

Culture *in vitro* de la renoncule des fleuristes (*Ranunculus asiaticus* L.)

I. Néof ormation et multiplication végétative *in vitro* de plantes à partir de tronçons de thalamus

J Meynet *, A Duclos

INRA, Station d'amélioration des plantes florales, La Gaudine, Fréjus, 83370 Saint-Aygulf, France

(Reçu le 5 septembre 1989 ; accepté le 4 janvier 1990)

Résumé — La base du réceptacle femelle (thalamus) peut donner lieu à des néoformations de plantes qui ont été multipliées ou enracinées *in vitro*. Les conditions physico-chimiques de culture sont décrites ; nous soulignons en particulier la stimulation du processus d'organogenèse par le 2,4-D et l'inhibition de la rhizogenèse par la glutamine et le glyco-colle. Provenant de clones généralement infectés par plusieurs virus dont le virus de la mosaïque du concombre, les plantes obtenues à partir de thalamus peuvent être saines ou recèlent parfois la présence d'un potyvirus, mais le CMV a été éliminé. Elles sont conformes aux phénotypes d'origine.

***Ranunculus asiaticus* / néoformation / propagation / enracinement / multiplication conforme**

Summary — *In vitro* culture of Persian buttercup (*Ranunculus asiaticus* L.). I. Neof ormation and micro-propagation of plants from stumps of thalamus. The cold, darkness and 4 combinations of growth regulators were tested to induce *in vitro* neof ormation of plants from several organs. The plants obtained were multiplied and rooted in physicochemical conditions of *in vitro* culture which are described (table I); particularly the organogenesis is stimulated by 2,4-D, and rooting is inhibited by glutamin and glycin (tables II and III). This method allowed us to establish *in vitro* culture in 27 out of the 34 different genotypes observed. Obtained from clones generally infected by several viruses, the plants neof ormed through thalamus *in vitro* culture were either healthy or occasionally had a potyvirus (table IV), but the cucumber mosaic virus was eliminated. They were identical to the original phenotypes.

***Ranunculus asiaticus* / neof ormation / propagation / rooting / true to type multiplication**

INTRODUCTION

La renoncule des fleuristes ou renoncule des jardins (*Ranunculus asiaticus* L.) est une espèce florale bien adaptée au climat méditerranéen et sa culture connaît aujourd'hui un regain d'intérêt. Cette espèce est très sensible à plusieurs viroses (Devergne *et al*, 1969 ; Ragozzino, 1972 ; Elliot *et al*, 1988) et à des champignons transmis par ses racines tubérisées appelées «griffes» (Ponchet *et al*, 1969 ; Gullino et Garibaldi, 1984). Pour ces raisons, la diffusion de variétés clones par éclats de griffes est très risquée et difficile. Aussi avons-nous choisi comme stratégie de sélection la création de variétés hybrides

de clones (Meynet, 1984). Cette démarche nécessite une bonne maîtrise de la multiplication végétative pour disposer de clones parentaux en effectifs suffisants (quelques centaines de plantes) et en bon état sanitaire compatibles avec les exigences d'une production grainière industrielle. Plusieurs auteurs ont cherché à mettre au point une méthode de culture *in vitro*, notamment par culture d'apex végétatif (Maïa *et al*, 1973 ; Lercari *et al*, 1984) ; les contaminations bactériennes presque systématiques rendent cette méthode très aléatoire et exigent des effectifs de plantes importants. Nous avons essayé de mettre en culture des organes aériens, dans l'espoir qu'ils soient moins contaminés. Comme la

* Correspondance et tirés à part

renoncule est une plante en rosette, ces organes apparaissent nécessairement après l'induction florale. Nous avons donc exploré les capacités morphogénétiques des différentes pièces florales en formation. Sachant, par ailleurs, que les tissus floraux expriment chez de nombreuses espèces une bonne aptitude à l'organogenèse (Margara, 1982), nous avons traité en particulier dans cette première partie de l'utilisation du réceptacle femelle, le thalamus.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

Matériel végétal

L'expérimentation porte essentiellement sur des clones parentaux d'hybrides commerciaux. Sélectionnés dans des familles consanguines (2 à 6 générations de croisements frère x sœur), ils sont souvent peu vigoureux et se multiplient faiblement. Après 5 à 8 années de culture en serre et de division de griffes, les effectifs varient de 25 à quelques centaines de plantes ; la plupart de celles-ci sont, d'autre part, infectées par le virus de la mosaïque du concombre (CMV) qui a été détecté spécifiquement par le test Elisa.

