

Exploitation de la variabilité somaclonale pour la recherche d'œillet (*Dianthus caryophyllus* L.) tolérant à la salinité

F. Haouala*, C. Hannachi* & E. Zid**

Keywords: Carnation- *in vitro* regeneration- Salinity- Vitrovariation

Résumé

La callogenèse chez l'œillet (*Dianthus caryophyllus* L. 'Légion d'Honneur') est induite à partir de segments d'entre-nœuds sur un milieu contenant de l'ANA 0,1 mg.l⁻¹ et du TDZ 0,1 mg.l⁻¹. La régénération des plantes à partir de cals cellulaires nécessite la présence de la BA 2 mg.l⁻¹. L'enracinement des pousses est obtenu sur un milieu contenant de l'AIB 0,5 mg.l⁻¹. La croissance des cals est très réduite et le taux de régénération est fortement affecté en présence de NaCl 100 mM. L'enracinement des pousses est meilleur en absence de NaCl. Les plantes régénérées présentent des variations somaclonales et celles obtenues sous stress salin ont une meilleure tolérance relative à la salinité que les plantes régénérées en absence de sel.

Summary

Exploitation of Somaclonal Variability for Research of Carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) Tolerant to Salinity

Callogenesis in carnation (*Dianthus caryophyllus* L. 'Légion d'Honneur') is possible from internodes in a medium containing 0.1 mg.l⁻¹ NAA and 0.1 mg.l⁻¹ TDZ. Regeneration from callus needs 2 mg.l⁻¹ BA. Shoots rooting is obtained on a medium containing 0.5 mg.l⁻¹ IBA. Callus growth is reduced and regeneration rate is very affected in presence of NaCl 100 mM. Shoot rooting is better without NaCl.

Regenerated plants present somaclonal variation and those obtained under salt stress have a better relative tolerance to salinity than plants regenerated without salt.

Introduction

La salinité des sols touche actuellement 25% environ des terres irriguées (12) et concerne plus particulièrement les zones arides et semi-arides, telles que les régions tropicales et méditerranéennes. Le fort ensoleillement et la faible pluviométrie ont obligé les agriculteurs de ces régions à irriguer en quantité importante et, souvent, avec une eau saumâtre. Les sels s'accumulent au cours des ans à la surface des sols sans pouvoir être lessivés par les faibles quantités de pluie, rendant ainsi peu à peu les terres impropres à la culture. Dans ces conditions, la culture des espèces florales, connues pour leur forte sensibilité à la salinité (13), peut être sérieusement compromise. En effet, pour l'œillet des fleuristes (*Dianthus caryophyllus* L.), le rendement en fleurs commence à baisser des pertes lorsque la conductivité électrique de l'eau d'irrigation atteint 1,2 dS.m⁻¹ (21).

Les techniques de culture *in vitro*, à l'origine des variations somaclonales et gamétoclonales, peuvent intervenir dans les programmes d'amélioration de la tolérance à la salinité. En effet, elles ont été utilisées avec succès pour sélectionner chez un certain nombre d'espèces cultivées des lignées cellulaires tolérantes à la salinité (5, 10, 16, 24). Des plantes entières ont été régénérées à partir de lignées cellulaires sélectionnées pour leur résistance à la salinité et la transmission de ce caractère de tolérance à la descen-

dance a été observée notamment chez le *Coleus* (4), le colza (9), le *Citrus* (10) et le tabac (16).

Chez l'œillet, la régénération de pousses *in vitro* est influencée par le génotype, la nature de l'explant et la balance hormonale (6). L'organogenèse peut avoir lieu à partir de divers explants, tels que l'hypocotyle (17), les cotylédons (2), les entre-nœuds (19), les feuilles (23) et les pétales (7, 11). L'initiation de pousses adventives à partir de cals cellulaires est obtenue généralement sur des milieux à forte concentration en cytokinines, telle la BA à 3 mg.l⁻¹ (11).

L'objectif de ce travail est d'étudier l'effet du stress salin (NaCl) sur la régénération *in vitro* de l'œillet et la possibilité d'exploiter cette technique dans l'amélioration de la tolérance à la salinité chez cette espèce.

