

Potentiels de propagation in vitro et in vivo de variétés locales d'amandier (Prunus amygdalus Batsch) / N. Sakr ; sous la direction du Dr L. Chalak. — Extrait de : Annales de recherche scientifique. — N° 4 (2003), pp. 301-316.

Bibliographie. Tableaux.

I. Amandier. II. Multiplication végétative — Liban. III. Boutures — Enracinement — Liban.

Chalak, L.

PER L1049 / FA132414P

POTENTIELS DE PROPAGATION *IN VITRO* ET *IN VIVO* DE VARIÉTÉS LOCALES D'AMANDIER (*Prunus amygdalus* Batsch)

N. SAKR

Université Saint-Esprit de Kaslik,
Faculté des Sciences Agronomiques.

Sous la direction du Dr L. CHALAK

Institut des Recherches Agronomiques Libanais, Zahlé.

RÉSUMÉ

Cette étude consiste en une contribution à la mise au point méthodologique de différentes étapes de propagation de sept variétés locales d'amandiers dans les conditions *in vitro* et *in vivo*: Awja, Metwi, Halwani, Demi-Khachabi, Khachabi, Biadi et Italia. Concernant la propagation *in vitro*, les explants de départ ont été des noeuds et des méristèmes prélevés sur des rameaux de l'année. Deux milieux de culture basés respectivement sur la composition minérale de Murashige et Skoog et celle de Quoirin et al. ont été testés pour les deux phases de reprise et de multiplication. Ces deux milieux se sont révélés favorables à la première étape d'initiation des cultures, avec des taux de reprise compris entre 9 et 67%, mais n'ont pas été adéquats par la suite à la prolifération des tiges d'une façon satisfaisante. En effet, le coefficient de multiplication n'a pas dépassé 3 dans le meilleur des cas. Quant à l'enracinement, il a été réussi chez la variété Demi-Khachabi avec un taux de 56% suite à un traitement impliquant une phase d'induction pendant quatre heures à l'obscurité dans une solution d'AIA (100 mg/l), suivie par le transfert des plantules sur le milieu de Murashige et Skoog dilué de moitié et dépourvu de régulateurs de croissance. Concernant la propagation *in vivo*, les boutures lignifiées se sont montrées récalcitrantes au bouturage en serre. En effet, les

taux d'enracinement obtenus ont été négligeables indépendamment de la concentration d'AIB utilisée.

Mots clés: *Amandier. Variétés locales. Propagation in vitro. Propagation in vivo. Enracinement*

ABSTRACT

This study consisted of a technical pointing of the different stages of propagation of seven local varieties of almond in in vitro and in vivo conditions: Awja, Metwi, Halwani, Demi-Khachabi, Khachabi, Biadi et Italia. Concerning the in vitro propagation, the starter explants were buds and meristems of the current year branches. Two cultural media based respectively on the mineral formula of Murashige and Skoog and that of Quoirin et al. were tested for the regeneration and multiplication phases. These two media were revealed favourable at the first stage of culture initiation, leading to revival rates between 9 and 67%, but were not adequate for stem proliferation in a satisfactory way. In fact, the shoot multiplication coefficient did not exceed 3 in the best cases. As to rooting, the Half-Khachabi variety succeeded with a rate of 56% as a result of the treatment including an induction phase during four hours in the dark with an AIA solution (100 mg/l), followed by the plants transfer into the Murashige and Skoog half diluted media and deprived of growth regulators. Concerning the in vivo propagation, lignified cuttings were showed recalcitrant. In fact, the resulting rooting rates were negligible.

Keywords: *Almond. Local varieties. In vitro propagation. In vivo propagation. Rooting.*

INTRODUCTION

L'amandier (*Prunus amygdalus*) constitue l'une des principales cultures fruitières produites au Liban. En effet les amandiers ont occupé en 1999 une superficie agricole de 6500 ha, produisant une récolte de 28 600 t, soit 2,7% des productions fruitières libanaises (FAO, 2000).

