

## Callogenèse et régénération *in vitro* du kiwi (*Actinidia chinensis*) à partir de divers explants

Qamar LAHLIMI-ALAMI<sup>1</sup>, Bouchra CHLYAH<sup>1a</sup> & Hassan CHLYAH<sup>1</sup>

(Reçu le 15/02/2000 ; Accepté le 16/11/2000)

### قدرة تجديد نباتات الكيوي بعد نمو الكلد

يهتم هذا البحث بطريقة تجديد نباتات الكيوي (أكتينيديا شننسييس) بعد فترة نمو الكلد وذلك بزراعة أعضاء مختلفة في أنابيب التجربة (ميرستيم، أوراق، pétioles، عقود و مابين العقود) وذلك عند الشجرة الذكر (صنف "تموري") والشجرة الأنثى (صنف "هيوارد"). وقد قيمت تقنية تعقيم فعالة، سمحت بالحصول على 79% من الأعضاء الخالية من الجراثيم. وباستعمال أوساط زرع مختلفة التركيب المعدنية والتركيزات الهرمونية (AIA : حامض أندول أستيك، AIB : حامض أندول بتريك، BAP : بترين أمينو بورين و KIN : كنتين)، حصلنا على كلدات مختلفة ونباتات مورقة. ويختلف عدد النباتات باختلاف جنس الشجرة العاطية ونوعية الأعضاء حيث أن pétioles الذكر هو الأكثر فعالية بنسبة 4.75 نباتات في الكلدة الواحدة، وذلك بعد زراعة دامت عشر أسابيع. أما بالنسبة للعقود فقد أعطت التقنية المستعملة نبتة إلى ثلاثة نباتات لكل عضو بعد 15 إلى 20 يوم وذلك في مرحلة من السنة يكون فيها شجر الكيوي في حالة سكون.

**الكلمات المفتاحية :** تعقيم - نمو الكلد - إنتاج النباتات - مختلف الأعضاء - أوساط الزرع

### Callogenèse et régénération *in vitro* du kiwi (*Actinidia chinensis*) à partir de divers explants

Dans ce travail, on propose une méthode de régénération de plants de kiwi (*Actinidia chinensis*) après une phase de callogenèse, par culture *in vitro* de divers explants : méristèmes, feuilles, pétioles, entre-nœuds et nœuds, aussi bien mâles (« Tomuri ») que femelles (« Hayward »). La technique de désinfection mise au point permet d'atteindre un taux de 97% d'explants sains. Différents types de cals et de pousses feuillées ont été obtenus sur des milieux différant du point de vue composition minérale et teneur en régulateurs de croissance (AIA, AIB, BAP et zéatine). Le nombre de pousses varie selon le type d'explant et le sexe du plant-donneur. Les pétioles mâles sont les explants les plus performants avec, en moyenne, 4,75 pousses par cal, après 10 semaines de culture. Dans le cas des nœuds, la technique utilisée produit une à trois plantules par explant après 15 à 20 jours de culture à une période de l'année où les plants de kiwi sont en dormance.

**Mots clés :** Kiwi - *Actinidia chinensis* - Décontamination - Callogenèse - Régénération - Divers explants - Milieux de culture

### Callogenesis and *in vitro* regeneration of kiwi (*Actinidia chinensis*) from various explants

From the results presented in this paper, a method of regeneration of kiwi plants is proposed (*Actinidia chinensis*) after a callus induction phase from various types of explant: meristems, leaves, petioles, internodes and nodes, from both origins male (« Tomuri ») and female (« Hayward »). An efficient method of sterilization was developed reaching 97% of efficiency explants. Different types of callus and leafy shoots were obtained on different media in mineral composition, type and concentration of growth regulator (AIA, AIB, BAP and zeatin). The number of shoot regenerated varied with explant type and plant sex, male petiole gives the highest number of shoot per callus (4,75) after 10 weeks of culture. For nodes, the technique used produced 1 to 3 shoots per explant after 15-20 days of culture during the cold season when kiwi plants were still dormant.