Ces clones sont implantés en octobre dans une serre maintenue à une température minimale de +4 °C, ils fleurissent de façon continue de mi-janvier à début mai de sorte que des boutons floraux sont disponibles pendant une grande partie de l'hiver.

Pour des essais préliminaires nous avons utilisé des plantes provenant de semis *in vitro* d'une variété hybride relativement homogène «Friandine 2059». Outre sa facilité d'obtention, ce matériel avait l'avantage d'être *a priori* indemne de tout agent pathogène.

Néoformations de plantes à partir d'organes floraux

a) Dans un premier essai, 3 clones, C119-2, S118-1-4-7, S22-1-15, ont été retenus. En janvier 1987, des boutons encore bien fermés ont été prélevés. Ils ont été immédiatement désinfectés par passage successif dans les différents bains d'éthanol à 70° pendant 30 s, d'hypochlorite de calcium 15g.l⁻¹ pendant 20 min, et d'eau stérile 3 fois pendant 3 min. Quatre organes ont été prélevés et mis en culture : la partie terminale du pédoncule coupée longitudinalement en 2 moitiés, les sépales, la base des pétales avec leur glande nectarifère, le thalamus entier portant des ovaires bien différenciés à la base et au stade de primordia au sommet.

Ces différents explants ont été répartis dans des boîtes de Petri de 55 mm de diamètre contenant un milieu de Murashige et Skoog (1962) dilué de moitié et complété avec Fe EDTA (EDTA = Ethylène diéthylamine-tétracétique) 65 mg.l⁻¹, myoinositol 100 mg.l⁻¹, acide nicotinique 5 mg.l⁻¹, thiamine.HCl 1 mg.l⁻¹, pyridoxine.HCl 1mg.l⁻¹, pantothénate de calcium 1 mg.l⁻¹, saccharose 20 g.l⁻¹, gélose 8 g.l⁻¹. Le pH a été ajusté à 5,8 avant la stérilisation à l'autoclave à 115 °C pendant

20 min. Quatre milieux numérotés de BI à BIV se différenciant uniquement par la nature et les équilibres en substances de croissance sont décrits dans le tableau I.

Après 6 semaines, tous les explants sains ont été transférés sur un milieu de multiplication analogue au milieu BI additionné de 50 mg.l⁻¹ de glutamine et de 50 mg.l⁻¹ de glyco-colle. Toute la phase de vitroculture a été réalisée dans une chambre climatisée à 18 °C et éclairée pendant 10 h par des tubes fluorescents (12 W.m⁻² environ).

Tableau I. Composition en substances de croissance des milieux de culture utilisés (mg.l⁻¹).

	BI	BII	BIII	BIV
Benzyladenine (BA)	0,5	0,5	0,5	0,5
Acide indolylacétique (AIA)	0,5	0	0	0
Acide 2,4-dichlorophénoxy-acétique (2,4-D)	0	0,1	0	0,1
Acide naphthalèneacétique (ANA)	0	0	0,5	0,5

b) En mars de la même année, les clones C119-2 et S118-1-4-7 ont servi de donneurs de thalamus uniquement, mais ceux-ci ont été sectionnés transversalement en 3 tronçons et mis en culture sur le seul milieu BII. Les boutons floraux ont séjourné (froid +) ou non (froid -) à 2 °C pendant 7 j avant leur mise en culture.

Les explants sont maintenus (obscurité +) ou non (obscurité -) à l'obscurité à 18 °C, pendant 6 semaines, ils sont ensuite transférés sur un milieu neuf BII pour 4 semaines puis sur le milieu de multiplication.

c) Pendant les mois de février et mars 1988, 34 génotypes non apparentés ont fait l'objet d'un essai de mise en culture *in vitro* selon une procédure unique : les boutons ont été prétraités à 2 °C pendant 7 j, 3 tronçons de thalamus par bouton ont été placés sur milieu BII pendant 6 semaines à l'obscurité puis 4 semaines sous un éclairage de 10 h de jour.

Multiplication et enracinement *in vitro*

Depuis 1984, de nombreux essais préliminaires ont été réalisés avec des plantes provenant de semis *in vitro* pour améliorer les techniques de Maïa *et al* (1973) qui visaient essentiellement à assainir le clone virosé «Barbaroux» par culture *in vitro* du méristème apical. Différentes combinaisons de substances de croissance, plusieurs équilibres de macro-éléments, plusieurs concentrations de saccharose... ont été essayés et ont contribué à la mise au point des milieux de multiplication et d'enracinement aujourd'hui employés. Nous ne décrivons ici qu'un essai portant sur l'adjonction au milieu BI de 3 acides aminés, le glyco-colle, la glutamine et l'acide aspartique. Ces acides aminés ont été utilisés à la dose de 200 mg.l⁻¹ et toutes les combinaisons présence/absence ont été testées. Vingt plantules par traitement élémentaire ont fait l'objet de notations : taux de multiplication, élongation foliaire, enracinement après 18 et 30 j.

