

Exploitation des techniques de cultures *in vitro* pour la sélection contre *V. dahliae* chez l'olivier



IABC 2015
International
TUNISIA

A. CHAARI RKHIS^{1*}, Y. GHARBI¹, M.CHEFFI¹,
S.BACCARI², H.CHATTI¹ ET M.A. TRIKI¹

¹Institut de l'olivier. Université de Sfax. Route de l'aéroport
Km2. 3032 Sfax .Tunisie.

²Faculté des Sciences de Sfax. Université de Sfax. Route de la
Soukra Km 4.Sfax 3042.Tunisie

* Auteur correspondant: anissa_ch@yahoo.fr

Abstract - Olive tree has few enjoyed of multiple benefits of biotechnological techniques. In Tunisia, local olive cultivars were successfully micropropagated by axillary buds and tested under controlled conditions for their tolerance to *Verticillium dahliae*, which is one of the major disease affecting olive trees in Tunisia. In this study, three months old seedling belong to the cultivars Chemlali and Arbequina have been grown in liquid media containing two different concentrations of culture filtrate of *V. dahliae* (25 and 50 mL / L). After four months of growth at 24 ° C and a photoperiod of 16 hours, the number of dead plants in the two cultivars seedlings treated with the two concentrations of fungal filtrate was significantly higher than that recorded in the control group. By contrast, no significant difference was observed in the growth of tolerant plants when compared to those of the control. Tolerant seedlings were acclimated and prepared to confirm their tolerance towards *V. dahliae* infection by new tests *in vivo*. These results are important and may contribute in the improvement of olive genetic resources to control effectively some dieback diseases such as *Verticillium* wilt of olive trees and the threat of the bacterium *Xylella fastidiosa* in all the Mediterranean countries, which lay the ground to select tolerant cultivars for areas with high risk of infection.

Keywords - Olivie tree, Micropropagation, tolerance, *Verticillium dahliae*, *in vitro* culture

Résumé - La biotechnologie constitue une imposante composante de toutes stratégies de recherche relatives à l'amélioration génétique des espèces végétales. En effet, devant une demande quantitative croissante et surtout qualitative pressante, les techniques classiques employées pour la création de nouveaux individus chez végétaux sont relativement lentes et toujours limitées. En revanche, les multiples techniques biotechnologiques peuvent remédier efficacement à beaucoup d'insuffisances et raccourcir les délais par la sélection rapide de nouveaux individus. L'olivier a très peu profité des avantages de ces techniques. En Tunisie, des essais ont été entamés, dans une première phase, pour multiplier les variétés locales *in vitro* et actuellement, toutes les étapes de la micropropagation par les bourgeons axillaires sont maîtrisées et brevetées. Partant de ces résultats, des essais pour la sélection et la multiplication d'individus tolérants à la verticilliose de l'olivier ont été entrepris. De jeunes oliviers, âgés de 3 mois, issus de semis des variétés Chemlali de Sfax et Arbequina ont été cultivés *in vitro* sur des milieux liquides contenant deux concentrations de filtrat de culture de *V. dahliae* (25 et 50 ml/l préparés à partir d'une solution de 10⁴ spores/l). Après 4 mois de croissance à 24°C et à une photopériode de 16 heures, le nombre de plantes mortes est significativement plus important chez les jeunes oliviers des 2 variétés inoculées aux deux doses de filtrat fongique par rapport aux témoins sains. Alors qu'aucune différence significative n'a été observée dans la croissance des plantes inoculées vivantes et les témoins. Les oliviers tolérants ont été acclimatés et sortis à l'ombrière pour confirmer leur tolérance vis-à-vis des attaques de *V. dahliae* par d'autres tests *in vivo*. Ces résultats sont d'une importante capitale surtout avec l'aggravation de certaines maladies de dépérissement telles que la verticilliose de l'olivier et la menace de la bactérie *Xylella fastidiosa* dans tous les pays du bassin méditerranéen, ce qui obligent les intervenants dans le secteur à sélectionner le plus rapidement possible des individus sains et tolérants.