Matériel et méthodes

L'étude porte sur l'œillet (*Dianthus caryophyllus* L.) super-géant Chabaud, 'Légion d'Honneur', cultivar annuel connu par ses fleurs doubles de couleur rouge vif. Le milieu de culture est celui de Murashige et Skoog (15) en ce qui concerne les macro et les oligo-éléments seulement. A partir de ce milieu de base MB, 5 autres milieux sont confectionnés pour la germination des graines, l'induction de la callogenèse (MC), la régénération des pousses (MR), la prolifération de celles-ci (MP) et leur enracinement (ME). La composition de ces milieux est signalée au tableau 1. Le pH

Abréviations: ANA: acide naphthalène acétique; BA: Benzyl-adénine; AIB: acide indolyl-butyrrique; TDZ: thidiazuron.

* Laboratoire d'Agriculture Durable. Ecole Supérieure d'Horticulture, 4042 Chott Mariem, Sousse, Tunisie.

** Unité d'Ecophysiologie Végétale et Nutrition des Plantes. Faculté des Sciences de Tunis, Campus Universitaire, 1060 Tunis, Tunisie.

Reçu le 26.04.01. et accepté pour publication le 13.09.02.

Tableau 1
Composition chimique des milieux de culture utilisés pour la germination, la callogenèse (MC), la régénération (MR), la prolifération (MP) et l'enracinement (ME) de l'œillet 'Légion d'Honneur'. Le milieu de base MB est celui de Murashige et Skoog (15) pour les macro et les oligoéléments. Le milieu MB/2 représente le milieu MB dilué 2 fois

	Germination	Callogenèse (MC)	Régénération (MR)	Prolifération (MP)	Enracinement (ME)		
milieu de base (MB)	MB/2	MB/2	MB	MB/2	MB/2		
acide nicotinique (mg.l ⁻¹)	0,5	0,5	0	0,5	0		
pyridoxine-HCl (mg.l ⁻¹)	0,5	0,5	0	0,5	0		
thiamine-HCl (mg.l ⁻¹)	0,1	0,1	1	0,1	1		
glycine (mg.l ⁻¹)	2	2	0	2	0		
myo-inositol (mg.l ⁻¹)	0	100	100	100	0		
ANA (mg.l ⁻¹)	0	0,1	0,05	1	0		
AIB (mg.l ⁻¹)	0	0	0	0	0,5		
TDZ (mg.l ⁻¹)	0	0,1	0	0	0		
BA (mg.l ⁻¹)	0	0	2	0	0		
AgNO ₃ (mg.l ⁻¹)	0	0	10	0	0		
saccharose (g.l ⁻¹)	10	30	30	20	20		
agar-agar (g.l ⁻¹)	6	8	8	8	8		
NaCl (mM)	0	0	100	0	100	0	100

des milieux de culture est ajusté à 5,8. Les cultures sont conduites à une température de 24 ± 1 °C, sous un éclairage artificiel de $35 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ et une photopériode de 16 h.

Les explants utilisés sont constitués de segments d'entre-nœuds de 5 à 7 mm de longueur et de 1 mm de diamètre, prélevés sur des plantules issues de semis. Les graines sont désinfectées à l'alcool à 70 ° pendant 5 s, puis à l'eau de Javel pendant 20 min et, enfin, ensemencées en conditions stériles jusqu'à l'obtention de plantules à 7 paires de feuilles. Les segments d'entre-nœuds sont repiqués horizontalement sur un milieu de callogenèse contenant de l'ANA et du TDZ et 2 concentrations de NaCl (0 et 100 mM). Chaque traitement comporte 48 explants. Les explants cultivés en absence de sel continuent à l'être dans toutes les étapes du protocole. De même, les explants soumis au départ à la salinité subissent cette contrainte jusqu'à la fin de la phase *in vitro*. Les cals, obtenus en présence comme en absence de NaCl, sont fragmentés et les microcals placés respectivement sur un milieu de régénération contenant du AgNO₃, additionné ou non de NaCl 100 mM. En vue de leur multiplication, les pousses régénérées ont été soumises à deux subcultures mensuelles sur un milieu de prolifération (MP). Au stade 2 paires de feuilles, les jeunes tiges sont transférées sur des milieux d'enracinement, en présence ou non de NaCl 100 mM. Chaque traitement comporte 72 explants. L'acclimatation des vitroplants se fait en mini-serre sous une humidité relative saturante et à une tempé-