Transfert en conditions horticoles et modalités de culture des plantes obtenues

Les plantes néoformées à partir de thalamus, multipliées et enracinées *in vitro*, ont été transférées sur un terreau horticole de façon échelonnée d'octobre à décembre, elles ont été élevées pendant 3 semaines dans une chambre climatisée à 18 °C éclairée 12 h avec des lampes à vapeur de sodium (environ 100 W.m⁻²), puis implantées dans une serre maintenue à une température supérieure à 4 °C. L'épanouissement des premières fleurs a été observé au début de février pour les plantes sorties de tubes en octobre et à la mi-mars pour celles sorties en décembre.

Observation en serre du matériel obtenu

L'état sanitaire des plantes cultivées en serre a été noté selon des indices visuels (présence de mosaïque sur feuilles, de panachure sur fleur ou autres symptômes); des tests Elisa révélateurs de CMV, des indexages sur tabac et chénopode et des observations en microscopie électronique ont été pratiqués, en utilisant des feuilles juvéniles prélevées juste avant l'initiation du premier bouton floral, par A Berling (GRISP-Antibes).

La conformité au clone de départ a été jugée notamment sur des caractéristiques florales : ramification de la hampe, morphologie du bouton et des pétales, duplication, coloris de la fleur épanouie...

Enfin le grossissement des griffes et les capacités de reproduction par graines du matériel obtenu ont été appréciés.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Néoformations de plantes

Influence du type d'organe et du milieu de culture

Les pétales se sont allongés, ont verdi puis se sont nécrosés et sont morts sans donner de néoformation (sauf une exception sur le milieu BIV).

Les sépales et les pédoncules floraux n'ont pratiquement pas évolué. En revanche les thalamus ont donné des résultats positifs qui sont rapportés dans le tableau II.

Seuls les milieux BII et BIV ont permis d'obtenir des plantes cultivables en serre. Le fait que ces 2 milieux contiennent du 2,4-D souligne l'importance de cette substance pour la néoformation de plantes à partir de thalamus. Toutes les néoformations obtenues provenaient de carpelles bien structurés de la base du réceptacle femelle.

Quelques bourgeons végétatifs bien organisés et individualisés ont pu apparaître directement à la surface de l'explant selon un processus morphogénique comparable à celui observé sur des capitules de gerbera par exemple (Pierik *et al*, 1973). Mais, le plus souvent, les premières manifestations de l'organogenèse s'expriment sous forme de feuilles gaufrées et recroquevillées (fig 1). Après un ou plusieurs repiquages sur le milieu de multiplication, une plantule ou de petites touffes se différencient à partir des tissus sous-épidermiques de la formation foliacée initiale. Ce phénomène paraît être stimulé par le

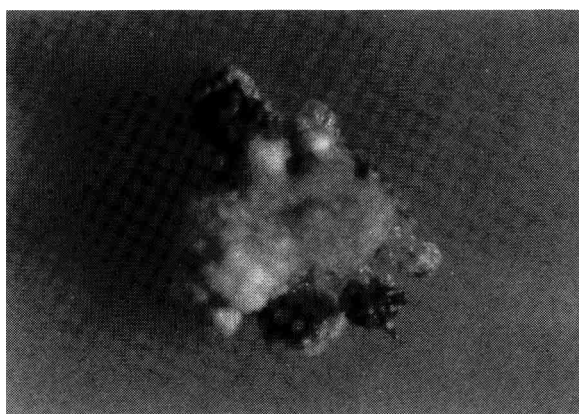


Fig 1. Néoformation de bourgeons observée sur tronçon basal de thalamus cultivé *in vitro*.

Tableau II. Influence du milieu de culture et du clone de départ sur la fréquence des néoformations observées sur thalamus. MC = nombre de thalamus mis en culture ; S : nombre de thalamus non contaminés ; PI : nombre de thalamus ayant donné au moins une plante observée en serre.

