Ca(NO₃)₂ 4H₂O between 0 and 60%, and callus induction rates varied between 0 and 93%. Best tolerance of the cultures of sour orange were observed in the presence of calcareous stress rather than salt stress proving the correlation between its behaviour under the in vivo and the in vitro conditions.

Keywords: *Sour orange, Flhorag, tissue culture, callogenesis, somatic embryogenesis.*

INTRODUCTION

Les agrumes constituent l'une des principales cultures fruitières du Liban. Ces cultures sont essentiellement localisées dans la région du Liban Sud (FAO, 1999). Les agrumes sont essentiellement greffés sur le bigaradier (Makkouk *et al.*, 1984) qui est adapté au sol libanais riche en calcaire actif (jusqu'à 35%) (Kichli, 1984).

Au cours des dernières décades, la région méditerranéenne a connu une expansion de plusieurs maladies menaçant les vergers d'agrumes, entre autres la Tristeza (Makkouk *et al.*, 1984; Loussert, 1989). Le bigaradier a présenté une sensibilité excessive à ce virus qui entraîne un déclin rapide des arbres atteints et nécessite l'éradication des vergers contaminés (Castle, 1987). Au Liban, la présence du virus a été détectée tout au long du littoral (D'Onghia *et al.*, 1998).

A l'échelle internationale, des programmes de sélection de porte-greffes d'agrumes ont été conduits pour contourner ces problèmes en créant une nouvelle gamme de sujets plus tolérants à la Tristeza tout en présentant une bonne compatibilité au greffage avec les variétés cultivées (Davies et Albigo, 1994; Ollitrault *et al.*, 1998); ils sont en cours d'expérimentation au Maroc et en Corse en particulier pour leur adaptation aux sols calcaires et salins (Ollitrault, communication personnelle).

Dans le but de promouvoir une nouvelle gamme de porte-greffes au Liban, l'Institut de Recherches Agronomiques du Liban (IRAL) a entrepris un programme d'expérimentation de nouveaux porte-greffes obtenus récemment en France, parmi lesquels Flhorag qui est résistant à la Tristeza et qui résulte de l'hybridation somatique entre le mandarinier commun et le poncirus.

Le présent travail consiste en une mise au point technique des étapes d'initiation des cultures et de callogenèse, ainsi qu'une méthode d'évaluation du comportement *in vitro* du bigaradier aux stress abiotiques et qui sera utilisée ultérieurement comme référence dans l'étude du comportement du porte-greffe Flhorag vis-à-vis du calcaire et du sel.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Initiation des cultures

Les cultures de bigaradier sont initiées à partir de graines. Ces dernières sont désinfectées dans une solution de clorox pur (NaOCl 110,2 g/l) puis rincées 3 fois dans l'eau distillée stérile. Les graines désinfectées sont ensuite mises en cultures sur le milieu C0 basé sur la formule de Murashige et Skoog (1962) et dépourvu de régulateurs de croissance. Les cultures sont maintenues à l'obscurité pendant 15 jours pour induire la germination, par la suite elles sont placées sous une photopériode de 16 heures par jour avec une intensité lumineuse de 4000 lux et une température comprise entre 25 et 30°C.

Quant au Flhorag, les cultures sont initiées à partir des noeuds. La désinfection est réalisée par incubation dans une solution de chlorure de mercure dont la concentration varie entre 1 g/l et 10 g/l pour une durée allant de 5 à 30 minutes, suivie de 3 rinçages successifs à l'eau distillée stérile. Les bourgeons sont cultivés sur deux milieux C1 et C2, ayant pour base la formule minérale de Murashige et Skoog (1962) et additionnés de BAP (0,5 mg/l) associée à l'ANA (0,5 mg/l) ou à l'AIB (0,25 mg/l). Un mois après la mise en culture, les plantules développées à partir des bourgeons sont séparées de l'explant de départ et transplantées sur les mêmes milieux frais.