Récemment, les nouveaux vergers commerciaux sont basés sur un nombre limité de variétés, ce qui limite le choix du consommateur. Cette réduction de la diversité génétique menace l'avenir de cette culture en cas d'apparition de

maladies ou de nouveaux parasites (Chalak, 1995). D'autre part, la multiplication de l'amandier par les voies classiques (greffage) favorise la transmission des agents pathogènes propagés par la sève, entraînant des pertes considérables du rendement (Kester *et al.*, 1986; Chalak, 1999). A l'échelle internationale, ce problème a été contourné grâce à la technique de culture *in vitro* des tissus végétaux, qui s'est avérée être un excellent outil pour la production de matériel indemne de virus (Savino *et al.*, 1990). Certains pépiniéristes libanais commencent à introduire du matériel certifié issu de l'*in vitro*, ceci risque de remplacer les variétés locales par des variétés améliorées et d'augmenter le prix de revient (Chalak *et al.*, sous presse).

Dans l'optique de développer la culture de variétés locales d'amandier au Liban, l'Institut de Recherches Agronomiques du Liban (IRAL), en collaboration avec l'UNDP (projet Agrobiodiversité), a mis en œuvre un programme de recherche visant, d'une part, à valoriser et préserver les variétés locales et, d'autre part, à améliorer la qualité du matériel de propagation.

Le présent travail consiste à adapter les techniques de multiplication végétative *in vitro* et *in vivo* chez sept variétés locales d'amandier, dans le but d'une production de plants de qualité francs de pied destinés à la préservation *ex situ* des ressources génétiques locales.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Propagation *in vitro*

1- Etablissement des cultures à partir de bourgeons et de méristèmes

Le matériel végétal a été constitué de sept variétés locales d'amandier: Awja, Metwi, Halwani, Demi-Khachabi, Khachabi, Biadi, Italia. Des rameaux herbacés prélevés au mois de juin ont été utilisés pour le prélèvement de bourgeons et de méristèmes.

Après une désinfection externe dans une solution de clorox diluée à 20% pendant 10 min et un rinçage répété dans de l'eau distillée stérile, les bourgeons et les méristèmes ont été cultivés respectivement dans des tubes à essai et des boîtes de pétri contenant le milieu de culture. Deux milieux différents par leur composition en macro-éléments ont été utilisés: A1 basé sur la formule minérale de Murashige et Skoog (1962) et A2 sur celle de Quoirin *et al.* (1977). Ils ont été additionnés de BAP (1 mg/l), AIB (0,05 mg/l), GA3 (0,1 mg/l) et de

saccharose (30 g/l). Après ajustement du pH à 5,8 puis addition d'agar (Bacto Difco) (8 g/l), les milieux ont été stérilisés par autoclavage à une température de 118°C pendant 20 min. Les cultures ont été maintenues dans un incubateur conditionné à une température comprise entre 23°C et 25°C et une photopériode de 16 h par jour, avec une intensité lumineuse de 4000 lux.

2- Multiplication des tiges

Environ trois à quatre semaines après la mise en culture, les tiges nouvellement développées ont été séparées de l'explant de départ et transplantées sur les mêmes milieux frais utilisés pour la mise en culture, constituant ainsi la première subculture. L'opération de subculture a été répétée toutes les trois ou quatre semaines; au bout de chaque subculture, le coefficient de multiplication a été estimé selon la formule: nombre de pousses obtenues en fin de subculture / nombre de pousses initiales.

3- Enracinement *in vitro*

Seules quatre variétés ont fait l'objet d'une expérimentation d'enracinement. Sept traitements (T0, T1,...T6) ont été testés, basés sur le milieu de Murashige et Skoog (1962) dont les macro- et les micro-éléments ont été dilués de moitié:

T0: Les plantules ont été directement repiquées sur le milieu gélosé précédemment décrit dépourvu de régulateurs de croissance.

T1, T2 et T3: Les plantules ont été directement repiquées sur le milieu gélosé additionné d'AIA (T1), d'AIB (T2) ou d'ANA (T3) à 1 mg/l.

T4, T5 et T6: Les plantules ont subi une première étape d'induction à l'obscurité pendant quatre heures dans un milieu liquide additionné d'AIA (T4), d'AIB (T5) ou d'ANA (T6) à 100 mg/l.

Pour tous les traitements, les cultures ont été maintenues pendant six jours à l'obscurité puis placées sous une photopériode de 16 h/j.