	BI			BII			BIII			BIV		
	MC	S	PI	MC	S	PI	MC	S	PI	MC	S	PI
C 119-2	8	3	0	8	3	2	8	2	0	8	2	1
S 118-1-4-7	8	3	0	8	2	1	8	3	0	8	4	1
S 22-1-15	8	1	0	8	2	1	8	1	0	8	2	0
Total	24	7	0	24	7	4	24	6	0	24	8	2

2,4-D. En effet, il a pu être reproduit après un transfert, pour une durée de 4 semaines sur un milieu BII, de plantes provenant de plusieurs cycles de multiplication par bourgeonnement axillaire et présentant à l'origine des feuilles «normales».

Le taux de contamination bactérienne (71% sur l'ensemble des essais réalisés) est élevé mais non rédhibitoire dans la mesure où chaque plante issue de griffe peut fournir 5 à 25 boutons floraux, et cette technique ne compromet pas la survie des plantes mères.

Effets d'un prétraitement par le froid et d'une culture à l'obscurité

Les facteurs physiques testés n'ont pas d'effets sur les différents paramètres observés : la fré-

quence des néoformations (tableau III), la vitesse d'apparition de plantules différenciées et le taux de contamination bactérienne.

Sur les 22 plantes ainsi obtenues, 18 proviennent du tronçon basal, 4 du tronçon médian, aucune de la zone apicale.

Influence du facteur génotypique

Les contaminations bactériennes ont été très fréquentes ; presque toujours, les 3 tronçons d'un même bouton étaient affectés simultanément ; cependant, dans 2 cas, le tronçon basal restait sain et même apte à régénérer une plante alors que le tronçon apical était contaminé. Le tableau IV indique que, sur 407 prélèvements, 128 présentent au moins 1 tronçon de thalamus apparemment sain après 3 repiquages, soit un

Tableau III. Effets d'une culture à l'obscurité et d'un prétraitement par le froid sur la fréquence des néoformations observées sur thalamus. N1 = nombre de thalamus ayant donné au moins 1 plante après 1 repiquage sur milieu de multiplication tous génotypes confondus ; N2 = après 2 repiquages ; N3 = après 3 repiquages ; N4 : après 4 repiquages.

	Obscurité +						Obscurité -					
	Froid +		PI	Froid -		PI	Froid +		PI	Froid -		PI
	MC	S		MC	S		MC	S		MC	S	
C 119-2	12	5	5	12	4	3	12	5	3	12	3	3
S 118-1-4-7	12	5	3	12	4	2	12	7	2	12	5	1
N1			4			1			0			0
N2			8			4			2			2
N3			-			5			4			4
N4			-			-			5			-

Tableau IV. Influence du génotype sur la fréquence des néoformations observées sur thalamus, l'état sanitaire et la conformité phénotypique des plantes obtenues. Viroses : - = sans symptômes ; X = symptômes de mosaïque/feuilles ; X - = certains sous-clones présentent des symptômes, d'autres aucun ; ? = douteux.

Code génotype	MC	S	PI	Virose	Conformité	Code génotype	MC	S	PI	Virose	Conformité
R2	7	2	1	X	X	R22	18	2	1	-	X
R4	8	0	0			R23	14	3	3	? -	X
R5	11	0	0			R24	18	7	5	?	X
R8	12	10	7	-	X	R25	8	2	2	X -	X
R9	15	10	9	-	X	R26	9	1	0		
R10	8	4	0			R27	13	2	1		
R11	18	14	9	-	X	R28	2	0	0		
R12	18	6	6	X -	X	R29	7	3	1	-	X
R13	14	6	4	X	X	R30	8	2	1		
R14	15	3	2	X -	X	R31	14	3	0		
R15	16	4	2	-	X	R32	12	2	0		
R16	14	3	1	?	X	R33	7	3	2	-	X
R17	8	3	1	-	X	R34	5	1	1		
R18	10	5	4	-	X	R35	10	1	0		
R19	14	6	5	-	X	R36	12	2	1		
R20	19	3	1	?	X	R40	8	2	1	X	X
R21	18	10	8	-	X	Ba	17	3	3	-	?
Total							34	407	128	82	

taux de contamination moyen de 68% des explants mis en culture. Toutefois, ce taux semble varier beaucoup selon les génotypes (de 2/12 pour R8 à 11/11 pour R5).