Callogenèse et régénération

La callogenèse est expérimentée à partir de graine, d'épicotyle, de feuille et de racine prélevés sur les semis chez le bigaradier et à partir d'entre-noeuds, de feuille et de pétiole chez Flhorag. De plus, sept milieux sont testés, ils ont pour base la formule minérale de Murashige et Skoog (1962) et diffèrent par la balance hormonale (Tab.1). Durant cette phase, les cultures sont maintenues à l'obscurité.

Tableau 1: Balance hormonale des milieux utilisés pour la callogenèse.

Hormones	Composition des milieux en mg/l						
	C0	C3	C4	C5	C6	C7	C8
Kinétine	-	1	1	1	1	-	-
BAP	-	-	1	-	1	-	-
NAA	-	-	-	10	10	-	10
Zéatine	-	-	-	-	-	1	1

Agents de stress

Chez le bigaradier les agents de stress sont appliqués au niveau de la germination des graines, de la callogénèse et de l'embryogenèse somatique.

Le milieu de culture est additionné de concentrations croissantes en NaCl (0, 5, 7.5, 10 et 15 g/l) (Piqueras *et al*, 1994) ou de concentrations croissantes de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0, 82, 182, 282, 382 mg/l) (Chiadmi et Branchard, 1986).

L'analyse statistique de l'expérimentation est réalisée sur le logiciel S.A.S (SAS institute Inc. 1995). Les moyennes sont comparées par le test de Duncan au seuil de probabilité 0,05.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Germination des graines et effet des agents stressants

Le taux de germination des graines a été inversement proportionnel à la concentration d'agents stressants dans le milieu de culture (Tab.2 et Tab.3). C'est le milieu témoin qui a conduit au meilleur résultat avec 85% de graines germées.

Dans le cas du stress salin, des plantules entières ont été obtenues seulement sur le milieu additionné de 5 g/l de NaCl (Tab.2). Sur les milieux additionnés de 7,5 g/l et de 10 g/l de NaCl, la germination s'est limitée à la seule édification du système racinaire. La forte dose de 15 g/l a été létale, inhibant totalement la germination des graines. Notons qu'un retardement de trois semaines dans l'apparition des radicules a été noté par rapport au milieu témoin.

Tableau 2: Pourcentage de germination des graines de bigaradier sur cinq milieux contenant des concentrations croissantes en NaCl.

Concentration en NaCl (g/l)	Nombre de graines mises en culture	POURCENTAGE DE GRAINES			
		perdues par bactérie	perdues par champignon	non réactives	ayant germé
0	40	2,5	5,0	7,5	85,0 ± 12,9 a*
5	40	5,0	10,0	42,5	42,5 ± 12,7 b
7,5	40	10,0	15,0	52,5	22,5 ± 14,2 c
10	40	0,0	20,0	60,0	20,0 ± 10,5 c
15	40	0,0	22,5	77,5	0,0 d

* Les valeurs de la même colonne suivies de lettres différentes sont significativement différentes au seuil de probabilité de 0,05 (Test de Duncan).

Quant au stress calcaire, les semis obtenus ont présenté un développement comparable à ceux du milieu témoin aussi bien au niveau de la date d'apparition des racines qu'au niveau du développement ultérieur de la plante. La dose de 382 mg/l a été la plus sévère avec 22,5% de graines germées seulement (Tab.3).

Tableau 3: Pourcentage de germination des graines de bigaradier sur cinq milieux contenant des concentrations croissantes en $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$.

Concentration en $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ $4\text{H}_2\text{O}$ (mg/l)	Nombre de graines mises en culture	POURCENTAGE DE GRAINES			
		perdues par bactérie	perdues par champignon	non réactives	ayant germé
0	40	2,5	5	7,5	85,0 ± 12,9 a*
82	40	5,0	10	25,0	60,0 ± 17,5 b
182	40	0,0	15	37,5	47,5 ± 7,9 c
282	40	7,5	10	52,5	30,0 ± 10,5 d
382	40	0,0	20	57,5	22,5 ± 7,9 d

* Les valeurs de la même colonne suivies de lettres différentes sont significativement différentes au seuil de probabilité de 0,05 (Test de Duncan).