**Key words :** Kiwi - *Actinidia chinensis* - Sterilization procedures - Callus - Regeneration - Various explants - Culture media

<sup>1</sup> Université Mohammed V, Laboratoire de Physiologie Végétale, Département de Biologie, Faculté des Sciences, BP. 1014, Avenue Ibn Batouta, Rabat, Maroc

<sup>a</sup> Auteure correspondante

## INTRODUCTION

Le kiwi ou *Actinidia chinensis*, communément appelé groseille chinoise, a été probablement l'espèce fruitière la plus difficile à acclimater en dehors de la Chine (Xiao *et al.*, 1991). Sa culture s'est fortement développée au cours des dernières années et s'est imposée en tant que culture horticole importante (Ferguson, 1984).

Pendant longtemps, la culture du kiwi n'a concerné qu'un seul cultivar (Blanchet, 1992) : le "Hayward" obtenu par bouturage classique de plantes en Nouvelle-Zélande (Xiao *et al.*, 1991). Cette variété s'adapte mal à certaines conditions pédoclimatiques, surtout au froid (Blanchet, 1985). De plus, elle ne résiste pas à certains agents pathogènes (Bunker, 1986).

Aussi, pour améliorer le kiwi et obtenir des variétés nouvelles mieux adaptées et plus productives, on fait appel aux techniques de cultures *in vitro* (Evans & Sharp, 1986 ; Huang & Tan, 1988). Dans ce sens, l'action de diverses auxines et cytokinines sur la production de pousses feuillées a été étudiée à partir du tissu foliaire d'*Actinidia chinensis* (Canhoto & Cruz, 1987) et d'*Actinidia deliciosa* (Predieri *et al.*, 1988).

Cependant, la désinfection des explants (nœuds, entre-nœuds ou pétioles prélevés en verger) mis en culture constitue l'un des obstacles à la réussite de la micropropagation *in vitro* du kiwi à grande échelle (Sammarelli, 1988). Toutefois, les jeunes feuilles semblent poser le moindre problème (Xiao, 1990).

Aussi, ce travail se propose d'optimiser les conditions de décontamination et les combinaisons hormonales induisant la callogenèse et l'organogenèse du kiwi. L'objectif est d'évaluer les potentialités morphogénétiques de divers explants en vue d'avoir des plants acclimatés en un minimum de temps.

## MATÉRIEL & MÉTHODES

### 1. Matériel végétal

Le matériel végétal est collecté dans le verger, âgé de cinq ans, de la Station de la Société de Développement Agricole (SODEA) de Sebaâ Ayyoun, à Meknès. Des boutures uniformes de plants de kiwi aussi bien mâles (variété "Tomuri")

que femelles (variété "Hayward") portant quatre à cinq bourgeons dormants et une vingtaine de feuilles chacune sont prélevées depuis la mi-juillet jusqu'au début septembre. Ce matériel est subdivisé en deux lots : celui des méristèmes prélevés à partir de bourgeons terminaux à écailles protectrices serrées et vertes et un second groupe constitué par des fragments de pétioles, la base de jeunes feuilles portant un fragment de nervure principale et des tronçons d'entre-nœuds. Un seul type d'explants a été prélevé en hiver (décembre) : les bourgeons sur nœuds. Dans ce cas, les boutures dont on a éliminé les feuilles sont débitées en fragments de 2 à 3 cm portant chacun un bourgeon axillaire. Pour chaque essai, il y a au moins 12 répétitions par traitement.

### 2. Désinfection et préparation des explants

Les dômes méristématiques étant en principe sains (Monette, 1986), une stérilisation superficielle des bourgeons avec toutes leurs écailles est réalisée par immersion dans de l'hypochlorite de calcium à différentes concentrations pendant 20 minutes, suivie de 3 rinçages à l'eau distillée stérile. Ensuite, le méristème est excisé aseptiquement sous flux laminaire à air stérile.