Mots clés: Olivier, Micropropagation, tolérance, *Verticillium dahliae*, culture *in vitro*



1. Introduction

L'oléiculture en Tunisie est un secteur stratégique puisqu'elle joue un rôle économique et social considérable. La forêt oléicole couvre une superficie estimée au tiers des terres arables et compte environ 67 millions d'oliviers répartis sur tout le territoire du pays. Malgré son importance, l'oliveraie tunisienne souffre d'une production en huile très fluctuante ce qui a des effets négatifs sur le secteur et le pays. L'orientation a été alors vers l'instauration des cultures intensives et mêmes hyper-intensives pour garantir une production minimale régulière. Cette orientation n'a malheureusement pas été sans dégâts. En effet, depuis quelques années, on assiste à l'émergence de nouvelles contraintes dont en particulier les agents phytopathogènes qui tirent profit du microclimat caractérisé par de fortes teneurs en humidité. Ainsi, l'expansion de plus en plus fréquente des maladies dans ce mode de culture a pour conséquence, une baisse notable de la production surtout celle des variétés sensibles. Les études épidémiologiques réalisées ces dernières années dans les principales régions oléicoles tunisiennes ont montré la présence de plusieurs cas de dépérissement sur de jeunes plantes d'oliviers issus de boutures herbacées en pépinière et en plein champ et aussi sur des oliviers âgés. Ces dépérissements et les mortalités les plus couramment observés sont généralement causés par des agents phytopathogènes, responsables de graves pourritures au niveau du collet et des racines. Plusieurs champignons telluriques, tels que *Sclerotium rolfsii*, *Armillaria mellea*, *Cylindrocarpon destructans*, *Rosellinia necatrix*, *Fusarium* spp., *Rhizoctonia* spp. et *Verticillium dahliae*, se sont montrés à l'origine des symptômes de flétrissement et de dépérissement partiel ou total de l'olivier (Boulila *et al.*, 1993 ; Triki *et al.*, 2006). Ces mêmes champignons telluriques causent également d'importants dégâts dans plusieurs pays du bassin méditerranéen (Al Ahmed 1984; Porrás Soriano *et al.* 2003 ; Erten et Yildiz 2011 ; Garcia-Ruiz *et al.* 2014...).

L'une des maladies les plus graves est la verticilliose de l'olivier, causée par le *Verticillium dahliae* (Triki *et al.* 2006 et 2011 ; Jimenez-Díaz *et al.* 2012). Cette maladie est à l'origine de dégâts considérables sur l'olivier et sur plusieurs espèces fruitières et maraîchères. En Tunisie, depuis sa première apparition dans la région de Sidi Bouakkazine (Triki *et al.* 2006), plusieurs cas de verticilliose ont été signalés dans d'autres régions oléicoles du pays. Cette maladie est responsable de pertes économiques sérieuses, notamment, dans les jeunes plantations. Dans les zones affectées, le nombre de pieds d'oliviers attaqués est très important et ne cesse d'augmenter chaque année, surtout que les agriculteurs ignorent l'origine de cette maladie et les moyens de lutte (Gharbi 2015). En raison de l'inefficacité des fongicides dans la lutte contre la verticilliose (Arias- Calderon *et al.* 2015a ; b), l'utilisation de plantes exemptes de l'agent pathogène *V. dahliae* est l'une de mesures fondamentales de contrôle pour empêcher sa propagation vers des sols non infectés (Porrás Soriano *et al.* 2003 ; López-Escudero *et al.* 2004 ; Bubici et Cirulli 2012)

Ainsi, la recherche et l'utilisation de variétés tolérantes représentent les moyens les plus adéquats pour lutter contre de telles maladies, compte tenu du fait que dans l'espèce *Olea europaea*, existe une variabilité génétique importante pour la tolérance à plusieurs pathogènes (Arias- Calderon *et al.* 2015a ; b ; Gharbi 2015 ; Leon *et al.* 2015)

Les techniques de culture *in vitro* pour la sélection de plantes tolérantes ont été employées pour plusieurs espèces vis-à-vis des stress biotique et abiotique (Kumar *et al.* 2008 ; Rai *et al.* ; 2011 ; Varma *et al.* 2013...). En effet, le recours à cette technologie permet non seulement la sélection de nouveaux individus intéressants mais aussi la réduction du temps et du coût de cette opération. De telles approches, faciles et simples, ont été appliquées pour la sélection de sujets tolérants aussi bien pour les monocotylédones que les dicotylédones et pour les espèces annuelles ou pérennes contre plusieurs pathogènes en utilisant généralement des filtrats de culture dans les milieux de culture pour les stress biotiques (Tal 1994 ; Kumar *et al.* 2008 ; Rai *et al.* 2011 ; Verma *et al.* 2013...)

Dans le présent papier, le filtrat de culture liquide de *Verticillum Dahliae* a été additionné aux milieux de culture *in vitro* de l'olivier en vue de sélectionner des cultivars tolérants.

