

# Le câprier

## Caractérisation et multiplication

A. Ghorbel<sup>1</sup>

A. Ben Salem-Fnayou<sup>1</sup>

S. Khouildi<sup>1</sup>

H. Skouri<sup>1</sup>

F. Chibani<sup>1</sup>

## Introduction

La câpiculture connaît un essor à l'échelle mondiale à travers la création de câprières modernes à haut rendement. Cette culture est basée sur la production de boutons floraux ou câpres, condiment très apprécié pour diverses préparations culinaires et jouissant de propriétés antiscorbutiques (Chervin, 1897). Les câpres sont considérées comme ayant une action synergique de la vitamine C, elles sont riches en rutinoside et en ferments (Schauenberg et Paris, 1977) et sont souvent préconisées contre les maladies rhumatismales.

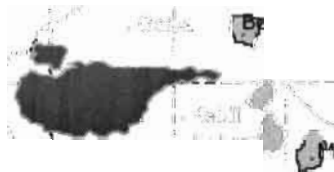
En Tunisie, le câprier se développe dans des conditions particulièrement favorables. Cet arbrisseau y croît spontanément dans les sols les plus défavorisés, jouant ainsi un rôle socio-économique capital dans plusieurs régions semi-arides et arides. La câpiculture offre l'avantage d'être peu exigeante en eau, en investissement, et d'être tolérante aux conditions édaphiques les plus sévères (températures extrêmes, vents forts, sols pauvres, manque d'eau...).

---

<sup>1</sup> Laboratoire d'Adaptation et d'amélioration des plantes, INRST, BP 95, 2050 Hammam-Lif, Tunisie.

Cependant, plusieurs difficultés relatives à la caractérisation de cette espèce d'une part et à son mode de multiplication d'autre part freinent son extension. En effet, l'absence d'une taxonomie précise du câprier tunisien et la grande diversité des variétés existantes posent un problème pour l'intensification de la câpriculture. Ceci d'autant plus que le mode de multiplication traditionnel essentiellement par semis donne un faible pourcentage de germination et une hétérogénéité tant en termes de productivité qu'en termes de qualité des câpres (Barbera, 1991). Le bouturage ligneux, basé sur l'utili-

M'hamed, 1996), ne semble pas donner de meilleurs résultats. C'est pourquoi, des travaux basés sur le polymorphisme des protéines enzymatiques et des marqueurs moléculaires ont été entrepris dans le cadre de cette étude. Parallèlement, des essais de multiplication herbacée et de micropropagation du câprier ont été abordés avec deux objectifs : 1) de rechercher et d'évaluer la variabilité génétique du câprier tunisien et 2) d'améliorer les pourcentages d'enracinement et de reprise afin d'augmenter donc le taux de production de plants de câprier.



Les systèmes enzymatiques étudiés sont : l'isocitrate déshydrogénase (ICD), la malate déshydrogénase (MDH), la 6-phosphogluconate déshydrogénase (6-PGD), la phosphoglucomutase (PGM), la glucose phosphate isomérase (GPI) et la glutamate oxaloacétate transaminase (GOT). Pour la révélation des systèmes enzymatiques, les gels ont été incubés à 37 °C pendant 30 mn dans des tampons contenant les substrats spécifiques. Les techniques de révélation sont celles décrites par Pasteur *et al.* (1987) et Arulsezar et Parfitt (1986). Parmi les six systèmes révélés, seuls la GPI, la PGM, la 6-PGD et l'ICD ont été retenues en raison de leur bonne résolution, leur reproductibilité et surtout leur polymorphisme.

### *Caractérisation moléculaire*

L'analyse a été effectuée sur 72 plants de câprier dont 53 collectés sur tout le territoire tunisien et 19 prospectés en Italie centrale (fig. 2). L'ADN a été extrait à partir de feuilles fraîches de chaque plante selon la méthode de Dellaporta (Dellaporta *et al.*, 1983). Les feuilles peuvent aussi être conservées au congélateur.

Afin de choisir les amorces les plus adéquates aux réactions RAPD, une série de PCR a été réalisée avec 60 amorces Operon (séries B, R et S). Deux génotypes différents (tunisien et italien) ont été choisis pour ces réactions de criblage (Khouildi *et al.*, 2000). Parmi les 60 amorces utilisées, 10 ont été ciblées suivant 3 critères : a) le polymorphisme révélé chez les deux populations, b) la reproductibilité de la réaction et c) la qualité du profil électrophorétique. Ces amorces sont ensuite appliquées aux 72 génotypes collectés. Un total de 54 bandes polymorphes a été détecté sachant que chaque réaction a été répétée au moins deux fois et seules les bandes polymorphes et stables ont été retenues.