Propagation *in vivo*

Le matériel était constitué de rameaux lignifiés de l'année prélevés en février sur les sept géotypes. Des fragments de boutures (20 cm) ont subi une désinfection externe dans une solution de Captan (1g/l) pendant 30 min, puis elles ont été traitées à leur base dans une solution d'AIB pendant 30 sec. Quatre doses ont été testées: 0, 1000, 3000 et 5000 ppm.

Les boutures ont été ensuite placées en serre dans un bac contenant un mélange de terreau et de perlite (1:1). La température a été maintenue à 20-22°C au niveau du système racinaire, tandis que celle de la serre a varié entre 25 et 28°C. Pour éviter le dessèchement des boutures, le couvercle du bac a été retiré progressivement d'un jour à l'autre et les boutures ont été arrosées régulièrement. Elles ont été pulvérisées deux fois par semaine avec une solution de fongicide (Captan 1g/l) pour éviter le développement de la pourriture.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Propagation *in vitro*

1- Établissement des cultures à partir de bourgeons

Suite à la désinfection, les mises en culture des bourgeons se sont rapidement heurtées à deux types de problèmes: contaminations mycéliennes ou bactériennes et brunissement des explants résultant probablement de l'oxydation des composés phénoliques présents dans les tissus. Les résultats ont varié selon les variétés et ce indépendamment du milieu de culture (Tab.1). Le géotype Khachabi a présenté le taux de survie le plus élevé (61,9%).

Environ un mois après la mise en culture, le nombre moyen de nouvelles tiges obtenues par explant ayant survécu à la désinfection n'a pas été significativement influencé par le milieu de culture ou par le géotype (Tab.1). Toutefois, le nombre moyen de nouvelles tiges par explant n'a pas dépassé 1,25 dans le meilleur des cas.

Tableau 1: Pourcentages de survie des bourgeons après désinfection et nombres moyens de nouvelles tiges par explant, estimés un mois après la mise en culture des sept géotypes sur les deux milieux A1 et A2 (moyenne \pm écart-type).

Géotype	Milieu	Nb. d'explants mis en culture	POURCENTAGE D'EXPLANTS				Nb. moyen de nouvelles tiges par explant
			perdus par bactérie	perdus par champignon	perdus par oxydation	survivants	
Awja	A1	411	22,0	4,6	51,6	21,8 \pm 13,6	1,0 \pm 0,0 a*
	A2	320	68,1	14,7	8,1	9,1 \pm 6,9	1,04 \pm 0,2 a
Metwi	A1	105	16,2	31,4	31,4	21,0 \pm 18,2	1,14 \pm 0,4 a
	A2	110	10,0	30,0	34,6	25,4 \pm 7,3	1,0 \pm 0,0 a
Halwani	A1	106	11,2	59,4	6,6	22,8 \pm 12,3	1,13 \pm 0,34 a
	A2	106	2,9	19,8	41,5	35,8 \pm 12,3	1,1 \pm 0,3 a
Demi-Khachabi	A1	82	10,9	19,5	31,7	37,9 \pm 21,9	1,0 \pm 0,0 a
	A2	94	36,1	23,4	24,5	16,0 \pm 9,6	1,25 \pm 0,43 a
Khachabi	A1	101	2,0	0,0	30,7	67,3 \pm 0,9	1,0 \pm 0,0 a
	A2	101	1,8	0,0	41,6	56,6 \pm 0,9	1,0 \pm 0,0 a
Biadi	A1	110	0,0	21,8	15,4	62,8 \pm 20,9	1,2 \pm 0,3 a
	A2	113	0,8	42,5	9,7	47,0 \pm 26,6	1,1 \pm 0,3 a
Italia	A1	429	35,6	23,3	22,1	19,0 \pm 26,3	1,2 \pm 0,4 a
	A2	400	29,3	20,5	25,2	25,0 \pm 22,2	1,0 \pm 0,2 a

Les valeurs suivies de lettres différentes sont significativement différentes au seuil de probabilité de 0,05 (Test de Duncan) (S.A.S., 1995)

2- Établissement des cultures à partir de méristèmes

Comparés aux bourgeons, les méristèmes ont présenté moins de problèmes liés aux contaminants bactériens et mycéliens et à l'oxydation des composés phénoliques. Ceci pourrait être attribué à leur taille relativement réduite par rapport à celle des bourgeons, ou encore à la faible densité en micro-organismes au niveau de la zone méristématique (Limasset et Cornuet, 1949; Grout, 1990). Les pourcentages de survie relevés au bout de trois semaines ont été particulièrement importants pour les sept génotypes, indépendamment du milieu de culture, variant entre 64,3 et 96,4% (Tab.2).