Les fragments de feuilles, pétioles et entre-nœuds sont d'abord lavés et brossés soigneusement sous l'eau courante puis désinfectés à l'hypochlorite de calcium à différentes concentrations (1 à 14%). L'utilité de cette solution stérilisante, de l'agitation et de l'addition du Tween 20 a été étudiée. Ces traitements sont suivis d'une série de 3 à 5 rinçages à l'eau distillée stérile sous la hotte à flux laminaire.

En ce qui concerne les nœuds, la même technique est adoptée, mais améliorée par un badigeonnage soigneux au mercryl-laurylé avant immersion dans l'hypochlorite de calcium. Les nœuds sont ensuite décorcés sous enceinte stérile puis les bourgeons sont délicatement isolés.

### 3. Milieux de culture

Pour l'induction de la callogenèse et l'organogenèse, les explants sont cultivés sur des milieux de culture MS (Murashige & Skoog, 1962) qui diffèrent par la concentration en macroéléments (MS, MS/2 et MS/3) et par la concentration en saccharose (22,5 et 30 g.l<sup>-1</sup>). Ces milieux sont additionnés de suppléments organiques, en mg.l<sup>-1</sup> : adénine (80),

MgNaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O (170), Thiamine (0,4) et I-inositol (100). Les régulateurs de croissance sont essentiellement représentés par les auxines et/ou les cytokinines à différentes concentrations (Wessels *et al.*, 1984 ; Wiyaporn *et al.*, 1990) (Tableau 1).

**Tableau 1. Composition des milieux de culture**

Milieux	AIB (mg/l)	ANA (mg/l)	Kinétine (mg/l)	Zéatine (mg/l)	BAP (mg/l)	Saccharose (g/l)
M <sub>1</sub>	1,0	0,4	-	-	0,5	30
M <sub>2</sub>	2,0	-	-	-	1,0	30
M <sub>3</sub>	5,0	0,4	-	1,0	1,0	30
M <sub>4</sub>	10,0	-	2,0	-	2,0	22,5
M <sub>5</sub>	6,0	-	2,0	-	2,0	30

Pour la culture des nœuds, deux milieux de base ont été testés : MS et Heller additionnés de : I-inositol (100 mg.l<sup>-1</sup>), thiamine (0,4 mg.l<sup>-1</sup>), gélose (0,7%) et saccharose (4%). Deux combinaisons hormonales ont été testées : [acide naphthalène acétique (ANA) : 2 mg.l<sup>-1</sup>+ kinétine : 2 mg.l<sup>-1</sup>] et zéatine : 2 mg.l<sup>-1</sup>.

L'allongement des pousses néoformées sur cals se fait sur un même milieu composé des éléments de base MS additionné de BAP (benzylaminopurine) à 3 mg.l<sup>-1</sup> et de saccharose à 20 g.l<sup>-1</sup>.

Pour l'enracinement en milieu liquide (milieu de base MS/2 additionné de 5 mg.l<sup>-1</sup> d'ANA et de 20 g.l<sup>-1</sup> de sucre), les plantules ont été déposées sur des ponts de papier filtre. Sur milieu solide, l'enracinement a été obtenu par induction racinaire par trempage rapide des plantules 30 secondes à une minute dans une solution d'acide indolyl-acétique (AIA) à 12 mg.l<sup>-1</sup> (Standardi, 1983). Les plantules sont ensuite transférées sur MS/2 additionné de 10 g de sucre, 8 g de gélose et 5 g de charbon activé (Gui, 1979).

Pour tous les essais, les cultures ont été entreposées dans une chambre de culture sous un éclairage de 2000 lux, avec une photopériode de 16 heures de lumière suivies de 8 heures d'obscurité, à 25 ± 1°C.

#### 4. Analyse statistique

Le logiciel STATITCF nous a permis de réaliser une analyse de la variance pour les 3 facteurs (milieu, explant et sexe) puis une comparaison des moyennes pour déterminer les combinaisons de facteurs optimaux.