La base du thalamus est très favorable à l'organogénèse, puisque 64% des tronçons basaux non contaminés régénèrent au moins 1 plante. Vingt-sept génotypes sur les 34 testés ont pu être ainsi mis en culture *in vitro*. Dans l'état actuel de ce travail, compte tenu des effectifs observés, rien ne nous permet d'affirmer que les 7 clones restants sont rebelles à ce procédé de régénération et, dès à présent, nous pouvons estimer que la méthode de néoformation de plantes par culture de tronçons basaux de thalamus est applicable à une gamme très large de renouëles.

Multiplication et enracinement

Les plantules isolées ou associées en touffes s'enracinent facilement sur presque tous les milieux expérimentés, même s'ils contiennent une cytokinine. D'autre part, les plantules découpées et transférées sur tous les milieux dépourvus de 2,4-D se multiplient par bourgeonnement axillaire. Dans ces conditions générales, les résultats du tableau V doivent être soulignés : certains acides aminés ont un effet déterminant sur la croissance *in vitro*, en particulier la rhizogénèse. La glutamine et le glyocolle inhibent l'enracinement, en revanche l'acide aspartique favorise l'élongation foliaire, la croissance et la tubérisation des racines. La relation entre le métabolisme azoté et le fonctionnement racinaire paraît évidente chez cette espèce.

Le milieu qui s'est révélé le plus favorable à la multiplication par bourgeonnement axillaire est un milieu analogue à B1 enrichi de 50 mg/l de

glutamine, 50 mg/l de glyocolle et de 30 g/l de saccharose. Pour l'enracinement et l'assurance d'un bon transfert en conditions horticoles, c'est le milieu de Tulecke (1963) (caractérisé notamment par une teneur très faible en ion ammonium) dilué de moitié, dépourvu d'acides aminés et de substances de croissance, qui s'est avéré le meilleur.

Observation en serre du matériel obtenu

Alors que de nombreuses plantes dans la plupart des clones de départ utilisés étaient infectées par le virus de la mosaïque du concombre, ce virus n'a été retrouvé dans aucune des jeunes plantes analysées par le test Elisa. Ce résultat demande à être confirmé en affinant les observations virologiques au niveau :

– des plantes mères. La répartition virale en leur sein peut être hétérogène : elles pourraient présenter soit des secteurs sains, comme l'ont observé Lecoq *et al* (1982) sur piment, et engendrer, après éclats de griffes, des populations partiellement saines, soit des gradients de concentration avec des teneurs nulles ou très faibles de particules virales au niveau du thalamus au moment du prélèvement ;

– des plantes issues de culture *in vitro*. Le test pratiqué sur des jeunes plantes avant l'initiation florale n'a peut-être pas permis de détecter le CMV si sa teneur initiale était très faible (Digat, 1982). Il sera donc refait sur ce même matériel après sa tubérisation.

Par ailleurs, bien qu'elles soient indemnes de CMV, certaines plantes régénérées présentent des symptômes de mosaïque sur feuilles qui peuvent être très sévères (tableau IV). Les indexages de ces plantes réalisés sur tabac et chénopode se sont avérés négatifs. Cependant

Tableau V. Effets de 3 acides aminés sur le taux de multiplication et le développement *in vitro* des renouëles. Multiplication : X = taux < 1,5 ; XX = 1,5 < taux < 2,5 ; XXX = taux > 2,5. Élongation foliaire : X = L < 1,5 cm ; XX = 1,5 < L < 2,5 cm ; XXX = L > 2,5 cm. Enracinement : nombre d'explants enracinés sur 20 observés. * Certaines racines étaient tubérisées.

Glyocolle mg/l	0	200	0	0	200	200	0	200
Glutamine mg/l	0	0	200	0	200	0	200	200
Ac aspartique mg/l	0	0	0	200	0	200	200	200
Multiplication	XX	XX	XX	X	XX	X	X	XXX
Élongation foliaire	X	X	X	XXX	X	X	X	XX
Enracinement après 18 j	9	1	0	9	0	0	2	0
Enracinement après 30 j	19	9	8	20 *	3	11	11	5

des observations en microscopie électronique ont révélé la présence d'un virus flexueux qui pourrait correspondre au virus de la renoncule (RV) décrit par Elliot *et al* (1988) et transmissible, selon ces mêmes auteurs, seulement sur le pied-d'alouette (*Delphinium consolida*) parmi une large gamme d'hôtes testés. Les symptômes de mosaïque sont parfois exacerbés sur les plantes issues d'*in vitro* par rapport au matériel de départ. Ce fait pourrait indiquer que ce virus, à la faveur de la multiplication *in vitro*, se trouve davantage concentré dans les plantes ou qu'une co-infection (avec le CMV ou des bactéries) atténue son expression.