Tableau 2: Pourcentages de survie des méristèmes après désinfection estimés trois semaines après la mise en culture sur les deux milieux A1 et A2 (moyenne \pm écart-type).

Génotype	Milieu	Nb.d'explants mis en culture	POURCENTAGE D'EXPLANTS			
			perdus par bactérie	perdus par champignon	perdus par oxydation	survivants
Awja	A1	70	0,0	10,0	22,8	67,2 \pm 20,0
	A2	70	0,0	0,0	35,7	64,3 \pm 1,0
Metwi	A1	80	0,0	0,0	15,0	85,0 \pm 21,2
	A2	80	0,0	0,0	26,2	73,8 \pm 3,7
Halwani	A1	86	0,0	0,0	22,1	77,9 \pm 22,0
	A2	86	1,2	0,0	5,8	93,0 \pm 1,1
Demi-Khachabi	A1	58	5,2	0,0	0,0	94,8 \pm 6,8
	A2	58	0,0	0,0	5,2	94,8 \pm 6,8
Khachabi	A1	56	0,0	0,0	5,5	94,5 \pm 1,7
	A2	56	0,0	0,0	3,6	96,4 \pm 1,7
Biadi	A1	89	0,0	0,0	16,8	83,2 \pm 7,8
	A2	88	0,0	0,0	5,7	94,3 \pm 6,8
Italia	A1	111	0,0	0,0	15,3	84,7 \pm 6,3
	A2	110	0,0	0,0	16,3	83,7 \pm 16,3

3- Maintien et multiplication des tiges issues des bourgeons

Les tiges issues des bourgeons ont été multipliées pendant cinq subcultures successives sur les deux milieux A1 et A2. Le coefficient de multiplication et l'allongement des tiges principales ont été relevés au bout de chaque subculture.

Il est important de noter que, dès la troisième subculture, des infections du type mycélien, survenant subitement dans le milieu de culture, ont fini par causer rapidement la perte totale des pousses atteintes.

D'autre part, les tiges ayant échappé aux problèmes de contamination mycélienne ont présenté au cours des subcultures successives un jaunissement nécrotique généralisé et une chute du feuillage, indépendamment du génotype et du milieu de culture. Des symptômes similaires ont déjà été observés chez le pêcher (Niyun *et al.*, 1990). D'après George (1996), ce dépérissement pourrait être dû à un excès d'ammonium, à une carence en calcium ou à un excès de la teneur en cytokinine dans le milieu de culture.

Quoi qu'il en soit, les effets du génotype, du milieu de culture et de la subculture ont été évalués au niveau des plantules ayant échappé aux problèmes précités.

Si l'on confond les résultats obtenus sur les deux milieux pendant cinq subcultures successives, l'effet du génotype a été significatif au niveau du coefficient de multiplication en faveur du génotype Demi-Khachabi avec une valeur moyenne de 3 (Fig.1). En revanche, l'allongement des tiges principales a été similaire d'un génotype à l'autre, avec des valeurs variant entre 7 et 18,5 mm.

Quant au milieu de culture, il n'a pas influencé d'une façon significative le coefficient de multiplication, ni l'allongement des tiges principales et ceci indépendamment des différences au niveau de la composition en macro-éléments (Fig.2).

Concernant l'effet de la subculture, la prolifération du matériel a été maximale au bout du quatrième repiquage, puis s'est abaissée par la suite (Fig.3); elle est restée relativement faible par rapport à celle précédemment obtenue chez le génotype Ferragnès par Rugini et Verma (1982), qui ont rapporté un coefficient de six pendant vingt-quatre subcultures successives. Quant à l'allongement des tiges principales, il n'a pas dépassé 20 mm au bout de la cinquième subculture, probablement en raison du dépérissement généralisé de la plantule signalé plus haut.