rature de 25 °C. Après deux semaines, les plantules sont repiquées en pots de terre cuite de 16 cm de diamètre remplis de sable grossier. La culture est conduite en serre vitrée, jusqu'à la floraison des plantes, à une température de 25 ± 3 °C. L'arrosage est assuré avec une solution nutritive complète additionnée ou non de différentes doses de NaCl, de manière à obtenir les concentrations finales suivantes: 10, 35, 60, 85 et 110 mM NaCl. La solution 10 mM, préparée à partir d'eau courante, est prise comme témoin.

Résultats

1. Callogenèse

Le cal commence à se former d'un seul côté du segment d'entre-nœud, puis se généralise à l'ensemble de l'explant, ce qui suggère une certaine polarité de la callogenèse. Le tableau 2 montre qu'en absence de NaCl, la quasi-totalité des explants forme des cals après 3 semaines de culture. La présence de NaCl ralentit la callogenèse, sans trop modifier son taux final qui est de 92%. Sur milieu témoin, les cals sont globuleux, chlorophylliens et à structure compacte. En présence de NaCl 100 mM, les cals sont de couleur vert clair et présentent au contact du milieu de culture une légère coloration brunâtre (Figure 1). La masse de matière fraîche des cals, mesurée après 5 semaines de culture, est très affectée par la présence de NaCl dans le milieu (Figure 2). En effet, sur NaCl 100 mM, la masse moyenne des cals est de 60 mg et

Tableau 2
Pourcentage de callogenèse chez des segments d'entre-nœuds d'œillet 'Légion d'Honneur', prélevés sur des plantes-mère issues de semis *in vitro*, et cultivés sur le milieu de callogenèse (MC) en présence de NaCl 100 mM ou non (milieu témoin)

Durée de la culture	MC = MB/2 + ANA + TDZ	
	Témoin	NaCl 100 mM
semaine 1	0	0
semaine 2	93,0 ± 6,2 acd	25,2 ± 2,2 b
semaine 3	100 ± 7,1 ad	70,1 ± 5,3 c
semaine 4	100 ± 7,1 ad	80,8 ± 6,1 cd
semaine 5	100 ± 7,1 ad	92,0 ± 7,4 d

Nombre d'explants par traitement: 48.
 Les valeurs, avec intervalles de sécurité, suivies de lettres distinctes sont significativement différentes au seuil 5%.

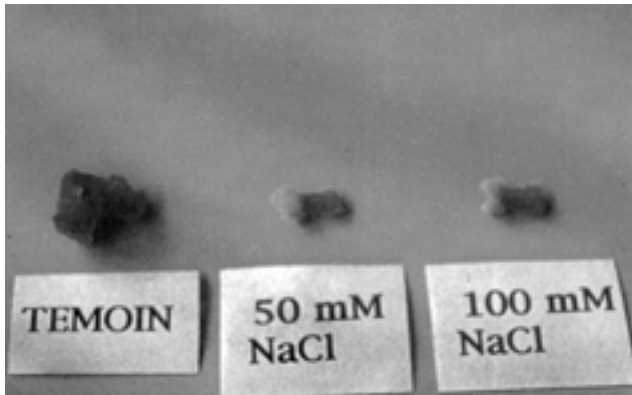


Figure 1: Aspect des cals issus de segments d'entre-nœuds d'œillet 'Légion d'Honneur', cultivés sur le milieu de callogenèse (MC) en présence de NaCl 100 mM. Le milieu témoin est dépourvu de sel.