## RÉSULTATS & DISCUSSION

### 1. Protocole de désinfection

Concernant la culture des méristèmes, les cas d'infection relevés ont été attribués aux contaminants logeant au niveau des écailles et qui ont été véhiculés jusqu'au dôme méristématique pendant la manipulation. Pour remédier à ce problème, les bourgeons terminaux sont plongés, avant la mise à nu du méristème, dans une solution d'hypochlorite de calcium à 10% pendant 15 min suivi de 3 rinçages à l'eau stérile.

Pour les fragments d'organes et d'entre-nœuds, trois facteurs ont été étudiés : la concentration d'hypochlorite de calcium, l'addition de Tween 20 et l'agitation de la solution stérilisante (Tableau 2).

**Tableau 2. Effet de la concentration d'hypochlorite de calcium, l'addition de Tween 20 et de l'agitation sur le taux de désinfection des explants**

Agitation	Tween 20	CHC (%)	Pourcentage d'explants		
			Sains	Contaminés	Nécrosés
Sans	Sans	2	0	100	0
		10	20	75	5
		14	28	42	30
		1	0	94	6
		10	23	67	10
		14	33	31	36
Sans	Avec	1	4	96	0
		8	58	40	2
		10	97	0	3
		12	80	0	20
		14	61	0	39
		Avec	Avec	14	61

CHC : Concentration d'hypochlorite de calcium

En absence d'agitation et d'agent mouillant (Tween 20), l'augmentation de la concentration d'hypochlorite de calcium de 2 à 14% se traduit par l'augmentation du pourcentage des explants sains de 0 à 28%. On note, cependant, une augmentation d'explants nécrosés (30% en présence de 14% d'hypochlorite de calcium). En absence d'agitation et en présence de Tween 20, on note la même évolution des pourcentages d'explants sains en fonction des concentrations d'hypochlorite de calcium (0 à 33%).

En présence de Tween 20 et sous agitation, l'hypochlorite de calcium à 10% donne les meilleurs résultats (97% d'explants sains et 3% d'explants nécrosés).

En ce qui concerne les nœuds, la désinfection par immersion dans de l'hypochlorite de calcium à 10% pendant 20 min en présence de Tween 20 et sous agitation est améliorée par un badigeonnage soigneux au mercryl-laurylé. Ainsi, on passe de 59 à 80% d'explants sains.

Ceci permet de surmonter le problème que posaient surtout les nœuds, entre-nœuds et pétioles : ces explants ayant une pilosité importante sont directement en contact avec des contaminants du milieu extérieur, contrairement aux méristèmes, protégés par les écailles.

## 2. Caractérisation de la callogenèse

Quelque soit l'explant de départ utilisé, l'organogenèse est toujours précédée par une phase de callogenèse (Hirsch & Fortune, 1990). Sur l'ensemble des milieux expérimentés, les explants mis en culture croissent très rapidement (Watanabé & Takahashi, 1987) et produisent une quantité importante de cals (Magdeleine, 1982). Nos résultats laissent apparaître, en dehors des cals cicatriciels qui ne sont pas comptabilisés, deux types de cals. Le premier type est friable, de couleur verte très claire avec des zones blanchâtres. On ne note aucune évolution malgré des repiquages successifs sur milieu frais. Le second type de cals est compact et dense, de couleur verte plus foncée au centre qu'à la périphérie. À partir de la huitième semaine, on note sur la surface de ce dernier type de cals et particulièrement sur la bordure, une multitude de points rouges sur lesquels apparaissent des bourgeons après 10 à 12 semaines.

Un troisième type de cals plus petits et hyperhydriques a été décrit par Xiao *et al.* (1991), mais non observé ici.

Le taux de callogenèse (nombre de cals sur nombre d'explants ensemencés) varie selon le milieu de culture, le type d'explant et le sexe du plant-donneur (Tableau 3).