2. Matériel et méthodes

2.1. Matériel végétal

Les 2 variétés d'olivier utilisées dans cette recherche sont : (i) Chemlali Sfax, la plus cultivée en Tunisie, connue par sa rusticité, son adaptation aux conditions aride et semi aride et est appréciée pour la qualité de son huile. Elle peuple environ les 2/3 de l'oliveraie tunisienne. Sa sensibilité aux

maladies telluriques est généralement élevée notamment le *V. dahliae* (Triki et al. 2014, Gharbi 2015).

(ii) Arbequina est la deuxième variété testée, originaire d'Espagne, elle est surtout employée dans les plantations intensives et hyper intensives. Elle est sensible aux maladies telluriques telles que le *V. dahliae* (Therios 2009 ; Triki et al. 2014).

2.2. Méthodes.

2.2.1. Germination et obtention de plantules d'olivier

Les amandons des olives des deux variétés issus d'hybridation libre, une fois débarrassés de leur endocarpe, sont mis à germer après leur stérilisation sur un milieu simple formé d'eau et d'agar (6g/L) dans des boîtes de Pétri selon Maalej et al. (2002) à l'obscurité à 25°C (± 1). Après la germination (figure 1a), les jeunes plantules sont transférées d'une façon stérile sur des milieux de croissance liquides formés de la moitié des éléments du milieu MS (Murashigue et Skoog, 1962) additionnés de saccharose (30 g/L). Elles sont maintenues pendant 3 mois dans une chambre de croissance où l'intensité lumineuse est de 2500 Lux assurée par des tubes fluorescents, la photopériode est de 16 heures et la température est de 25°C (± 1 °C) (Figure 1b)

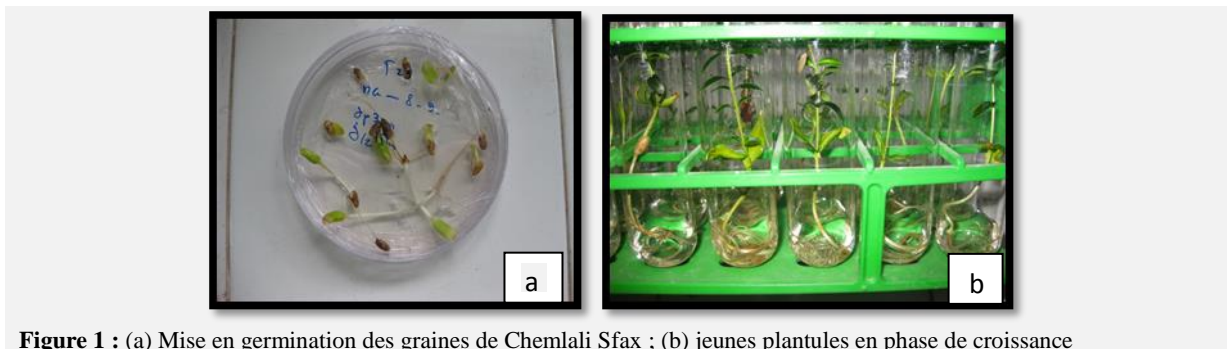


Figure 1 : (a) Mise en germination des graines de Chemlali Sfax ; (b) jeunes plantules en phase de croissance

2.2.2. Préparation du filtrat de *V. dahliae*

Les filtrats de cultures de *V. dahliae* ont été préparés à partir de milieu de culture liquide (PDB) additionné d'extraits de levure à raison de 1 g/L. Ce milieu a été inoculé par un fragment mycélien prélevé d'une culture pure âgée de 7 jours sur milieu PDA. Après 5 jours d'agitation à une température de 25 °C à l'obscurité, la culture liquide est ajustée à une concentration de 10^4 spores mL^{-1} puis centrifugée à 3000 tr/min pendant 15 min et enfin filtrée à l'aide d'un filtre seringue de 0.22 μm (Triki et al. 2014).

2.2.3. Milieux de culture

Aux termes de trois mois de croissance, les plantules issues de la germination et ayant développées 3 à 4 paires de feuilles et des racines sont transférées sur de nouveaux milieux liquides contenant la moitié du MS (Murashigue et Skoog, 1962), additionnés de filtrat de culture de *V. dahliae* à raison 25 ml. L^{-1} et 50 ml L^{-1} de milieu de croissance tout en employant comme témoin un milieu qui ne renferme pas de filtrat fongique. Trente plantes par milieu (3 répétitions de 10 plantules) sont employées pour chaque milieu et chaque variété. Les vitro-plants sains (témoins) et inoculés sont par la suite placés dans les mêmes conditions de culture à une intensité lumineuse de 2500 Lux ; une photopériode de 16 heures et une température de 25°C (± 1 °C) pendant 4 mois.