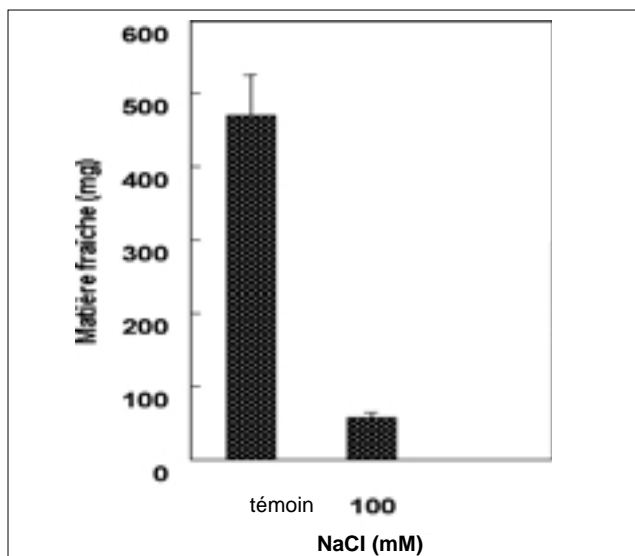


Figure 2: Masse de matière fraîche des cals issus de segments d'entre-nœuds d'œillet 'Légion d'Honneur', cultivés sur le milieu de callogenèse (MC) en présence de NaCl 100 mM. Le milieu témoin est dépourvu de sel.

ne représente plus que 12% de celle des cals témoins.

2. Régénération

Le taux de régénération obtenu après 4 semaines de culture sur milieu témoin est de 29% (Tableau 3). Sur ce milieu, les bourgeons néoformés se développent correctement donnant naissance à des pousses de couleur vert foncé (Figure 3). En présence de NaCl 100 mM, sur 1008 microcals mis en culture, un seul a permis la régénération d'une pousse.

Tableau 3
Pourcentage de régénération de pousses d'œillet 'Légion d'Honneur' à partir de cals issus de segments d'entre-nœuds sur le milieu de régénération (MR). Nombre d'explants au départ: témoin= 72; NaCl 100 mM= 1008

Durée de la culture	MR = MB + ANA + BA + AgNO3	
	Témoin	NaCl 100 mM
semaine 1	0	0
semaine 2	0	0
semaine 3	21 ± 2,3 a	0,1 ± 0 c
semaine 4	29 ± 3,3 b	0,1 ± 0 c

Les valeurs, avec intervalles de sécurité, suivies de lettres distinctes sont significativement différentes au seuil 5%.

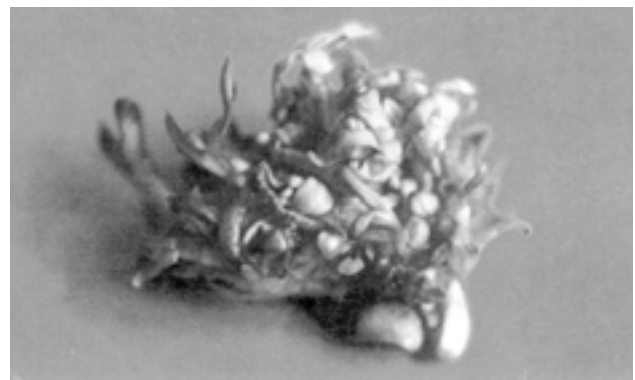
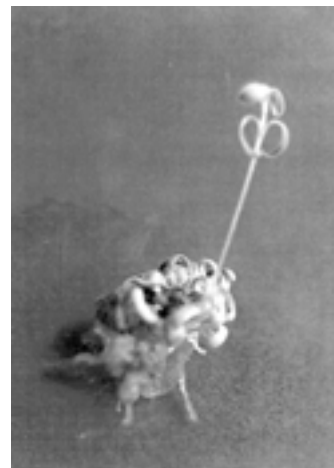


Figure 3: Régénération et croissance de pousses d'œillet 'Légion d'Honneur' à partir de cal issu de segment d'entre-nœud sur le milieu de régénération (MR).

3. Prolifération

Le taux de prolifération des pousses, après 4 semaines de culture, est légèrement diminué par la salinité du milieu. En effet, il passe de 10 chez le témoin à 8 en présence de NaCl 100 mM.