Le milieu M<sub>5</sub> est le plus performant avec un taux de réussite de 100% dans tous les cas sauf pour les méristèmes des plants femelles (taux de 84%). Concernant l'effet de l'explant, la pétiole donne les meilleurs résultats (98% en moyenne pour les plantes mâles et 97% pour les plantes femelles), suivi par l'entre-nœuds (mâle : 95% et femelle : 94%), le fragment de feuille (mâle : 90% et femelle : 86%), puis le méristème (mâle : 77% et femelle : 65%).

**Tableau 3. Pourcentage d'explants callogènes en fonction du milieu de culture, du type et du sexe de l'explant**

Milieux de culture	Méristème		Pétiole		Feuille		Entre-nœuds		Moyenne (%)
	M	F	M	F	M	F	M	F	
M <sub>1</sub>	67	65	93	92	80	84	90	80	82
M <sub>2</sub>	80	80	100	98	84	78	100	94	90
M <sub>3</sub>	85	80	100	100	100	95	100	100	95
M <sub>4</sub>	85	80	100	100	92	88	100	100	93
M <sub>5</sub>	100	84	100	100	100	100	100	100	98
Moyenne	77	65	98	97	90	86	95	94	
	71		97,5		88		94,5		

M: Mâle ; F: Femelle

Ainsi, pour chaque type d'explant, milieux et sexes confondus, le taux de réussite est de 97,5% pour les pétioles, 94,5% pour les entre-nœuds, 88% pour les feuilles et 71% pour les méristèmes.

Quant à l'effet du sexe (ou la variété) du plant donneur, les explants prélevés à partir des pieds "Tomuri" (mâles) donnent des taux de réussite légèrement supérieurs à ceux qui sont enregistrés pour les explants issus de pieds "Hayward" (femelles).

Dans notre cas, le passage par le cal est systématiquement observé pour tous les explants alors que Brossard-Chriqui & Tripathi (1984) rapportent la néoformation de pousses feuillées directement sur la région des nervures, sans formation préalable de cal.

## 3. Néoformation de bourgeons

Après dix semaines de culture, sur les cals verts, compacts et à partir des points rouges, on distingue de minuscules bourgeons émergents (Tableau 4). Quatre à cinq jours après l'apparition des bourgeons et au fur et à mesure que ceux-ci se développent, on note que la coloration rouge disparaît progressivement. La néoformation de bourgeons a lieu, pour les explants de pétioles, après 10 semaines seulement au lieu de 12 pour les autres explants). Le nombre moyen de bourgeons formés pour les plantes femelles est aussi le plus élevé : 4,75 bourgeons/cal, ce qui est en accord avec les résultats de Sammarcelli & Legave (1990). Viennent ensuite les feuilles avec 4,48 bourgeons/cal puis les méristèmes (3,42) et les entre-nœuds (3,32). Pour l'ensemble des explants, on a noté des valeurs plus importantes pour les explants des pieds femelles par rapport aux pieds mâles.

**Tableau 4. Temps d'apparition, nombre de pousses par cal pour chaque type d'explant (mâle et femelle) dans le milieu M<sub>5</sub>**

Explants	Méristème		Pétiole		Feuille		Entre-nœuds	
	M	F	M	F	M	F	M	F
Ta* des pousses (semaines)	12	12	10	10	12	12	11	11
N. moy. de pousses/cal	2,7c	3,47b	4,38a	4,75a	3,56b	4,48a	2,79c	3,32b
N. max. de pousses/cal	4,0	2,0	10	12	10	14	5	11

\* M : Mâle ; F : Femelle ; Ta : temps d'apparition ; N. moy. : nombre moyen ; N. max. : nombre maximal