2.2.4. Suivi des cultures

Le suivi des cultures s'est traduit par un relevé hebdomadaire de l'apparition des symptômes typiques de la verticilliose (chlorose, flétrissement, dessèchement,...) ou de toxicité pendant 16 semaines. Aussi, la mesure la longueur de la tige principale (c'est la distance qui sépare les feuilles cotylédonaire du bourgeon terminal) au début de l'expérience et à sa fin a été enregistrée.

2.2.5. Transfert des oliviers tolérants

Au bout des quatre mois de culture et quand l'apparition de nouveaux symptômes de toxicité devient rare, les oliviers indemnes de toutes attaques ont été repris. Une partie a été réservée pour la

multiplication in vitro (1/3) selon Chaari-Rkhis (2013) et une deuxième partie (2/3) a été sortie des conditions de culture in vitro pour l'acclimatation.

2.2.6. Les analyses statistiques

Les analyses statistiques des données ont été faites en utilisant le logiciel SPSS20 (Statistical Package for the Social Sciences) suivant la procédure ANOVA (analysis of variance) avec l'utilisation du test de Duncan au seuil de 0,05.

3. Résultats de discussion

3.1. Taux de germination et transfert sur les milieux de croissance

Le suivi de la germination des graines des deux variétés a permis de conclure que le milieu utilisé formé d'agar et d'eau était suffisant pour réaliser des taux de germination assez élevés au bout de 2 mois de mise à la germination. En effet, on a enregistré 90 % et 75 % de graines germées respectivement pour Chemlali et Arbéquina. Les graines germées sont reprises et mises sur le milieu 1/2 de MS de culture pour croître pendant 3 mois. Les plantules régénérées sont ensuite transférées sur de nouveaux milieux liquides (Milieu Témoin) et d'autres milieux témoins mais additionnés respectivement de 25 ml L⁻¹ ou de 50 ml L⁻¹ de filtrat de culture de *V. dahliae*. Le tout est soumis à une intensité lumineuse de 2500 Lux, une photopériode de 16 heures et une température de 25°C (± 1°C) pendant 4 mois.

3.2. Symptômes de toxicité

Le suivi de la croissance des plantules d'olivier sur les trois milieux a montré des effets néfastes sur l'aspect des feuilles et des racines par l'apparition de diverses altérations morphologiques surtout au niveau des milieux additionnés de filtrat. Ces altérations sont plus accentuées chez les plantes traitées par la forte dose de filtrat du champignon à partir des premières semaines de mise en culture.

Elles se manifestent par l'apparition de chlorose et une décoloration plus ou moins prononcée des feuilles dues principalement à un manque de chlorophylle. Elle peut provenir suite à une carence en certains éléments indispensables à la synthèse de la chlorophylle (Fodor 2002; Lindberg et Greger 2002). Il y a aussi l'apparition de nécroses foliaires qui commencent soit à partir de l'extrémité (nécroses apicales), soit à partir des bordures (nécroses marginales) puis se propagent progressivement sur toute la surface du limbe foliaire qui apparaît à la fin toute brune (Figure 2 a et b). Ces mêmes symptômes ont été décrits aussi par Triki et al. (2014) ; Gharbi (2015) et Arias- Calderon et al. (2015a et b) sur l'olivier infesté par le *V. dahliae* sur le terrain et dans les conditions de serre.

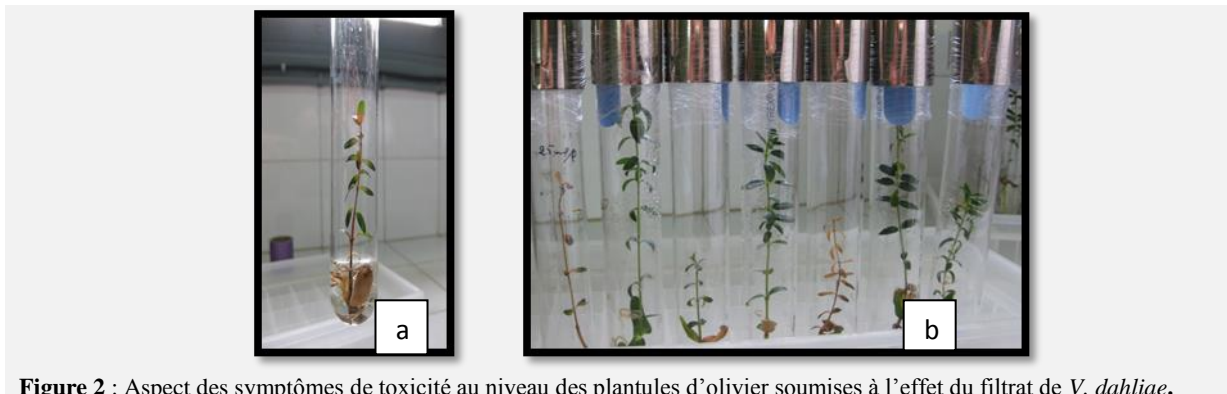


Figure 2 : Aspect des symptômes de toxicité au niveau des plantules d'olivier soumises à l'effet du filtrat de *V. dahliae*.