Les bandes révélées ont été converties en une matrice composée de 0 (absence) et de 1 (présence) pour les 54 marqueurs RAPD retenus. Afin d'établir les analyses statistiques, le logiciel GDA a été utilisé ; chaque marqueur a été considéré comme étant un locus individuel.



■ Figure 2.  
Carte de distribution des écotypes de câprier  
en Tunisie et en Italie.

### *Multiplication herbacée*

Les essais ont concerné aussi bien des variétés inermes qu'épineuses de câpriers tunisiens. Des pousses herbacées ont été prélevées à partir de pied-mères obtenus *in vitro* et/ou *ex-vitro* et conduits sur pains de laine de roche, dans une serre contrôlée. Les pousses sont aussi-

tôt débouturées en portions à « 2 yeux », en éborgnant l'œil basal. Les boutures herbacées sont ensuite imprégnées à leur base d'AIB (exubérone) et insérées dans des mini-blocs de laine de roche imbibés de solution nutritive à pH 6 et CE 2 mS.cm<sup>-1</sup>. L'ensemble étant traité par un fongicide (Thyrame, 3 g.l<sup>-1</sup>), est installé dans des conditions d'humidité saturante sous mini-serres à 24 °C, sous 25 Wm<sup>-2</sup> d'énergie lumineuse et 16 h de photopériode. Le séjour des boutures dure 5 à 8 semaines au bout desquelles il y a développement des pousses axillaires et émission des racines. L'acclimatation progressive des plants commence alors avec l'ouverture progressive de la mini-serre. Au bout d'une semaine, les plants sont prêts à la transplantation en pots.

### *Micronntration*

Le matériel végétal a été prélevé sur des plantes de *Capparis spinosa* L. cultivées dans la parcelle d'expérimentation et dans la serre contrôlée. Il s'agit de rameaux semi-lignifiés âgés de deux semaines. Ces rameaux sont rincés avec une solution concentrée de benlate puis fragmentés en boutures de 2,0 cm uni ou binodales. Les boutures sont ensuite trempées dans une solution d'hypochlorite de calcium concentrée (110 g.l<sup>-1</sup>) pendant 20 mn. Après trois rinçages à l'eau distillée stérile, les explants sont cultivés dans des tubes à essai (200 x 20) contenant 20 ml de milieu de culture. Ce dernier est composé du milieu de base MS (1962) additionné de 3 % de saccharose. Les régulateurs de croissance utilisés sont la BAP (1,0 mg.l<sup>-1</sup>) pour la multiplication, l'ANA (0-0,5-1,0-1,5-2,0), l'AIB (0-0,5-1,0-1,5-2,0) et l'AIA (0-1,0-1,5-2,0) pour l'enracinement. Le pH du milieu de culture est ajusté à 5,6 avant l'autoclavage à 116 °C pendant 24 mn.

Les cultures sont incubées sous une température de 25 ± 2 °C le jour et 19 ± 2 °C la nuit, une lumière de 12 Wm<sup>-2</sup> et une photopériode de 12 h. Les vitropousses utilisées dans l'essai d'enracinement proviennent : 1) d'implants ayant subi deux subcultures seulement. Ils sont souvent très vigoureux avec des tiges vigoureuses ; 2) d'implants obtenus après deux subcultures et étioilées ; 3) d'implants obtenus après plus de cinq subcultures avec alternance des milieux de culture MS (1962) et MS (1962) dilué au quart, et ce, afin d'obtenir des cultures épuisées avec des pousses vert jaunâtre et fili-

formes. Les trois lots sont ensuite cultivés sur les milieux de culture composés du milieu de base MS (1962) additionné de différentes auxines à des concentrations variables tel que indiqué antérieurement. Au cours de la phase d'enracinement, qu'il s'agisse du milieu de culture MS liquide, solidifié par 0,8 % d'agar ou employant un pont de papier filtre, les implants sont soit cultivés en position couchée soit plantés dans le milieu de culture.