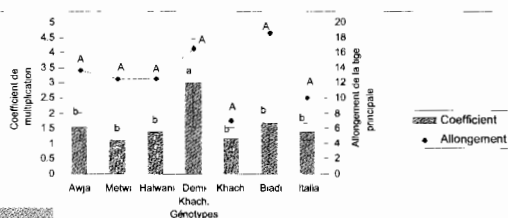


Figure 1. Effet du génotype sur le coefficient de multiplication et l'allongement de la tige principale, les deux milieux et les cinq subcultures confondus.

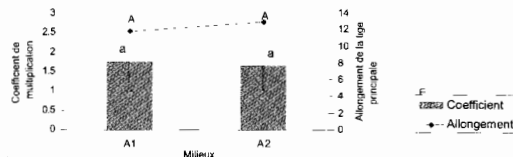


Figure 2. Effet du milieu sur le coefficient de multiplication et l'allongement de la tige principale, les sept génotypes et les cinq subcultures confondus.

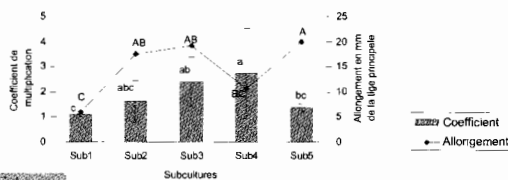


Figure 3. Effet de la subculture sur le coefficient de multiplication et l'allongement de la tige principale, les deux milieux et les sept génotypes confondus.

* Les histogrammes ou lignes surmontés de lettres différentes correspondent à des valeurs significativement différentes au seuil de probabilité 0,05 (Test de Ducan) (S.A.S., 1995). Les lettres minuscules correspondent aux histogrammes et les lettres majuscules aux lignes.

4- Maintien des méristèmes et multiplication des tiges régénérées

Les méristèmes ayant survécu à la phase d'établissement ont été repiqués sur les mêmes milieux frais. Environ 69% des explants ont été perdus par oxydation au cours du second repiquage.

Au bout de la troisième subculture, 287 tiges ont été régénérées à partir des méristèmes ayant échappé aux problèmes d'oxydation. Elles ont fait l'objet de deux autres repiquages. La prolifération de ce matériel a été relativement lente et le coefficient de multiplication n'a pas dépassé 1. Toutefois, des contaminations du type mycélien survenant subitement dans le milieu de culture ont conduit à la perte de la majorité des tiges. Seules deux tiges du génotype Italia et quatre du génotype Biadi (1 cm de longueur) ont pu échapper aux contaminants.

5- Enracinement *in vitro*

Les premières racines sont apparues au bout de quinze jours. Un mois après la mise en place de l'essai, le pourcentage d'enracinement, le nombre moyen de racines par plantule et la longueur de la racine la plus longue ont été estimés (Tab.3).

Seul le traitement T4, comprenant une étape d'induction avec une solution concentrée d'AIA pendant 4 heures à l'obscurité suivie d'un transfert sur le milieu dépourvu de régulateurs de croissance, a favorisé le développement des racines chez les quatre génotypes avec des taux variant entre 6,25 et 56,25%. Les meilleurs résultats ont été obtenus chez le génotype Demi-Khachabi avec un taux d'enracinement de 56,25% et des racines pouvant atteindre les 40 mm.

Tableau 3: Effet des sept traitements d'enracinement chez les géotypes 1, 4, 6 et 7, à raison de trente-deux plantules par traitement (moyenne \pm écart-type).

Géotype	Traitement	Pourcentage de plantules enracinées	Nb. moyen de racines par plantule	Longueur de la racine la plus longue (mm)
Awja	T0	0	-	-
	T1	0	-	-
	T2	0	-	-
	T3	0	-	-
	T4	6,25 \pm 5,25	8,5 \pm 9,2	20 \pm 2
	T5	0	-	-
	T6	0	-	-
Demi-Khacahabi	T0	0	-	-
	T2	0	-	-
	T4	56,25 \pm 3,15	6,8 \pm 4,8	40 \pm 22
Biadi	T0	0	-	-
	T1	0	-	-
	T2	0	-	-
	T3	0	-	-
	T4	6,25 \pm 5,53	4,0 \pm 1,4	23 \pm 4
	T5	0	-	-
	T6	0	-	-
Italia	T0	0	-	-
	T1	3,12 \pm 5,77	2,0 \pm 0,0	35 \pm 0
	T2	0	-	-
	T3	0	-	-
	T4	6,25 \pm 5,25	11 \pm 1,4	33 \pm 3
	T5	0	-	-
	T6	0	-	-

- Les plantules n'ont pas émis de racines.