4. Enracinement

En présence d'AIB à 0,5 mg.l⁻¹, l'enracinement des pousses est satisfaisant, mais reste plus élevé en absence (93%) qu'en présence de NaCl (74%) (Tableau 4).

Tableau 4
Pourcentage d'enracinement de pousses d'œillet 'Légion d'Honneur' issues de régénération à partir de cals sur le milieu d'enracinement (ME)

Durée de la culture	ME = MB/2 +AIB	
	Témoin	NaCl 100 mM
semaine 1	0	0
semaine 2	76,6 ± 6,9 a	24,2 ± 2,5 c
semaine 3	81,2 ± 7,7 ab	48,4 ± 5,1 d
semaine 4	93,3 ± 9,2 b	74,2 ± 7,8 a

Nombre d'explants mis en culture: 72 par traitement.

Les valeurs, avec intervalles de sécurité, suivies de lettres distinctes sont significativement différentes au seuil 5%.

5. Culture en serre

Les plantules régénérées aussi bien en absence qu'en présence de NaCl, désignées respectivement vitroplants T et vitroplants S, ont montré des modifications morphologiques au cours de leur développement. Ces modifications concernent principalement l'aspect général de la fleur, la couleur des pétales, et la présence ou non de panachures. Ainsi, chez certains vitroplants, les fleurs sont simples et possèdent moins de pétales (Figure 4). Chez d'autres, les fleurs

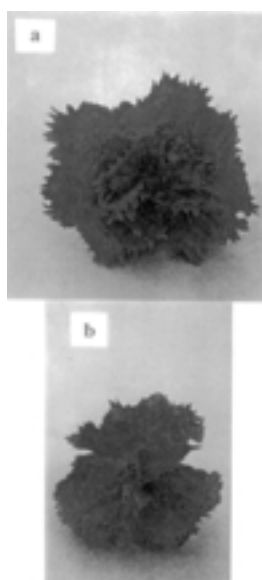


Figure 4: Vitrovariations touchant l'aspect de la fleur observées chez des vitroplants d'œillet 'Légion d'Honneur', régénérés à partir de cals et cultivés en pots sous serre: (a) fleur normale (double), (b) fleur simple.

sont roses ou gardent la couleur rouge, mais elle est moins intense. Enfin, certains individus produisent des fleurs avec une panachure de couleur blanche, plus ou moins importante des pétales. Cette panachure est surtout visible sur la face inférieure des pétales (Figure 5).

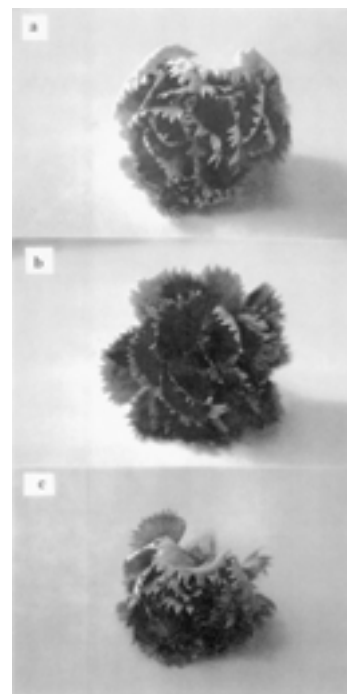


Figure 5: Vitrovariations touchant la couleur de la fleur observées chez des vitroplants d'œillet 'Légion d'Honneur', régénérés à partir de cals et cultivés en pots sous serre: (a) couleur rose, (b) couleur rouge clair, (c) présence de panachure.

Par ailleurs, la phase de développement végétatif, chez les vitroplants S, s'étale sur une période anormalement longue, dépassant une année, alors que cette période est de 5 à 7 mois seulement chez les vitroplants T. De plus, la tige présente, au moment de l'entrée en floraison, un allongement exagéré, excédant dans certains cas le double de la longueur habituellement atteinte chez les vitroplants T. Ainsi, sur le milieu témoin (NaCl 10 mM), la longueur de la tige principale à la floraison atteint 115 cm chez les vitroplants S alors qu'elle n'est que de 48 cm seulement chez les vitroplants T.