## ■ Résultats et discussion

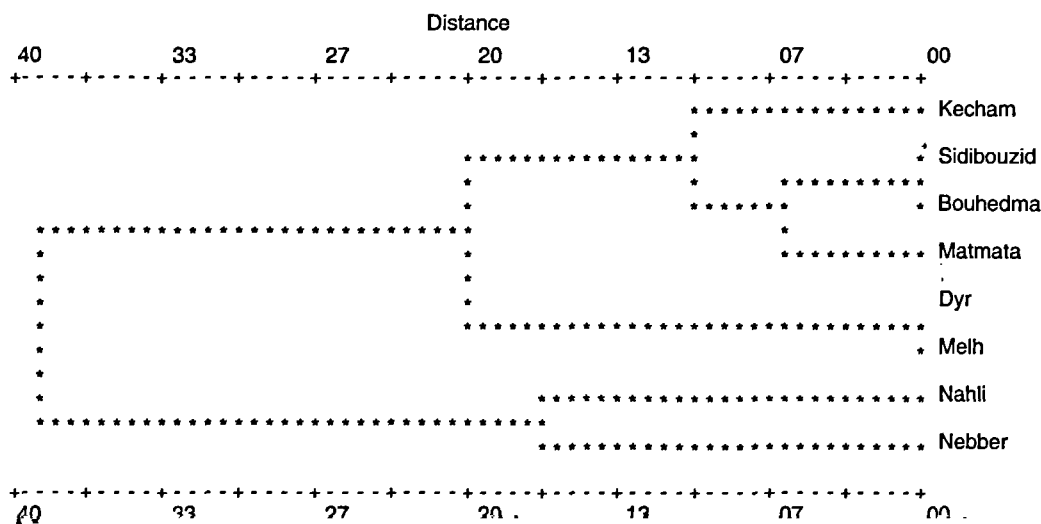
### *Caractérisation isoenzymatique*

L'analyse des profils électrophorétiques obtenus avec les quatre systèmes enzymatiques révélés a montré une très grande diversité du câprier tunisien : sept profils différents ont été identifiés pour la GPI, six pour la PGM, quatre pour l'ICD et quatre pour la 6-PGD. Parmi ces quatre systèmes, seule la GPI a présenté des bandes caractérisant certains écotypes. En effet, les écotypes épineux du site Nahli ainsi que ceux du site Nebber du Kef (fig. 1) présentent tous des épines crochues et persistantes, et sont caractérisés par trois bandes manifestant la plus grande mobilité électrophorétique.

Les écotypes collectés sur un même site ont été assimilés à des populations distinctes afin d'analyser la diversité inter-populations. Pour ce faire, le programme Biosys (Sowfford et Selander, 1981) a été utilisé pour calculer les distances génétiques entre les huit populations étudiées. Ces distances ont été établies à partir des fréquences alléliques calculées à partir des quatres systèmes enzymatiques utilisés. Les matrices des distances obtenues à partir de la distance génétique de Nei (1978) ont été reproduites sous forme de dendrogramme (fig. 3) grâce à un algorithme WGPMA (Sokal et Senath, 1963).

L'analyse du dendrogramme obtenu montre la structuration nette en trois groupes différents comme suit.

1) Un premier groupe est formé de deux populations : Sidi Bouzid et Bouhedma, auxquelles se rattachent les populations de Matmata



■ Figure 3

Dendrogramme obtenu à partir de la matrice de distances : distance non biaisée de Nei (1978).

(à une distance de 0,05) et de Kecham (0,18). Ces populations, toutes originaires du sud tunisien, présentent des caractères morphologiques communs : écotypes à épines fines, dressées et caduques.

2) Un deuxième groupe est composé de la population Melh et Dyr, prospectées au nord du pays : les écotypes formant ces populations sont tous inermes.

3) Un troisième groupe renferme deux populations : Nahli et Nebber, du nord du pays : il s'agit d'écotypes épineux à épines persistantes et crochues.

Les populations épineuses et inermes sont génétiquement très éloignées (distance génétique moyenne de 1,5) même si leur origine géographique est commune.