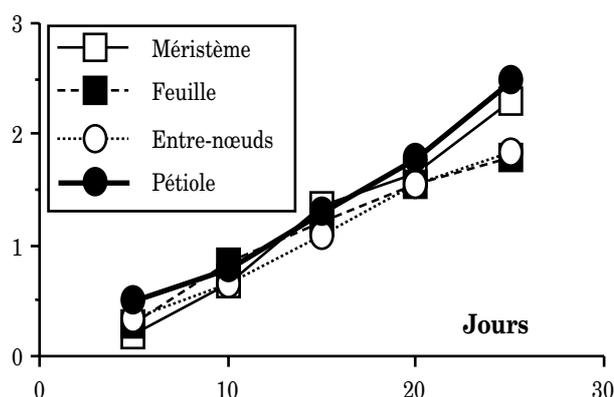
Les lettres différentes sur la même ligne indiquent que la différence est statistiquement significative au seuil de 5% (Newman & Keuls).

#### 4. Allongement des pousses formées

Pour les quatre explants étudiés (méristèmes, pétioles, feuilles et entre-nœuds) et au premier stade de la caulogénèse, les pousses feuillées et les feuilles formées restaient très petites et présentaient des caractères juvéniles : feuilles étroites, longues et à bords dentelés. Ces caractères ont été également observés par Gui *et al.* (1982) sur les plantes régénérées à partir de culture d'endosperme et par Fraser *et al.* (1986) sur les plantes régénérées à partir de tissu du connectif d'anthers. Le passage sur milieu d'élongation (MS + BAP à 3 mg.l<sup>-1</sup> + saccharose à 20 g.l<sup>-1</sup>) a été donc nécessaire. Le critère d'allongement retenu est la longueur de la pousse. L'allongement des pousses, quelque soit le type d'explant et la variété, suit une évolution linéaire (Figures 1 & 2). Après 20 à 25 jours d'incubation sur milieu d'élongation, les pousses sont prêtes à être transférées sur le milieu d'enracinement.

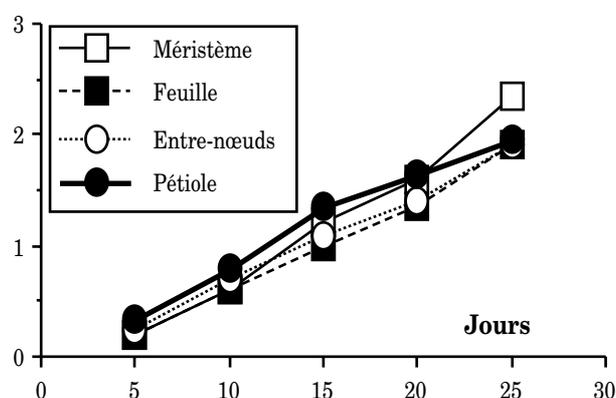
Pour les nœuds, les ébauches de pousses apparaissent après 10 jours seulement d'incubation aussi bien sur le milieu de base MS que sur celui d'Heller additionnés de BAP à 2 mg.l<sup>-1</sup> + kinétine à 2 mg.l<sup>-1</sup> à l'obscurité. Ceci se rapproche des résultats de Xiao *et al.* (1991) qui ont montré l'efficacité de la combinaison BAP-ANA suggérée par les travaux de Predieri *et al.* (1988). Maintenus pendant une semaine sur ce même milieu, elles atteignent 2 à 3 cm de hauteur et présentent des caractères de plantes adultes : feuilles cordiformes légèrement arrondies et à bords lisses. Les deux milieux de base, aussi bien MS que Heller, aboutissent aux mêmes résultats. Toutefois, ils diffèrent de ceux qui sont énoncés par

Longueur (cm)



**Figure 1. Évolution de la longueur des pousses en fonction du temps (explants des plantes femelles)**

Longueur (cm)



**Figure 2. Évolution de la hauteur des pousses (explants des plantes femelles)**

Velayandom *et al.* (1985) qui ont noté que l'aspect des pousses néoformées dépendait du milieu de base utilisé. Les pousses à caractères juvéniles ont été obtenues sur milieu de base MS et celles à caractères adultes sur milieu de base Heller. Chaque nœud a produit 1, 2 ou 3 pousses. Pour ces dernières, issues de bourgeons axillaires des nœuds, le passage sur milieu d'élongation n'a pas été nécessaire. Ce type d'explant est donc intéressant puisqu'il est plus rapide à micropropager.