6. Evaluation agronomique

Pour pouvoir évaluer, agronomiquement, la tolérance à la salinité chez l'œillet, il est impératif de juger sa production florale. La masse de matière fraîche des fleurs produites par plante est en faveur des plantes régénérées en absence de sel (vitroplants T). Toutefois, les différences vont en s'atténuant avec l'augmentation de la concentration de NaCl dans la solution d'arrosage. L'expression de ces résultats en pourcent du témoin montre que la production florale est relativement plus affectée par le sel chez les vitroplants T (Figure 6). Ainsi, la tolérance relative à la salinité devient meilleure chez les plantes régénérées

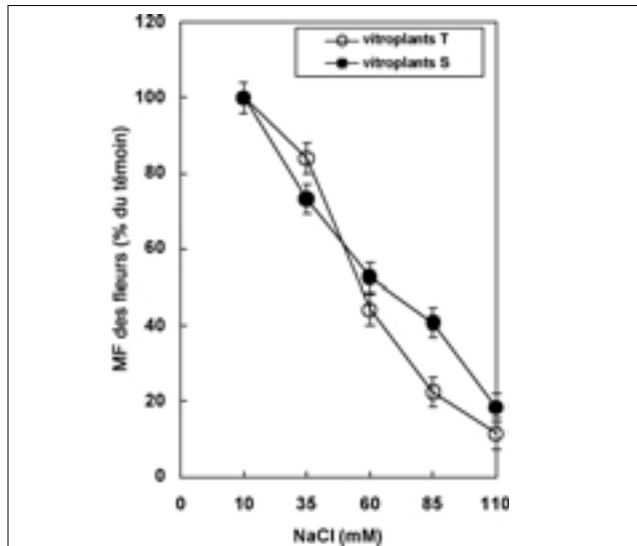


Figure 6: Effet de la salinité sur la production relative des vitroplants régénérés en absence (vitroplants T) ou en présence de NaCl (vitroplants S), appréciée par la masse de matière fraîche (MF) des fleurs produites par plante exprimée en pour-cent du témoin (NaCl 10 mM). Les plantes ont été cultivées en pots sous serre et arrosées avec des solutions à différentes concentrations de NaCl. Les intervalles de sécurité sont calculés au seuil 95%.

sous stress (vitroplants S) pour les doses de NaCl supérieures à 35 mM.

Discussion

La technique de régénération des plantes sous une pression sélective, par addition d'un agent stressant comme NaCl, a été utilisée pour diverses espèces, dans un but d'amélioration de la tolérance à la salinité. Plus particulièrement, la culture *in vitro* a permis de sélectionner des variants tolérants au sel en utilisant des cellules isolées, des cals ou des tissus organisés. Plusieurs plantes ont pu ainsi être régénérées sous stress salin à partir de cals cellulaires: orge (1), blé (18), pomme de terre (8) et *Citrus* (3).

Dans notre expérimentation, la régénération de plantes d'œillet a pu être obtenue à partir de segments d'entre-nœuds, en présence ou en absence de NaCl 100 mM dans les milieux de callogenèse et de régénération. Dans ces conditions, la salinité ralentit la callogenèse, sans l'inhiber complètement. Elle diminue le taux de callogenèse de 8%, mais c'est la croissance des cals qui est la plus affectée par le sel. D'autre part, le fait le plus marquant est que le taux de régénération sous stress salin, par néoformation à partir de cals cellulaires, est très faible et ne dépasse

pas 1 pour 1000. Cet effet inhibiteur de NaCl sur l'organogenèse a été observé chez d'autres espèces, comme la pomme de terre (8) ou le tabac (22). Des résultats similaires sont aussi obtenus par Beloualy et Bouharmont (3) chez le *Citrus* où 2 cas seulement sur un effectif de 10^4 ont présenté une aptitude à la régénération en présence de NaCl. Cette rareté des individus survivants en présence d'un agent stressant milite en faveur de l'acquisition de la tolérance.