### Caractérisation moléculaire

Le polymorphisme des différentes populations tunisiennes et italiennes (fig. 2) est rapporté dans le tableau 1. Le pourcentage de loci



Populations	Nombre de plants	Fréquence de bandes polymorphes
Kef (Nebeur)	4	0,74
Bizerte	7	0,88
Sidi Bouzid	7	0,83
Matmata	3	0,51
Ariana	3	0,64
Kef (Dyr)	2	0,62
Bouhedma	1	0,57
Kebili	9	0,81
Ben Arous	2	0,37
Gabès	8	0,92
Béjà	2	0,40
* Moyenne des bandes polymorphes des populations tunisiennes		0,70
Viterbo	6	0,61
Cantaloupo	2	0,31
Siena	2	0,35
St-Stefano	2	0,37
Porto-Ercole	2	0,44
Bracciano	1	0,25
Caracalla	2	0,50
Ostiense	2	0,42
* Moyenne des bandes polymorphes des populations italiennes		0,40

Tableau 1  
 Degré de polymorphisme existant au sein des populations  
 de câprier (RAPD).

polymorphes pour les géotypes d'une même population semble assez élevé mais proportionnel à la taille de la population. Parallèlement, le degré de polymorphisme entre les individus des populations tunisiennes est plus élevé que celui existant entre ceux des populations italiennes. En effet, la moyenne des loci polymorphes tunisiens est de 0,7 alors que celui des italiens est de 0,4. Ce résultat confirme l'efficacité des marqueurs RAPD pour la caractérisation de cette espèce (Dan et Stephens, 1997).

La distance génétique entre les populations calculée selon Nei (1972) (tabl. 2) ne montre pas de corrélation avec la distance géographique. Ceci signifie qu'il est très difficile d'avoir une distinction nette entre les populations suivant leur site géographique. La distance génétique entre les différentes populations tunisiennes varie de 0,1 à 1,1 ; alors que celle existant entre les différentes

	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Bizerte	0,33	0,20	0,21	0,35	0,28	0,10	0,13	0,15	0,21	0,84	0,19	0,27	0,30	0,20	0,36	0,16	0,35	0,22
Ariana		0,35	0,36	0,19	0,62	0,42	0,32	0,35	0,52	0,99	0,45	0,44	0,73	0,72	0,65	0,39	0,70	0,64
BenArous			0,48	0,50	0,52	0,25	0,20	0,22	0,35	0,96	0,31	0,27	0,57	0,28	0,53	0,30	0,56	0,41
Beja				0,34	0,54	0,33	0,25	0,26	0,43	1,22	0,25	0,37	0,35	0,39	0,36	0,23	0,49	0,39
Kef1					0,48	0,44	0,32	0,33	0,50	0,99	0,40	0,46	0,66	0,55	0,48	0,38	0,51	0,45
Kef2						0,32	0,35	0,37	0,39	0,66	0,43	0,40	0,44	0,51	0,54	0,47	0,39	0,34
SidiBouzd							0,15	0,14	0,14	0,98	0,21	0,35	0,32	0,32	0,36	0,23	0,37	0,30
Gabes								0,13	0,26	0,98	0,23	0,13	0,39	0,26	0,39	0,22	0,44	0,38
Kebili									0,23	0,83	0,19	0,23	0,30	0,27	0,32	0,22	0,28	0,26
Matmata										1,07	0,24	0,46	0,32	0,45	0,32	0,28	0,39	0,41
Bouhedma											1,03	1,04	0,94	1,25	1,18	1,12	0,84	0,92
Siena												0,29	0,27	0,37	0,22	0,25	0,35	0,31
StStefano													0,49	0,28	0,39	0,31	0,44	0,37
Porto Ercole														0,43	0,23	0,39	0,25	0,24
Cantalupo															0,29	0,25	0,40	0,28
Bracciano																0,30	0,27	0,26
Viterbo																	0,50	0,37
Caracalla																		0,21

Tableau 2

Distance génétique entre les différentes populations selon Nei (1972) - Marqueurs RAPD.

populations italiennes varie entre 0,2 et 0,5, ce qui prouve que les populations italiennes sont plus proches les unes des autres, alors que les tunisiennes demeurent très hétérogènes.

### *Multiplication herbacée*

Un taux de réussite au bouturage de 90 % a été enregistré début mai pour le câprier inerme ; les plants issus de bouturage herbacé sont homogènes et vigoureux (fig. 4) ; ce résultat confirme celui de Barbera (1991) qui a rapporté un taux d'enracinement élevé en cas d'utilisation de boutures herbacées prélevées au début de la germination (avril).