Etablissement et multiplication des bourgeons de Flhorag

L'initiation des cultures de Flhorag à partir de bourgeons s'est rapidement heurtée à des problèmes de contaminations bactériennes notamment, entraînant la mort des explants atteints. Différentes concentrations d' HgCl_2 associées à plusieurs durées ont été testées. Un brunissement des tissus a été observé avec l'augmentation de la concentration; toutefois, l'élimination des bactéries n'a pas été totale quelle que soit la dose appliquée. Le traitement des explants à une concentration de 5 g/l pendant 20 minutes a été le plus efficace. Concernant l'effet du milieu de culture sur le nombre moyen de nouvelles tiges par explant et la longueur moyenne des tiges, les résultats ont été comparables sur les deux milieux C1 et C2 avec 1 à 2 nouvelles tiges par explant et une longueur ne dépassant pas 1 cm.

Les nouvelles tiges ont été multipliées pendant deux subcultures successives sur les mêmes milieux. Les résultats ont été comparables d'une subculture à l'autre et d'un milieu à l'autre, avec un coefficient de multiplication

variant en moyenne entre 1,25 et 2 et un allongement de 0,71 à 0,85 cm. Au cours des subcultures, le matériel a présenté un jaunissement généralisé associé à une chute des feuilles, ce qui a entraîné le dépérissement de la majorité des tiges. Ce problème a déjà été rapporté chez les agrumes en général; ce qui explique le fait que, dans la majorité des cas, les cultures ont été initiées à partir de graines (Barlass et Skene, 1986).

Callogenèse

Parmi les quatre explants testés chez le bigaradier, l'épicotyle s'est révélé le plus apte à développer des cals. Les premiers cals sont apparus au bout de deux semaines avec 96,67% d'explants callogènes (Tab.4). Ils ont présenté une couleur blanche crémeuse et un aspect friable. Ce résultat est comparable à celui obtenu par Gill *et al.* (1995). Des cals ont été également développés à partir des graines, mais avec un retard d'un mois et une couleur marron clair. Par ailleurs, les feuilles et les racines se sont révélées non callogènes sur les 7 milieux expérimentés, contrairement aux résultats signalés par Gill *et al.* (1995).

Tableau 4: Effets des explants et des milieux de culture sur l'aptitude à la callogenèse du bigaradier exprimée en pourcentage d'explants ayant développé du cal.

Explant \ Milieu	Milieu						
	C0	C3	C4	C5	C6	C7	C8
Graine	0	0	0	23 ± 9,13 b*	50,00 ± 26,35 a	0	63,34 ± 13,94 a
Epicotyle	0	0	0	40 ± 19,00 b	53,34 ± 21,73 b	0	96,67 ± 7,45 a
Feuille	0	0	0	0	0,00	0	0,00
Racine	0	0	0	0	0,00	0	0,00

* Les valeurs d'une même ligne suivies de lettres différentes sont significativement différentes au seuil de probabilité de 0,05 (Test de Duncan).

Dans le cas de Flhorag, l'entre-nœud a été le seul explant qui a développé des cals (Tab.5). Les premiers cals ont été observés six semaines après la mise en culture avec un retard d'un mois par rapport à l'épicotyle chez le bigaradier. Ils ont présenté une couleur blanc sale légèrement jaunâtre et un aspect

compact. Cette réactivité des entre-nœuds a été déjà observée chez d'autres génotypes d'agrumes (Kunitake et Mii, 1995). Par contre, les feuilles et les pétioles n'ont pas été réactifs quel que soit le milieu utilisé, contrairement aux résultats précédemment obtenus par Bhojwani et Razdan (1983). Quant à l'effet du milieu sur la callogenèse, les résultats obtenus chez les deux génotypes ont été similaires. Ainsi, l'induction de la callogenèse s'est limitée aux milieux C5, C6 et C8 contenant de la cytokinine associée à l'ANA (Tab.4 et Tab.5). La présence d'ANA dans ces trois milieux aurait favorisé le processus de dédifférenciation (Torres, 1983; Hartmann *et al.*, 1997).

Tableau 5: Effets des explants et des milieux de culture sur l'aptitude à la callogenèse de Flhorag exprimée en pourcentage d'explants ayant développé du cal.