La pression sélective par NaCl peut être appliquée pendant la phase de callogenèse et/ou de régénération. Quand la présence de sel n'inhibe pas totalement le processus de régénération lui-même, son addition dans le milieu peut augmenter la probabilité de régénération des plantes tolérantes (16). Dans la majorité des cas, le sel est appliqué d'emblée dans des conditions provoquant une inhibition marquée de la croissance cellulaire. Par contre, l'application d'une pression sélective graduelle peut favoriser la mise en place de mécanismes d'acclimatation qui ne subsistent pas toujours chez les plantes régénérées (14).

L'utilisation de la BA a facilité la régénération des pousses. En effet, cette cytokinine est connue pour ses effets stimulateurs sur la néoformation de bourgeons adventifs chez l'œillet (11, 19). Par ailleurs, l'addition d'ions Ag^+ est nécessaire pour stimuler la néoformation des bourgeons (8). Selon Songstad *et al.* (20), Ag^+ ralentit la synthèse d'éthylène, facteur défavorable à la régénération.

Les plantes régénérées à partir de cals, en absence et en présence de NaCl, ont présenté des indices de vitrovariations qui se sont exprimés essentiellement au niveau de la pigmentation de la fleur. Nous pouvons estimer que les variations somaclonales qui ont touché la coloration de la fleur (couleur rose, présence de panachure...) offrent un matériel végétal nouveau qui peut être exploité avantageusement pour la production de fleurs coupées d'œillet ou pour la décoration des jardins et des massifs. Par contre, les variations qui ont concerné l'aspect général de la fleur (fleurs simples) sont loin d'être intéressantes sur le plan commercial.

En définitive, la régénération *in vitro* de l'œillet 'Légion d'Honneur' est possible à partir de segments d'entre-nœuds. La salinité a pour effet de ralentir la callogenèse et de diminuer considérablement le taux de régénération. L'enracinement des pousses est satisfaisant en présence d'AIB $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$ et son taux est diminué par la salinité. L'exploitation de la variation somaclonale peut conduire à l'amélioration de la tolérance au sel et l'acquisition de ce caractère *in vitro* peut être transmis aux plantes obtenues par clonage.

Références bibliographiques

1. Aboel M., 1990, Selection of salt tolerant embryogenic cell lines of Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.). In: Progress in plant cellular and molecular biology. Abstract of the VIIth International Congress on plant tissue and cell culture. Ed. Nijkampa H., Vanderplas L. and Artrijk J. Kluwer Academic Publishers, Amsterdam, 146.
2. Amita J., Husain S. & Kothari S.L., 1997, Micropropagation of *Dianthus caryophyllus* L. Control of vitrification. J. Plant Biochem. Biotech. 6, 35-37.
3. Beloualy N. & Bouharmont J., 1993, Amélioration de la tolérance à la salinité par sélection *in vitro* chez deux porte-greffes de *Citrus*. In: Le progrès génétique passe-t-il par le repérage et l'inventaire des gènes? Ed. AUPELF-UREF John Libbey Eurotext, Paris, 301-304.
4. Collin H.A., Burton F.M., Ibrahim K.M. & Collins J.C., 1990, Transmission of salt tolerance from tissue culture to seed progeny in *Coleus blumei*. In: Progress in plant cellular and molecular biology. Abstract of the VIIth