Nos travaux montrent que pendant la période s'étalant entre juillet et octobre, les pourcentages de réussite du bouturage varient entre 50 et 70 % pour le câprier inerme (fig. 5). Quant au câprier épineux, le bouturage herbacé réalisé au printemps et en été a engendré des taux d'enracinement faibles (10 et 5 % respectivement).

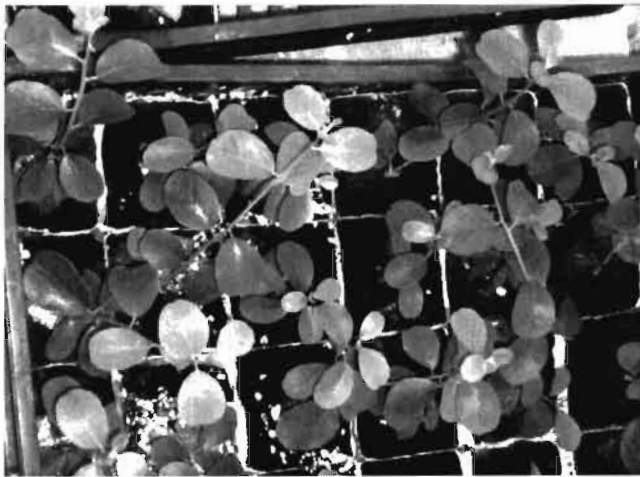


Figure 4  
Boutures herbacées de câprier inerme en acclimatation.

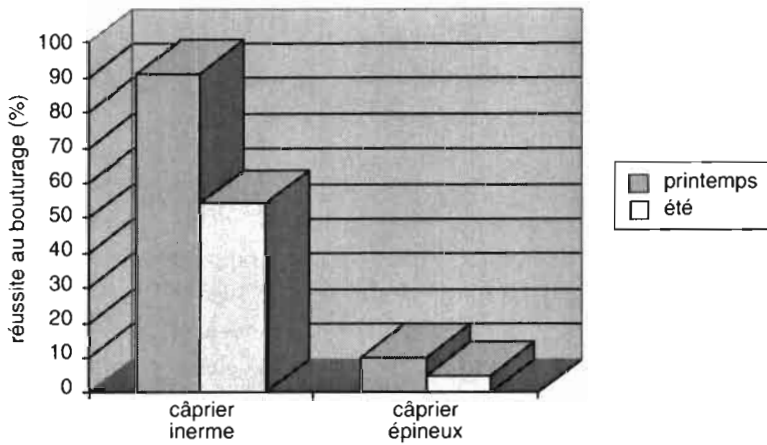
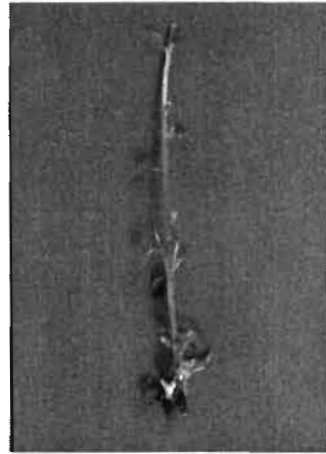


Figure 5  
Pourcentage de réussite au bouturage herbacé du câprier inerme et épineux.

Le câprier épineux semble donc être beaucoup plus difficile à enraciner que le câprier inerme. La technique de bouturage herbacé appliquée en mai ou en été n'a pas à priori permis d'atteindre les résultats escomptés.

## Micropropagation

L'utilisation du milieu de culture MS (1962) additionné de  $1,0 \text{ mg.l}^{-1}$  de BAP pour la multiplication du câprier (*Capparis spinosa* L.) a permis d'obtenir un taux de propagation considérable (de l'ordre de 15). Les vitropousses néoformées sont extrêmement vigoureuses (fig. 6).



■ Figure 6  
Vitropousse vigoureuse  
de câprier inerme.

La bonne vigueur des cultures représente souvent un critère essentiel pour la réussite de la rhizogenèse chez un grand nombre d'espèces végétales (Navatel, 1981 ; Ghorbel *et al.*, 1995 ; Chatibi *et al.*, 1995). Toutefois, il s'est avéré que cette vigueur représente un inconvénient majeur pour la rhizogenèse du câprier, le diamètre de la tige étant inversement proportionnel au taux d'enracinement et directement proportionnel au taux de vitrification. Afin de résoudre ce problème dans la culture *in vitro* du câprier, l'étiollement des implants a été induit. Toutefois, ces pousses étiolées se nécrosent très rapidement. C'est pourquoi, nous avons procédé à l'épuisement des implants par des subcultures fréquentes. Cette procédure a permis d'obtenir des cultures ayant une grande capacité d'enracinement sans risque de vitrification ou de nécrose. D'autres facteurs ont été également étudiés, notamment l'effet de la nature et de la concentration de l'auxine, le milieu de culture et la position des implants dans le milieu.