D'autre part, le traitement T1 correspondant au milieu contenant de l'AIA (1 mg/l), a permis l'enracinement de 3,12% des tiges chez le génotype Italia (Tab.3). Pourtant, d'après les travaux de Rugini et Verma (1982), un taux d'enracinement de 55% a été obtenu chez la variété Ferragnès directement sur le milieu contenant de l'ANA ou de l'AIB (1 mg/l). L'aptitude à l'enracinement serait donc directement corrélée à la variété.

Si l'on compare ces résultats à ceux de Chamoun (2000) qui a obtenu par le traitement T4 un taux d'enracinement de 96% chez la variété Demi-Khachabi, on pourra conclure à une moindre réactivité du matériel utilisé au cours de cette étude. En effet, Chamoun a utilisé des tiges issues de la cinquième subculture, alors que le matériel utilisé dans cette étude provenait de la première subculture.

D'une façon générale, ces différences seraient probablement dues à l'âge des plantules selon le nombre des subcultures successives qu'elles ont subi auparavant. En effet, Caboni *et al.* (1997) ont montré l'existence d'une corrélation directe entre un stimulus exogène d'auxine et la teneur endogène d'AIA à la base des boutures intrinsèques à la variété. La teneur d'auxine endogène augmenterait au cours des subcultures successives et serait responsable de l'aptitude de la variété à s'enraciner.

Propagation *in vivo*

Environ dix semaines après la mise en place de l'essai et, sur 840 boutures traitées, seules quinze ont développé des racines (Tab.4).

Seul le génotype Biadi a pu émettre des racines avec toutefois un taux d'enracinement relativement faible de l'ordre de 12,5%. Le meilleur pourcentage d'enracinement a été obtenu au niveau du traitement 5000 ppm d'AIB, alors que c'est le traitement de 1000 ppm qui a le plus favorisé l'allongement des racines.

Tableau 4: Effet de différentes doses d'AIB sur l'enracinement de la variété Biadi, à raison de trente boutures par traitement.

Génotype	Concentration d'AIB (ppm)	Pourcentage de cals obtenus	Pourcentage de boutures enracinées	Nb. moyen de racines	Longueur moyenne de racines (mm)
	0	0	0	0	-
Biadi	1000	3,3	10,0 b	11,3 ± 5,5 a*	95 ± 38 a
	3000	3,3	10,0 b	8,3 ± 2,5 a	76 ± 23 ab
	5000	10,0	30,0 a	5,4 ± 3,7 a	4 ± 31b

* Les valeurs de la même colonne suivies de lettres différentes sont significativement différentes au seuil de probabilité de 0,05 (Test de Duncan) (S.A.S., 1995).

Ces résultats ne sont pas surprenants puisque la faible aptitude au bouturage ligneux a déjà été signalée chez l'amandier par de nombreux auteurs (Grasselly et Duval, 1997; Kester et Grasselly, 1987; Rugini et Verma, 1983).

CONCLUSIONS

D'une façon générale, les résultats obtenus au cours de cette étude ont permis de révéler une récalcitrance des variétés locales d'amandier à la propagation dans les conditions *in vivo*, et un meilleur potentiel à la propagation dans les conditions *in vitro*.