Milieu Explant	C0	C3	C4	C5	C6	C7	C8
Entre-nœud	0,00 b*	0,00 b	0,00 b	16,67 ± 11,79 b	60,00 ± 32,5 a	0,00 b	73,34 ± 25,30 a
Feuille	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Pétiole	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

* Les valeurs de la même ligne suivies de lettres différentes sont significativement différentes au seuil de probabilité 0,05 (Test de Duncan).

Effet des agents de stress sur la callogenèse chez le bigaradier

▪ Initiation des cals

Les taux d'explants callogènes ont été significativement affectés par la présence du NaCl dans le milieu de culture; ils ont été inversement proportionnels aux teneurs du milieu en sel (Tab.6). En effet, c'est le milieu témoin qui a présenté le meilleur taux de 96,67% suivi par un taux de 90% sur le milieu additionné de 5 g/l de NaCl. Une inhibition totale de la callogenèse a été observée sur le milieu contenant 15 g/l. Les cals obtenus sur les milieux additionnés de stress salin ont présenté un aspect compact et une couleur marron clair; leur développement est resté relativement lent par rapport à ceux obtenus sur le milieu témoin.

Tableau 6: Effet des concentrations croissantes de NaCl sur la callogénèse chez le bigaradier.

Concentration en NaCl (g/l)	Nombre de graines mises en culture	POURCENTAGE D'EXPLANTS			
		perdus par bactérie	perdus par oxydation	non réactifs	ayant développé un cal
0	30	0,00	3,33	0,00	96,67 ± 7,45 a*
5	30	3,33	6,67	0,00	90,00 ± 14,91ab
7,5	30	3,33	10,00	6,67	80,00 ± 7,45 b
10	30	0,00	10,00	23,33	66,67 ± 11,78 c
15	30	0,00	6,67	93,33	0,00 d

* Les valeurs de la même colonne suivies de lettres différentes sont significativement différentes au seuil de probabilité 0,05 (Test de Duncan).

Par contre, la présence de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ dans le milieu de culture n'a pas affecté la callogénèse chez le bigaradier (Tab.7). Les résultats obtenus sur les milieux contenant du calcaire ont été comparables à ceux du milieu témoin et ce aussi bien au niveau de la date d'apparition des cals, qu'au niveau des taux d'explants callogènes qui ont varié entre 83,34 et 96,67%. Les cals obtenus ont présenté une couleur jaunâtre et un aspect friable.

Tableau 7: Effet des concentrations croissantes de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ sur la callogénèse chez le bigaradier.

Concentration en $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (mg/l)	Nombre d'explants mis en culture	POURCENTAGE D'EXPLANTS			
		perdus par bactérie	perdus par oxydation	non réactifs	ayant développé un cal
0	30	0,00	3,33	0,00	96,67 ± 7,45 a*
82	30	0,00	3,33	3,33	93,34 ± 9,12 a
182	30	0,00	0,00	6,66	93,34 ± 9,12 a
282	30	3,34	0,00	6,66	90,00 ± 14,91 a
382	30	3,33	3,33	10,00	83,34 ± 11,78 a

* Les valeurs de la même colonne suivies de lettres différentes sont significativement différentes au seuil de probabilité 0,05 (Test de Duncan).

▪ Croissance des cals

L'effet des agents stressants sur la croissance des cals a été examiné au cours de trois subcultures successives par la mesure de l'augmentation du poids des cals à la fin de chaque subculture (Tab.8 et Tab.9).

Concernant le cas du stress salin, la croissance a été inversement proportionnelle à la concentration de NaCl dans le milieu de culture (Tab.8). Ainsi, si l'on considère la première subculture, la croissance est passée de 0,168 g sur le milieu contenant 5 g/l, à 0,068 g sur le milieu contenant 10 g/l, face à 2,87 g sur le milieu témoin. D'une façon générale, un ralentissement de la croissance des cals a été noté au cours des subcultures successives en particulier sur les milieux contenant 7,5 g/l et 10 g/l de NaCl respectivement. De plus, la couleur des cals est passée progressivement du marron clair au marron foncé au fur et à mesure des subcultures.