- International Congress on Plant tissue and cell culture. Ed. Nijkampa H., Vanderplas L. and Artrijk J., Amsterdam, 151.
5. Dix P.J., 1980, Environmental stress resistance: selection in plant cell cultures. *In: Plant Cell Cultures: results and perspectives*. Ed. Sala I., Parisi B., Cella R. and Ciferri O. Elsevier, Amsterdam, 183-186.
 6. Frey L. & Janick J., 1991, Organogenesis in carnation. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **116** (6), 1108-1112.
 7. Gimelli F., Ginatta G.B., Ventura R. & Positano S. & Buiatti M., 1984, Plantlet regeneration from petals and floral induction *in vitro* in the mediterranean carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *Riv. Ortoflorofruitt. Ital.* **68**, 107-121.
 8. Hannachi C., 1996, Amélioration de la tolérance de la pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.) à la salinité (NaCl) par voie biotechnologique. Thèse de Doctorat, Gand (Belgique), 152 p.
 9. Jain R.K., Chowdhory J.B. & Jain S., 1990, Development of genetically stable salt-tolerant somaclones of *Brassica juncea*. *In: Progress in plant cellular and molecular biology. VIIth International Congress on plant tissue and cell culture*. Ed. Nijkampa H., Vanderplas L. and Artrijk J. Kluwer academic publishers, Amsterdam, 151.
 10. Kochba I.D., Ben Hayyim G., Spiegel-Roy R., Saad S. & Newman H., 1982, Selection of stable salt tolerant callus cell lines and embryos in *Citrus sinensis* L. and *C. aurantium* L. *Z. Pflanzenphysiol.* **106**, 111-118.
 11. Leshem B., 1986, Carnation plantlets from vitrified plants as a source of somaclonal variation. *HortScience*, **21** (2), 320-321.
 12. Levigneron A., Lopez F., Vansuyt G., Berthomieu P., Fourcroy P. & Casse-Delbart F., 1995, Les plantes face au stress salin. *Cahiers Agricultures*, **4**, 263-273.
 13. Maas E.V., 1986, Salt tolerance of plants. *Applied Agricultural Research*, vol **1**, n° **1**, 12-26.
 14. Mc Hughen A., 1987, Salt tolerance through increased vigor in a flax line (STS-11) selected for salt tolerance *in vitro*. *Theor. Appl. Genet.* **74**, 727-732.
 15. Murashige T. & Skoog F., 1962, A medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant*, **15**, 473-497.
 16. Nabors M.W., Gibbs S.E., Bernstein C.S. & Neis M.E., 1980, NaCl-tolerant tobacco plants from cultured cells. *Z. Pflanzenphysiol.* **97**, 13-17.
 17. Petru E. & Landa Z., 1974, Organogenesis in isolated carnation plant callus tissue cultivated *in vitro*. *Biologia Plant*, **16**, 450-453.
 18. Piri K., 1991, Contribution à la sélection *in vitro* de plantes androgéniques de blé pour leur tolérance au NaCl. Thèse de Doctorat, Gembloux (Belgique), 168 p.
 19. Radojevic L., Djordjevic N. & Petrovic J., 1989, *In vitro* culture techniques for carnation cultivars breeding. *Intl. Symp. In vitro Culture and Hort. Breeding*, Cesena, Italy, 30 May-3 June 1989.
 20. Songstad D.D., Armstrong C.L. & Petersen W.L., 1991, AgNO₃ increases type II callus production from immature embryos of maize inbred B 73 and its derivatives. *Plant Cell. Rep.* **9**, 699-702.
 21. Sonneveld C. & Voogt W., 1983, Studies on the salt tolerance of some flower crops grown under glass. *Plant and Soil*, **74**, 41-52.
 22. Sumaryati S., Negrutiu I. & Jacobs M., 1992, Salt and water stress resistant mutants isolated from protoplast of *Nicotiana plumbaginifolia* (Viviani). *Med. Fac. Lanbouww. Univ. Gent.* **57/4a**, 1507-1516.
 23. Takeda Y., 1978, Carnation mubyo-nae no ikusei. *In: Enqei-shokubutu no kikan to soshiki no baiyo*. Ed. S. Kako, Seibundo-Shinko-sha, Tokyo, 114-147.
 24. Zenk M.H., 1974, Haploids in physiological and biochemical research. *In: Haploids in higher plants: Advances and potential*. Ed. Kasha K.J. Univ. Guelph Press, Ontario (Canada), 339-354.

F. Haouala, Tunisien, Dr. en Biologie, Maître-Assistant, Ecole Supérieure d'Horticulture de Chott Mariem, Tunisie.

C. Hannachi, Tunisien, Dr. en Sciences Agronomiques, Maître de Conférences, Ecole Supérieure d'Horticulture de Chott Mariem, Tunisie.

E. Zid, Tunisien, Dr. es Sciences Naturelles, Professeur, Faculté des Sciences de Tunis, Tunisie.

ERRATA

Volume 20,2 page 2 de couverture, au sommaire, page 83 ainsi que page 4 de couverture au contents, lire J.T.C. Codjia au lieu de J.-C. Codjia.