Conformité phénotypique

Avec les marqueurs disponibles (essentiellement des caractéristiques florales), toutes les plantes régénérées sont phénotypiquement conformes à leurs plantes mères. Seul le clone «Barbaroux» (Ba) paraît avoir une descendance douteuse ; en effet certaines hampes portant les premières fleurs sont quelquefois fasciées, cette fasciation sporadique est apparue dans chacun des 3 sous-clones.

Par rapport au matériel d'origine multiplié par éclats de griffes, le nombre de graines produites par les plantes obtenues après multiplication *in vitro* est supérieur, les griffes produites sont plus grosses et se multiplient davantage.

Ces meilleures performances agronomiques pourraient être l'expression d'une restauration de l'état sanitaire.

CONCLUSION

La néoformation de plantes à partir de tronçons basaux de thalamus chez la renoncule des fleuristes est possible sur des clones parentaux de variétés hybrides même si ces clones sont représentés par de très faibles effectifs, virosés et contaminés par des bactéries endogènes.

Quelques plantes, dont l'état sanitaire et les performances agronomiques ont été restaurés, ont été obtenues. Leur conformité phénotypique à leur plante mère permet d'espérer une conformité de leurs descendances sexuées aux hybrides de clones actuellement commercialisés.

D'autres plantes s'avèrent être infectées par un virus flexueux qui se manifeste par des symptômes très sévères de mosaïque foliaire. L'éradication de ce virus par culture *in vitro* du méristème apical peut désormais être tentée dans la mesure où les effectifs de matériel de départ ne sont plus limitatifs, la multiplication *in vitro* restant efficace malgré la contamination virale.

Enfin, au cours de la mise au point des méthodes de multiplication *in vitro*, d'importantes différences variétales ont été relevées ; cette variabilité des réponses génotypiques, relative notamment au taux de prolifération, permet d'envisager la possibilité de diffuser des variétés clones.

REMERCIEMENTS

Nous remercions A Berling du GRISP (Groupement Régional d'intérêt scientifique phytosanitaire) d'Antibes qui a assuré, toutes les analyses et études virales et E Berthélé qui a contribué aux observations en serre.

RÉFÉRENCES

- Devergne JC, Cardin L, Marais A (1969) Isolement de quelques virus infectant la renoncule cultivée, *Ranunculus asiaticus* L, dans le Sud-Est de la France. *Ann Phytopathol* 1 hors-série, 321-328
- Digat B (1982) Elimination de virus par culture de méristèmes. In: *La culture in vitro et ses applications horticoles*. Technique et Documentation Lavoisier, Paris, 126 pp
- Elliot MS, Zettler FW, Gallegati M, Ko NJ (1988) A potyvirus infecting *Ranunculus asiaticus*. *Acta Horti The Hague* 234, 39-43
- Gullino ML, Garibaldi A (1984) Le principali malattie fungine del ranuncolo. *Coltura Protette* 10, 76-78
- Lecoq H, Pochar E, Pitrat M, Laterrot H, Marchoux G (1982) Identification et exploitation des résistances aux virus chez les plantes maraîchères. *Cryptogam Mycol* 3, 333-345
- Lercari G, Accati Garibaldi E, Littardi M (1984) Primi risultati sull'impiego della coltura *in vitro* del ranuncolo. *Coltura protette* 10, 73-75
- Maia E, Bettachini B, Beck D, Marais A (1973) Régénération de renoncules par culture d'apex *in vitro*. *Ann Phytopathol* 5, 2, 125-129
- Margara J (1982) Réversion vers l'état végétatif d'apex inflorescentiels. In: *Bases de la multiplication végétative. Les méristèmes et l'organogenèse*. INRA, 103, 165-174
- Meynet J (1984) Propagazione e selezione del ranuncolo. *Coltura Protette* 10, 61-68
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue culture. *Phys Plantarum* 15, 473-497
- Pierik RLM, Steegmans HHM, Marelis JJ (1973) Gerbera plantlets from *in vitro* cultivated capitulum explants. *Sci Horti Amst* 1, 117-119
- Ponchet J, Mercier S, Augé G (1969) Une maladie nouvelle de la renoncule cultivée. *Ann Phytopathol* 1 hors-série, 203-207
- Ragozzino A (1972) Due malattie di virus del ranuncolo in Campania. *Riv Ortoflorofrutticoltura Ital* 56, 157-161
- Tulecke WC (1963) Cell proliferation from pollen of *Torreyia nucifera*. *Contrib Boyce Thomson Inst* 22, 153-163