Tableau 8: Evolution de la croissance des cals au cours de trois subcultures successives sur les milieux contenant des concentrations croissantes en sel, exprimée par l'augmentation du poids (g).

Subculture	Concentrations croissantes en NaCl (g/l)			
	0	5	7,5	10
1 ^{ère}	2,87 ± 0,40 a*	0,168 ± 0,15 b	0,136 ± 0,04 b	0,068 ± 0,02 b
2 ^{ème}	2,37 ± 0,38 a	0,151 ± 0,04 b	0,084 ± 0,02 b	0,038 ± 0,01 b
3 ^{ème}	2,28 ± 0,20 a	0,142 ± 0,04 b	0,069 ± 0,02 b	0,037 ± 0,01 b
Moyenne des 3 subcultures	2,51 ± 0,32 a	0,154 ± 0,02 b	0,096 ± 0,03 b	0,047 ± 0,02 b

* Les valeurs d'une même ligne suivies de lettres différentes sont significativement différentes au seuil de probabilité de 0,05 (Test de Duncan).

Concernant le cas du stress calcaire, la croissance des cals a également été significativement influencée par la présence de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ dans le milieu de culture (Tab.9). Ainsi, dès la première subculture le développement des cals a été affecté avec des valeurs moyennes passant de 2,51 g sur le milieu témoin à 1,57 g sur le milieu contenant 82 mg/l et 0,88 g sur le milieu contenant 382 mg/l de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. Aussi, un ralentissement de la croissance des cals a été noté au cours des subcultures successives en particulier sur les milieux contenant 182 mg/l, 282 mg/l et 382 mg/l respectivement. Enfin, la couleur des cals est passée progressivement du jaune (phase d'initiation) au marron clair au fur et à mesure des subcultures.

Tableau 9: Evolution de la croissance des cals au cours de trois subcultures successives sur les milieux contenant des concentrations croissantes en calcaire, exprimée par l'augmentation du poids (g).

Subculture	Concentrations croissantes en $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (mg/l)				
	0	82	182	282	382
1 ^{ère}	2,87 ± 0,40 a*	1,78 ± 0,28 b	1,62 ± 0,24 b	1,46 ± 0,32 b	1,39 ± 0,27 b
2 ^{ème}	2,37 ± 0,38 a	1,59 ± 0,58 b	1,22 ± 0,35 bc	0,68 ± 0,16 cd	0,70 ± 0,33 d
3 ^{ème}	2,28 ± 0,20 a	1,34 ± 0,15 b	0,84 ± 0,10 c	0,64 ± 0,07 d	0,56 ± 0,11 d
Moyenne des 3 subcultures	2,51 ± 0,32 a	1,57 ± 0,22 b	1,23 ± 0,40 bc	0,93 ± 0,46 c	0,88 ± 0,44 cd

* Les valeurs de la même ligne suivies de lettres différentes sont significativement différentes au seuil de probabilité 0,05 (Test de Duncan).

Si l'on compare les résultats de l'initiation des cals et de leur croissance obtenus sur les milieux salins et les milieux calcaires, on remarque que le bigaradier est plus tolérant au calcaire qu'au sel dans les conditions de culture in vitro. Ces résultats reflètent le comportement in vivo du bigaradier qui s'adapte parfaitement aux sols calcaires et tolère les sols salins (Castle, 1987; Loussert, 1989; Davies et Albigo, 1994; Beretti et Lescombes, 1997).

CONCLUSIONS

D'une façon générale, le bigaradier a montré une bonne aptitude aux manipulations *in vitro* aussi bien au niveau de la germination des graines qu'au niveau de la callogenèse. Quant à Flhorag, les résultats obtenus au cours de cette étude ont permis de révéler une récalcitrance générale de ce génotype aux manipulations *in vitro*.

Concernant le comportement du bigaradier vis-à-vis des agents stressants, il a montré une meilleure réactivité en présence de stress calcaire qu'en présence de stress salin, aussi bien au niveau de la germination des graines qu'au niveau de l'initiation des cals et de leur croissance.