Les régulateurs de croissance utilisés pour l'enracinement sont l'AIB, l'AIA et l'ANA. Ceux-ci ont été également testés auparavant pour le câprier (Rodriguez *et al.*, 1990 ; Deora et Shekhawat, 1995). L'analyse des résultats obtenus a révélé une multitude de réponses en fonction du traitement. Les résultats les plus intéressants, quant au taux d'enracinement (80 %), sont obtenus en présence d'AIA ( $1,5 \text{ mg.l}^{-1}$ ) avec des implants épuisés. Quant à l'AIB ou l'ANA, les difficultés d'enracinement sont liées principalement au problème de vitrification et de callogenèse excessives. La lignification occasionnée par une concentration croissante en AIB réduit considérablement le taux d'enracinement. Concernant les implants étiolés, le problème crucial réside dans la nécrose apicale des cultures quelle que soit la nature ou la concentration des auxines.

L'auxine qui semble donc être la plus intéressante pour le câprier est l'AIA à une concentration de  $1,5 \text{ mg.l}^{-1}$ . Cependant, la qualité des racines et leur nombre par vitroplant sont relativement faibles et les racines sont fragiles. Ceci pose un énorme problème lors de l'acclimatation des vitroplants. C'est ainsi que différents milieux de culture (solide et liquide) ont été testés. Différentes positions des implants dans le milieu de culture ont été aussi considérées : position couchée ou plantée.

Les résultats du tableau 3 montrent que la réponse la plus intéressante, quant au taux d'enracinement (100 %) et le nombre moyen de racines par vitroplant (10), est obtenue lorsque les implants épuisés sont cultivés en position couchée sur le milieu de culture riche en

Milieu de culture	Liquide		Agar		Pont de papier filtre	
	couchée	plantée	couchée	plantée	couchée	plantée
Position des implants						
% enracinement	0	10	100	71	13	87
Nombre racines par vitroplant	0	2	10	4	6	6
Qualité des racines	/	Très faible	Très bonne	Faible	Moyenne	Bonne
Qualité des plantules	Très faible	Faible	Très bonne	Moyenne	Faible	Moyenne

300 implants épuisés par traitement.

### Tableau 3

Effet du milieu de culture et de la position des implants sur l'enracinement *in vitro* du câprier.

AIA ( $1,5 \text{ mg.l}^{-1}$ ) et solidifié par 0,8 % d'agar. La qualité des racines et des vitroplants est très intéressante. Ainsi, le taux d'acclimatation obtenu dans ces conditions a dépassé 90 % (fig. 7). Quant aux implants plantés, bien que le taux d'enracinement soit relativement élevé (71 %), les racines sont vite oxydées et les vitroplants présentent un aspect sénescent. En revanche, l'utilisation du pont en papier filtre, imbibé de milieu de culture, a permis d'obtenir un taux d'enracinement de 87 % (tabl. 3) avec des racines vigoureuses.



Figure 7  
Acclimatation de vitroplants  
de câprier inerme.

## Conclusion

Ces résultats nous confirment la grande diversité du câprier tunisien. Un polymorphisme très intéressant, dérivant d'une variabilité génétique considérable des écotypes autochtones est décelable grâce au grand pouvoir discriminant des systèmes enzymatiques

employés et à la bonne résolution des bandes électrophorétiques a été mis en évidence. La présence de trois groupes génétiquement bien distincts - inerme, épineux et pubescent - parmi les différents écotypes collectés, dénote l'existence d'une variabilité génétique intra-populations. La caractérisation moléculaire par RAPD a confirmé ces résultats en insistant sur la variabilité génétique différente décelée entre les populations tunisiennes et italiennes. Par RAPD, la diversité génétique s'avère plus intéressante au niveau des accessions tunisiennes.