3.3. Cinétique de réponse et taux de plantes tolérantes

Le suivi de la cinétique de l'apparition d'indices de toxicité sur les jeunes oliviers mis sur les trois milieux de culture a permis de constater qu'au bout de la troisième semaine, les symptômes de flétrissement commencent à apparaître pour les deux variétés testées (Figure 3).

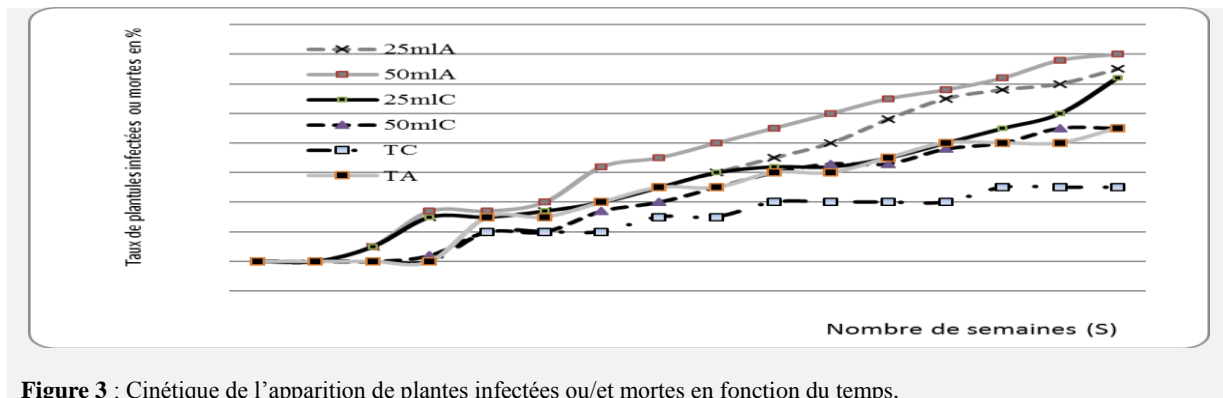


Figure 3 : Cinétique de l'apparition de plantes infectées ou/et mortes en fonction du temps.

Les plantules des deux variétés ont des comportements légèrement différemment sur les trois milieux de croissance. Ainsi pour la variété Arbequina, les premières apparitions de symptômes sont observées au cours de la troisième semaine de mise en culture sur les milieux additionnés de 25 ou 50 ml L⁻¹ de filtrat. Au terme du premier mois, le taux d'infection reste inférieur à 20% et n'atteint des valeurs élevées qu'au alentour du quatrième mois (figure 3). En effet, à la fin de cette période, on peut constater que sur le milieu additionné de 25ml L⁻¹ ; 56% des plantes sont mortes et 35% sont vivantes (Tableau1). Alors que sur le milieu contenant 50 ml L⁻¹ de filtrat ; 66 % des plantes sont mortes. Pour la variété Chemlali, si les premiers symptômes de toxicité apparaissent dans les mêmes délais que pour l'Arbequina, il n'en est pas de même pour les taux finaux d'infection puisque sur le milieu contenant 50 ml L⁻¹ de filtrat ; 55% des plantules sont vivantes et indemnes de toutes attaques (Tableau1). Les plantes témoins des deux variétés n'ayant pas subi l'effet du filtrat de *V. dahliae*; présentent néanmoins des symptômes de toxicité et aussi des plantes mortes. On peut supposer qu'il y a d'autres facteurs de stress qui ont participé à la perte de ces plantules surtout après l'étalement de la période de culture *in vitro* sur quatre mois. Pour tous les traitements, c'est la variété Arbéquina qui semble la plus sensible aux conditions stressantes de culture.

Arias-Calderon et al. (2015a et b) signalent l'apparition des premiers symptômes de toxicité au niveau d'hybrides d'olivier à partir de la deuxième semaine du trempage des racines dans une solution contenant le *V. dahliae*. Ils soulignent que pour la variété Frantoio, connue par sa résistance à la verticilliose de l'olivier, les premiers symptômes de toxicité n'apparaissent qu'après environ un mois. Toutefois un taux de 23% des plantes de cette variété en présentent après quatre mois de l'inoculation par le *V. dahliae*.