Il serait donc intéressant d'optimiser la procédure de propagation *in vitro* en améliorant le processus de régénération des plantules à partir de méristèmes et ceci en testant différentes périodes de prélèvement sur le pied-mère, ainsi que des traitements antioxydants pour éviter les oxydations survenant au cours des premières subcultures. Il serait également nécessaire d'optimiser l'enracinement *in vitro* selon la qualité et l'âge (nombre de subcultures) du matériel, dans l'objectif de produire des plants à planter francs de pied et surtout de privilégier les variétés locales d'amandier menacées de disparition.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- CABONI, E., LAURI, P., TONELLI, M.G., LACOVACCI, P., et DAMIANO, C., 1997. Biochemical and molecular factors affecting *in vitro* rooting ability in almond. *in*: Biology of Root Formation and Development. Plenum Press Ed. New York. 117-124 pp.
- CHALAK, L., 1995. Haplodiploïdisation et cultures cellulaires chez le Kiwi (*Actinidia deliciosa* cv. Hayward). Thèse Doct. Université de Montpellier II Sciences et Techniques du Languedoc. 217 pp.
- CHALAK, L., 1999. Rapport annuel, unité de culture des tissus. 46 pp.
- CHALAK, L., CHÉHADÉ, A., BITAR, A., ZANETTO, A. et COSSON, P., sous presse. Preliminary characterization of almond diversity in Lebanon.
- CHAMOUN, W., 2000. Propagation *in vitro* de l'amandier (*Prunus amygdalus* Batch). Mémoire de fin d'études USEK. 54 pp.
- FAO, 2000. République Libanaise Ministère de l'Agriculture. L'Agriculture Au Liban 1998 et 1999. 59 pp.
- GEORGE, E.F., 1996. Problems in initialiting and maintaining cultures. *in*: Plant propagation by tissue culture. Part 2. In practice. 639-669 pp.
- GRASSELLY, C. et DUVAL, H., 1997. L'amandier. Ctifl. 167 pp.
- GROUT, B., 1990. Meristem-tip culture. *in*: Plant cell and tissue culture, Methods in molecular biology. Pollard, J. W. and Walker, J. M. Ed. Volume 6. 81-91 pp.
- KESTER, D.E. et GRASSELLY, C., 1987. Almond Rootstocks. *in*: Rootstocks for fruitcrops. Wiley, J. and sons, Wiley Interscience Publication Ed. 1984. 265-272 pp.
- KESTER, D.E., LIU, L., DURZARD, D.J. et FENTON, C.A.L., 1986. Cherry (*Prunus avium*). *in*: Biotechnology in Agriculture and Forestry. Bajaj, Y.P.S. Ed. Volume 1: Trees I. 530-542 pp.
- LIMASSET, P. et CORNUET, P., 1949. Recherche du virus de la mosaïque du tabac (*Marmor tabaci*, Holmes) dans les méristèmes des plantes infectées. *C.R. A.C. Sci. Paris*. 228: 1971-1972 pp.

- MURASHIGE, T. et SKOOG, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiology of Plant* 15: 473-497 pp.
- NIYUN, H., ZENGHALI, Y. et GUANGMING, L., 1990. Peach. *in: Handbook of plant cell culture*. Chen, Z., Ammirato, P.V., Evan, D.A., Sharp, W.R. and Sondahl, M.R. Ed. Craw Hill. 278-299 pp.
- QUOIRIN, M., LEPOIVRE, P. et BOXUS, P., 1977. Un premier bilan de 10 années de recherches sur les cultures de méristèmes et la multiplication *in vitro* de fruitiers ligneux. *Compte-rendu des recherches 1976-1977*. Station des Cultures Fruitières et Maraîchères. Gembloux. 93-116 pp.
- RUGINI, E. et VERMA, D.C., 1982. Micropropagation and cell suspensions of a difficult to propagate almond (*Prunus amygdalus* Batsch) cultivars. *in: plant tissue culture*. Fujiwara, A. Ed., 1982. Maruzen (Tokyo). 741-742 pp.
- RUGINI, E. et VERMA, D.C., 1983. Micropropagation of difficult-to-propagate almond (*Prunus amygdalus*) cultivar. *Plant Sci. Lett.* 28. 273-281 pp.
- SAS institute Inc. 1995. SAS procedures guide. Version 6, third edition, Cary, NC: SAS institute Inc.
- SAVINO, V., DI TERLIZZI, B., DIAGIARO, M. et MUROLO, O., 1990. Certificazione delle drupacee in Puglia, *in: La sharka in Puglia, diagnosi e lotta*. Un caso concerto di intervento Ed. Italie. 131-145 pp.