#### 5. Enracinement et sevrage

Après la phase d'allongement, les bourgeons ayant atteint environ 3 cm sont excisés à partir du cal et transférés pour être enracinés soit dans un milieu liquide, soit sur milieu solide.

Dans le milieu liquide (Tableau 5), malgré un nombre de pousses enracinées important (18

pousses enracinées sur 20 pousses utilisées, soit un taux de 90%), seules six (33%) supportent le transfert sur tourbe. En effet, les systèmes racinaires produits sont très fragiles : les racines sont fines, blanchâtres et facilement cassantes. De plus, des cals prolifèrent au niveau de la base de la plantule et cela avant l'émission de racines.

**Tableau 5. Pourcentage de pousses enracinées *in vitro*, dans un milieu liquide et sur milieu solide après trempage dans une solution d'AIA à 12 mg.l<sup>-1</sup>**

Type de milieu	Nombre de pousses enracinées	%	Nombre de pousses développées sur tourbe	%
Liquide	18	90	6	33,3
Solide	20	100	19	95

La seconde technique utilisée en milieu solide est de loin la plus performante puisqu'elle permet le transfert sur tourbe de 19 pousses sur 20 (taux de réussite de 95%). De plus, nos résultats montrent qu'en ce qui concerne la solution de trempage, il n'est pas nécessaire d'utiliser l'AIA à 20 mg.l<sup>-1</sup> ou l'AIB à 50 mg.l<sup>-1</sup> pendant deux heures, comme l'avaient décrit Xiao *et al.* (1991). Le trempage des pousses dans une solution d'AIA à 12 mg.l<sup>-1</sup> pendant une minute est suffisant. Le charbon activé semble avoir une action bénéfique sur le développement du système racinaire puisqu'après 10 jours, les racines sont bien développées et affleurent à la surface du milieu ou contre la paroi du conteneur (Gui, 1979). Aucun changement morphologique des plantes obtenues n'a été observé.

## CONCLUSION

L'hypochlorite à 10%, en présence de Tween 20 et sous agitation, permet une décontamination de 97% des explants de kiwi. La callogenèse et la formation de pousses ont été obtenues pour l'ensemble des explants expérimentés. Sur le milieu M<sub>5</sub> (MS + AIB à 6,0 mg.l<sup>-1</sup> + kinétine à 2,0 mg.l<sup>-1</sup> + BAP à 2,0 mg.l<sup>-1</sup>), le rendement obtenu, et particulièrement pour les explants de pétioles, est de 4,75 bourgeons par cal après 10 semaines de culture. Cette méthode pourrait être appliquée à la micropropagation de cette plante.

D'autre part, les nœuds constituent un matériel très intéressant. En effet, 15 à 20 jours seulement sont nécessaires pour multiplier ces explants. De plus, ce matériel peut être utilisé à une période de l'année (décembre) où les plants de kiwi sont dormants.