Ce comportement laisse supposer que la résistance ou la sensibilité pour ce champignon ne sont pas strictes.

Tableau 1 : Pourcentages des plantules d'olivier vivantes, présentant des symptômes de toxicité ou mortes au bout de 4 mois de croissance sur les milieux contentent les filtrats de *V. dahliae* (25 et 50 ml/L de milieu) et le milieu témoin

		Plantes vivantes	Plantes vivantes avec des symptômes de toxicité	Plantes mortes
TEMOIN	Chemlali	75±15	5±5	20±6
	Arbéquina	55±5	13±5	32±6
Milieu +25 ml/l de filtrat	Chemlali	38±5	9±2	53±15
	Arbéquina	35±5	9±2	56±5
Milieu +50 ml/l de filtrat	Chemlali	55±10	11±6	34±6
	Arbéquina	30±5	4±9	66±5

3.4. Croissances des vitro-oliviers

Le suivi de la croissance en hauteur des oliviers (tolérants) non touchés par les symptômes de toxicité et les oliviers témoins a permis de récapituler dans le tableau 2 les données relatives aux élongations respectives des deux variétés aux termes de quatre mois de culture. Il apparaît qu'aussi bien pour les plantules d'Arbequina que pour celles de Chemlali, les accroissements en hauteur enregistrés sur les milieux additionnés de filtrat de *V. dahliae* sont comparables à ceux relevés au niveau des oliviers témoins. Ceci montre qu'au moins après quatre mois de culture, les individus tolérants, semblent capables de croître normalement en présence du filtrat de culture de *V. dahliae*.

Tableau 2 : Variation de la hauteur des plantules en cm des jeunes oliviers au cours de la période de l'expérimentation (Les moyennes sont suivies des écarts types; les moyennes suivies par les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes au seuil de 0,05)

	Hauteur moyenne initiale (cm)		Hauteur moyenne 4 mois après traitement (cm)	
	Chemlali	Arbéquina	Chemlali	Arbéquina
Témoin	4.1±0.5c	4.84±0.5b	5.32±0.7b	6.63±0.5a
Milieu +25 ml/l de filtrat	4.49±1.2b	4.98±0.5b	5.52±1.1a	6.49±0.7a
Milieu +50 ml/l de filtrat	5.3±0.7b	3.7±1.1c	6.9±1.0a	5.12±0.5b

3.5. Transfert des oliviers tolérants et leur multiplication

Au terme des quatre mois de croissance, les jeunes oliviers tolérants ont été divisés en deux lots en vue de tester deux procédures de sélection. Une partie (environ les deux tiers pour les deux variétés et les trois milieux) a été sortie pour l'acclimatation *ex vitro* (Tableau 3) selon la technique décrite par Chaari-Rkhis et al (2011). La partie restante a subi la micropropagation *in vitro* (Tableau 3). Ainsi, les plantules sont débarrassées de leurs racines et leurs pousses feuillues sont coupées en fragments uninodaux qui ont été remis de nouveau sur le milieu de multiplication MM (Chaari-Rkhis et al. 2011): c'est la phase de multiplication à l'issue de laquelle des vitro-pousses sont régénérées. L'étape suivante est la phase d'enracinement. Les *in vitro*-pousses, ayant 3 à 4 nœuds et après avoir trempées leur base pour quelques secondes dans une solution auxinique (4g L⁻¹ d'Acide Indole Butyrique), sont plantées dans des plaques en polystyrène contenant du terreau (Figure 4a) couvertes et mises sous serre (80% d'humidité relative et le chauffage basal est réglé à 25± 1°C). Après quelques jours passés dans la serre, commence l'émission racinaire (Figure 4b). Les taux d'enracinement, sont élevés et atteignent 90% après 2 mois.

Les petites plantules enracinées sont alors à moitié acclimatées (Figure 4c). Le développement de leurs racines est plus rapide et plus important que celui de la partie végétative. Elles sont transférées par la suite à l'ombrière pour terminer au bout de 4 à 6 mois la phase d'acclimatation et être prêtes pour la plantation en plein champ (Photo 4c).

Tableau 3 : Effectifs des oliviers transférés *in vitro* pour la multiplication ou *ex vitro* pour l'acclimatation par variété et par milieu.