Enfin, il serait intéressant de réussir l'induction d'embryons somatiques sur les milieux contenant les agents stressants et d'extrapoler la technique déjà développée chez le bigaradier à Flhorag afin d'étudier son comportement vis-à-vis des stress calcaire et salin et d'essayer, si possible, d'isoler des variants somaclonaux résistants au sel et au calcaire.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BARLASS, M. et SKENE, K.M.G., 1986. Citrus. *In*: Biotechnology in agriculture and forestry. Volume 1: Trees I. Bajaj Y.P.S. ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 207-219 pp.
- BERETTI, H. et LESCOMBES, L., 1997. Des choix pour un produit typique. L'arboriculture fruitière n° 501. 21-29 pp.
- BHOJWANI, S.S. et RAZDAN, M.K., 1983. Somatic embryogenesis. *In*: Plant tissue culture, theory and practice. Cambridge University Press. 91-112 pp.
- CASTLE, S.W., 1987. Citrus rootstocks. *in*: Rootstocks for fruit crops. Rom R.C. & Carlson R.F. ed., Winley-interscience publication, Florida. 361-399 pp.
- CHIADMI, N. et BRANCHARD, M., 1986. Mise au point d'un test *in vitro* permettant la détermination précoce de la sensibilité de porte-greffes de vigne à la chlorose calcaire. Symposium international sur la physiologie de la vigne, Bordeaux France, 24-27 juin.
- DAVIES, F.S. et ALBIGRO, L.G., 1994. Citrus, crop production science in horticulture. Atheron J.& Rees A. ed. CAB International England. 83-135 pp.
- D'ONGHIA, A.M., SAADÈ, P., KHOURY, W., CASTELLANO, M.A. et SAVINO, V., 1998. Occurrence and distribution of *Citrus* tristeza virus in Lebanon. *Phytopathologia mediterranea*, 37 (2): 75-78.
- FAO, 1999. République Libanaise Ministère de l'Agriculture. Résultats globaux du recensement agricole, 77 pp.
- GILL, M.I.S., SINGH, Z., DHILLON, B.S. et GOSAL, S.S., 1995. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration in mandarin (*Citrus reticulata* Blanco). *Scientia Horticulturae*, 63:167-174.
- HARTMANN, H.T., KESTER, D.E., DAVIES, F.T. et GENEVE, R.L., 1997. Plant propagation: principles and practices. 6th edition. Prentice Hall International New York. 629-632 pp.
- KICHLI, A., 1984. Le phosphore dans les sols du Liban. Thèse de docteur-ingénieur en Sciences Agronomiques. Institut National Polytechnique-Toulouse. 147 pp.

- KUNITAKE, H. et MII, M., 1995. Somatic embryogenesis in Citrus species. *in*: Biotechnology in agriculture and forestry. Volume 30: Somatic Embryogenesis and Synthetic Seeds I. Bajaj Y.P.S. ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 280-294 pp.
- LOUSSERT, R., 1989. Les agrumes. Volume 1, Arboriculture. Techniques Agricoles Méditerranéennes. Tech & Doc ed. France, 113pp.
- MAKKOUK, K.M., GHANEM, G. et KHATIB, H., 1984. Survey of virus and virus-like diseases affecting *Citrus* in Lebanon. *Arab Journal for Plant Protection*, 2:23-27.
- MURASHIGE, T. et SKOOG, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology of Plant*, 15:473-497.
- OLLITRAULT, P., DAMBIER, D., FROELICHER, Y., BAKRY, F. et AUBERT, B., 1998. Rootstock breeding strategies for the mediterrenan *Citrus* industry: the somatic hybridization potential. *Fruits*, 53:335-344.
- PIQUERAS, A., OLMOS, E. et HELLIN, E., 1994. Cytological changes related with salt tolerance in embryogenic callus of *Citrus limon*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 39: 13-18.
- SAS institute Inc. 1995. SAS procedures guide, version 6, third edition, Cary, NC: SAS institute Inc.
- TORRES, K.C., 1983. Overview of callus (tissue) and organ culture. *in*: Tissue culture techniques for horticultural crops. Nostrand Reinhold New York. 73-79 pp.