L'exploitation de cette grande diversité génétique du câprier ne peut être effectuée sans la maîtrise de sa multiplication. Dans ce contexte, le bouturage herbacé s'est révélé avantageux lorsqu'on considère l'homogénéité des plants obtenus, la rapidité et la simplicité d'exécution. Cependant, la réussite de cette technique demeure tributaire de l'origine du matériel initial, de la période de prélèvement des pousses herbacées, et de la variété (inerme ou épineuse). La culture *in vitro* semble pallier à ces inconvénients, puisque l'ensemencement de pousses épuisées de câprier (obtenues après deux ou trois subcultures), en position couchée, sur le milieu MS (1962) solidifié par l'agar et additionné de 1,5 mg.l<sup>-1</sup> d'AIA, favorise un taux d'enracinement avoisinant les 90 %. Dans ces conditions, les racines apparaissent 4 à 5 jours après la mise en culture et l'acclimatation des plants est assurée.

## Bibliographie

- Arulsezar S, Parfitt D 1986 — Isozyme analysis procedures for stone fruits, almond, grape, walnut, pistachio and fig. Hort Sci 21, 4 : 928-933.
- Barbera G 1991 — Programme de recherche Agrimed : Le câprier (*capparis* spp) CEE Rapport EUR 13617 FR.
- Chatibi A, Kchouk ML, Ben Abdallah F, Zemni H, Ghorbel A 1995 — Rooting improvement of *Pistacia vera* L. cv Mateur by *in vitro* culture of apices and cutting. Acta Hort 419 : 213-220.
- Chervin P 1897 — La culture du câprier en Tunisie. Bulletin de la direction de l'Agriculture et du commerce 15-1-1897.
- Dan Y, Stephens T 1997 — DNA polymorphism in somaclonal variants of *Asparagus officinalis* L.

- resistant to *Fusarium oxysporum* f. sp. *Asparagi*. Plant Tissue Culture and Biotechnology 3, 2 : 89-96.
- Dellaporta SL,  
Wood J, Hicks JB 1983 —  
A plant DNA miniprep: version II. Plant Molecular Biology Reporter 1: 19-21.
- Deora NS, Shekhawat NS 1995 —  
Micropropagation of *Capparis decidua* (Forsk.) Edgew. - a tree of arid horticulture. Plant Cell reports 15 : 278-281.
- Ghorbel A, Chatibi A, Mliki A, Kchouk ML, Zemni H 1995 —  
Propagation *in vitro* du pêcher-amandier Gf-557. Quel avenir pour l'amélioration des plantes ? Aupelf/John Libbey Eurotext, Paris, 263-274.
- Khalidi A, Ben M'hamed M 1996 —  
Le câprier en Tunisie : répartition, écologie et état des connaissances et des recherches. Séminaire sur le développement du câprier dans le Nord-Ouest. Tunis, 16/04/96.
- Khouildi S, Pagnotta MA, Tanzarella O, Ghorbel A, Porceddu E 2000 —  
Suitability of RAPD technique for estimating the genetic variation in natural genotypes of tunisian and italian caper (*Capparis spinosa* L.) Agr. Med. In press.
- Navatel JC 1981 —  
Problèmes liés à la production de porte-greffes d'arbres fruitiers par multiplication *in vitro*. Colloque sur les recherches fruitières. Inra. CITIFL Bordeaux, 85-90.
- Nei M 1972 —  
Genetic distance between populations. Am Nat 106 : 283-293.
- Nei M 1978 —  
Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics 89 : 583-590.
- Pasteur N, Pasteur G, Bonhomme F, Catalan J, Britton-Davidan J 1987 —  
Manuel technique de génétique par électrophorèse des protéines. Lavoisier, Paris, 214 p.
- Rodriguez R, Rey M, Cuzzo L, Ancora G 1990 —  
*In vitro* propagation of caper (*Capparis spinosa* L.). *In vitro* cell Biol 26 : 531-536.
- Schauenberg P, Paris F 1977 —  
Guide des plantes médicinales. 3<sup>e</sup> édition. Delachaux et Niestlé SA, Neuchatel (Switzerland)-Paris : 386 p.
- Sokal RR, Sneath PHA 1963 —  
Principes de numerical taxonomy. W. H. Freeman and Co., San Francisco.
- Sowford DL, Selander RB 1981 —  
Biosys-1: A Computer program for the analysis of allelic variation in genetics. Dept. Genet. Develop. Illinois, Urbana.