	Témoin		Milieu+25ml/l		Milieu+50ml/l	
	<i>In vitro</i>	<i>Ex vitro</i>	<i>In vitro</i>	<i>Ex vitro</i>	<i>In vitro</i>	<i>Ex vitro</i>
Arbéquina	6	10	5	5	4	5
Chemlali	6	16	5	5	6	10

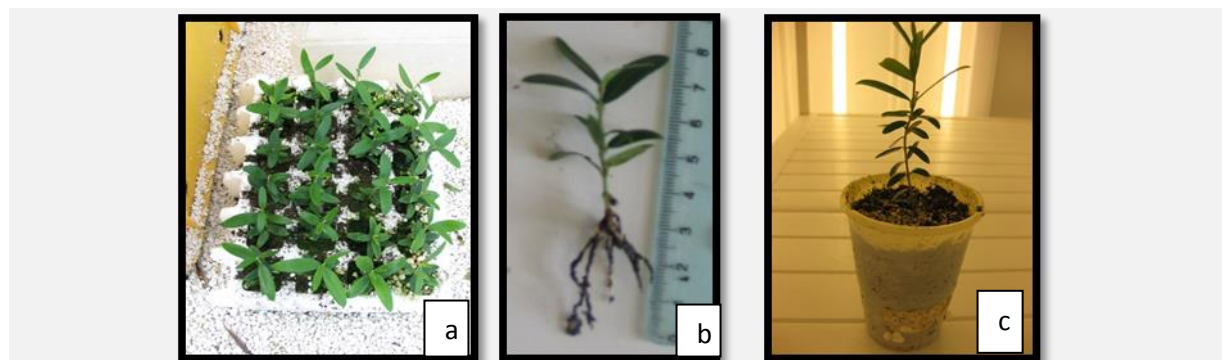


Figure 4 : Etapes de l'enracinement *ex vitro* de l'olivier, (a) Les *in vitro*-pousses en phase d'enracinement dans une plaque en polystyrène, (b) Jeune olivier enraciné, (c) jeune olivier en fin de phase d'acclimatation.

4. Conclusion

Malgré la sensibilité de la Chemlali et de l'Arbéquina au *V. dahliae*, des oliviers issus de semis de ces 2 variétés ont présenté des signaux de tolérance et ce après avoir cultivé ces oliviers en conditions de culture *in vitro* sur des milieux additionnés de filtrat de culture de ce champignon. Cependant, le niveau de tolérance devrait être vérifié sur le champ dans les plus brefs délais. Aussi, il est important

de tester, dans le cadre des recherches futures, les performances agronomiques de ces obtentions et comprendre les mécanismes de tolérance déployés par l'olivier. La technique de culture *in vitro* s'est montrée rapide et efficace et peut être utilisée pour la sélection chez presque toutes les espèces vis-à-vis de plusieurs types de stress.

Nos résultats sont d'une importance capitale surtout avec l'aggravation de la verticilliose de l'olivier et la menace de la bactérie *Xylella fastidiosa* dans tous les pays du bassin méditerranéen, ce qui oblige les intervenants dans le secteur à sélectionner le plus rapidement possible des individus sains et tolérants.