## RÉFÉRENCES CITÉES

- Blanchet P. (1985) Les dégâts de gels sur le kiwi (*Actinidia chinensis* Planchon). *Arboriculture fruitière* 370 : 43-49
- Brossard-Chriqui D. & Tripathi B.K. (1984) Comparaison des aptitudes morphogénétiques des étamines fertiles ou stériles d'*Actinidia chinensis* cultivées *in vitro*. *Can.J.Bot.* 62 : 1940-1946
- Canhoto J.M. & Cruz G. (1987) *In vitro* multiplication of *Actinidia* by culture of young leaves. *Bol. Soc. Broteriana Coimbra*. 60 : 235-251
- Evans D.A. & Sharp W.R. (1986) Somaclonal and gametoclonal variation *In Handbook of plant cell culture*. Mac Millan Publishing. New-York, 4 : 20-21
- Ferguson A.R. (1984) Kiwifruit : a botanical review. *Hort. Rev.* 6 : 1-64
- Fraser L.G. & Harvey C.F. (1986) Somatic embryogenesis from anther derived callus in two *Actinidia* species. *Sci. Hort.* 29 : 335-346
- Gui Y.L. (1979) Induction of callus and regeneration of plantlets in stem segment culture of chinese gooseberry. *Acta Bot. Sin.* 21 : 340-344
- Gui Y.L., Mu S.J. & Xu T.Y. (1982) Studies on morphological differentiation of endosperm plantlets of chinese gooseberry *in vitro*. *Acta Bot. Sin.* 24 : 216-221
- Hirsch A.M. & Fortune D. (1990) Organogenèse dans les cultures de tissus de plantes appartenant au G/*Actinidia chinensis* et *Actinidia polygama*. Relation entre organogenèse et peroxydase. *C.R.Acad.Sc. Paris T288 série D* : 1159-1162
- Huang Z.G. & Tan C.Y. (1988) Chinese gooseberry, kiwifruit (*Actinidia spp.*). *In Biotechnologie in Agriculture and forestry*. Academic Press, 6 crops II : 166-180
- Magdeleine C. (1982) Étude de la multiplication végétative des plantes mâles et femelles d'*Actinidia chinensis*, à partir d'explants foliaires cultivés *in vitro*. D.E.A de Biologie et Physiologie Végétales, Université Pierre et Marie Curie, Paris
- Monette P.L. (1986) Micropropagation of kiwifruit using non-axenic tips. *Plant cell tissue organ culture* 6 : 73-82
- Murashige T. & Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant* 15 : 473-497

- Predieri S., Mezzeti B. & Ranieri R. (1988) Rigenerazione *in vitro* de foglie di *Actinidia deliciosa* cultivar Hayward. *Rivista di Frutticoltura* 11 : 69-72
- Sammarcelli F. (1988) Callogenèse et régénération par culture *in vitro* chez *Actinidia deliciosa* (cultivar Hayward). D.E.A de Sciences Agronomiques. Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier
- Sammarcelli F. & Legave. (1990) Multiplication *in vitro* par néoformation chez l'*Actinidia deliciosa*, cultivar Hayward. *Fruits* 45 : 4
- Standardi A. (1983) La micropropagazione nella moltiplicazione dell'*Actinidia*. *Frutticoltura*. 43 : 17-22
- Velayandom L., Hirsch A.M. & Fortune D. (1985) Propagation du Kiwi, *Actinidia chinensis* (PL.) Planchon par microbouturage *in vitro* de nœuds. *C.R.Acad.Sc.Paris*. 301, série III : 12
- Watanabé K. & Takahashi B. (1987) Effects of growth regulators on the callus and organ formation from tissue segments of Kiwifruit (*Actinidia chinensis* Planch.) shoot. *Bull.Coll.Agr and Vet. Med. Nihon Univ.* 44 : 136-141
- Wessels E., Nel D.D. & Von Staden D.F.A. (1984) *In vitro* propagation of *Actinidia chinensis* PL. cultivar Hayward. *Decidious fruit grower* (12). 34 : 453-457
- Wiyaporn S., Subhadrabandhu S. & Sahavacharin O. (1990) *In vitro* vegetative multiplication of Kiwiplant. *Acta-Hortic. Wageningen : International Society for Horticultural Scienc.* 279 : 447-459
- Xiao X.G. (1990) Micropropagation du kiwi (*Actinidia spp*) à partir de disques foliaires cultivés *in vitro*. D.E.A de Biologie Végétale Tropicale, Université Pierre et Marie Curie, Paris
- Xiao X.G., Hirsch A.M. & Fortune D. (1991) Régénération du Kiwi (*Actinidia deliciosa* cultivar Hayward) à partir de jeunes feuilles. *Fruits (France)* 46 (1) : 57-66