5. Références

- Al-Ahmad M (1984)** Decline of olive trees in southern Syria. Arab J Plant Protection 2:70–76.
- Arias-Calderon R, Rogriguez-Jurado D, Bejarano-Alcazar J, Belaj A, de la Rosa R, Leon L (2015a)** Evaluation of Verticillium wilt resistance in selections from olive breeding crosses. Euphytica 206:619–629.
- Arias-Calderon R, Leon L, Bejarano-Alcazar J, Belaj A, de la Rosa R, Rogriguez-Jurado D (2015b)**. Resistance to Verticillium wilt in olive progenies from open-pollination. Sci Hort 185:34-42.
- Boulila M, Mahjoub M, Romdhani M S, Ben Othman M N (1993)**. La maladie du pourridié-agaric observée dans des oliveraies Tunisiennes. OEPP Bulletin 23:447-448
- Bubici G, Cirulli M (2012)** Control of Verticillium wilt of olive by resistant rootstock. Plant Soil 352:363-376.
- Chari Rkhis A, Maalej M, Drira N, Standardi A (2011)** Micropropagation of olive tree (*Olea europaea* L.) cv 'Oueslati'. Turk J Agric For 35: 403-412.
- Chari Rkhis A. (2013)** Production de plants d'olivier par la technique de la culture *in vitro*. BREVET D'INVENTION Numéro 22361 / INNORPI (Tunisie) 13pp.
- Erten L, Yildiz M (2011)** Screening for resistance of Turkish olive cultivars and clonal roots stocks to Verticilliumwilt. Phytoparasitica 39: 83–92
- Fodor F (2002)** Physiological responses of vascular plants to heavy metals. In: Physiology and Biochemistry of Metal Toxicity and Tolerance in Plants. Prasad M.N.V. and Strzalka K. eds., Kluwer Academic Publishers, Netherlands: 149-177.
- Garcia-Ruiz GM, Trapero C, Del Rio C, Lopez-Escudero FJ (2014)** Evaluation of resistance of Spanish olive cultivars to Verticillium dahliae in inoculations conducted in greenhouse. Phytoparasitica 42:205–212.
- Gharbi Y (2015)** Etude du polymorphisme génétique de Verticillium dahliae, agent de la verticilliose de l'olivier. Thèse de doctorat en Biologie.Faculte des Sciences de Sfax.249pp
- Jiménez-Díaz R M, Bubici G, Jiménez-Gasco M M, Antoniou P P, Tjamos EC (2012)** Verticillium Wilt, A Major Threat to olive Production: Current Status and Future Prospects for its Management. Plant Dis 96: 304-329. doi.org/10.1094/PDIS-06-11-0496.
- Kumar J V, Ranjitha Kumari B D, Sujatha G, Castaño E (2008)** Production of plants resistant to *Alternaria carthami* via organogenesis and somatic embryogenesis of safflower cv. NARI-6 treated with fungal culture filtrates. Plant Cell Tiss Organ Cult 93:85-96.
- Leon L, Velasco L, De la Rosa R (2015)** Initial selection steps in olive breeding programs. Euphytica 201:453–462.
- Lindberg S, Greger M, (2002)** Plant genotypic differences under metal deficient and enriched conditions. In : Physiology and Biochemistry of Metal Toxicity and Tolerance in Plants, Prasad M.N.V. et Strzalka K. eds, Kluwer Academic Publishers, Netherlands: 357-393.
- Lopez-Escudero FJ, Mercado-Blanco J (2011)** Verticillium wilt of olive: a case study to implement an integrated strategy to control a soil-borne pathogen. Plant Soil 344:1–50
- Lopez-Escudero FJ, Del Rio C, Caballero JM, Blanco-Lopez MA (2004)** Evaluation of olive cultivars for resistance to Verticillium dahlia. Eur J Plant Pathol 110:79–85
- Maalej M, Chari-Rkhis A, Drira N, Trigui A (2002)** In Vitro Germination of Seeds of Three Tunisian Olive Varieties. Acta Hort 586: 903-906
- Murashige T, Skoog F (1962)** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15:473-479.
- Porrás Soriano A, Soriano Martín M L, Porrás Piedra A (2003)** Grafting olive cv. Cornicabra on rootstocks tolerant to *Verticillium dahliae* reduces their susceptibility. Crop Protection 22: 369–374
- Rai M K, Kalia R K, Singh R, Gangola M P, Dhawan A K (2011)** Developing stress tolerant plant through *in vitro* selection-an overview of recent progress. Environmental and experimental botany 71:89-98
- Tal M (1994)** In vitro selection for salt tolerance in crop plants: Theoretical and practical considerations. In vitro-Plant 30:175-180.
- Therios I (2009)** Olives. Crop Production Science in Horticulture 18. Wallingford, UK: CABI Publishing. Editors: Atherton J and Rees A. ISBN 978-84593-458-3. 409pp
- Triki M A, Hassairi A, and Mahjoub M (2006)** Premières observations de *Verticillium dahliae* sur olivier en Tunisie. EPPO Bulletin 36:69-71

- Triki M A, Krid S, Hsairi H, Hammemi I, Ioos R, Gdoura R, Rhouma A (2011)** Occurrence of *Verticillium dahliae* defoliating pathotypes on olive trees in Tunisia. *Phytopathol Mediterr.* 50:267–272.
- Triki M A, Hassairi H, Ben Amar F, Gharbi Y, Hammami I, Krid S, Khabou W, Rhouma A, Cheffi M, Gdoura R (2014)** Evaluation of susceptibility of the most cultivated olive trees cultivars in Tunisia to *Verticillium* wilt disease (*Verticillium dahlia*). Proceeding des Journées Scientifiques Olivebioteq 2014. 3-6 Novembre 2014 Amman- Jordanie (in press).
- Verma D, Ansar M W, Agrawal G K, Rakwal R, Shukla A, Tuteja N (2013)** *In vitro* selection and field responses of somaclonal variant plants of rice cv PR113 for drought tolerance. *Plant Signal Behav.* 8:e23519, dx.doi.org/10.4161/psb.23519