

# Régénération du kiwi (*Actinidia deliciosa* cultivar Hayward) à partir de jeunes feuilles.

X.G. XIAO, Anne-Marie HIRSCH et Dominique FORTUNE\*

METHOD OF KIWIFRUIT (*ACTINIDIA DELICIOSA*, CULTIVAR HAYWARD) MICROPROPAGATION BY LEAF TISSUE CULTURE.

X.G. XIAO, Anne-Marie HIRSCH et Dominique FORTUNE.

*Fruits*, Jan.-Feb. 1991, vol. 46, n° 1, p. 57-66.

**ABSTRACT** - A method of micropropagation of Kiwifruit using the tissue culture techniques applied to disks of leaf tissue is proposed. Several different modes of callogenesis and of organogenesis have been evidenced in primary cultures. Three types of calli have been described : large calli devoid of morphogenic ability and two types of smaller but very dense calli. These last types of high organogenic calli gave abundantly way to shoots ; the rooting of such shoots is easily obtained but a previous transfer on a lengthening medium is necessary before root induction. **These organogenic calli also produced somatic embryos, though with a low yield** ; these embryos however developed very well into quite normal looking plants. 43 hormonal combinations have been studied in order to optimize the shoot production. The three following associations were the most favorable ones for shoot initiation : zeatin ( $1 \text{ mg l}^{-1}$ ) associated to 3-indole-acetic acid ( $0.5 \text{ mg l}^{-1}$ ), 6-benzylaminopurine ( $2 \text{ mg l}^{-1}$ ) associated to 3-indole-acetic acid ( $0.5 \text{ mg l}^{-1}$ ), 6 benzylaminopurine ( $2 \text{ mg l}^{-1}$ ) associated to 1-naphthalene-acetic acid ( $0.5 \text{ mg l}^{-1}$ ). Cytokinins, like zeatin, 6-benzylaminopurine, have a positive effect on the lengthening of shoots, gibberellic acid being inactive. The quick-dipping method into a concentrated solution of auxin (2 hours in 3-indolebutyric acid  $50 \text{ mg l}^{-1}$ ), applied to shoots, allowed rooting of shoots with an excellent yield, up to 80%.

REGENERATION DU KIWI (*ACTINIDIA DELICIOSA* CULTIVAR HAYWARD) A PARTIR DE JEUNES FEUILLES.

X.G. XIAO, Anne-Marie HIRSCH et Dominique FORTUNE.

*Fruits*, Jan.-Feb. 1991, vol. 46, n° 1, p. 57-66.

**RESUME** - Plusieurs modalités différentes de callogénèse et d'organogénèse ont été mises en évidence par culture *in vitro* de disques de tissu foliaire. Trois types de cals ont été caractérisés : des cals hyperhydriques de grande taille dépourvus de capacité organogène, des cals plus petits et moins hyperhydriques et des cals denses, très petits en taille. Ces deux derniers types de cals très caulogènes ont formé en abondance des pousses feuillées. Ils ont également formé, mais avec un faible rendement, des embryons somatiques qui se sont très bien développés, donnant naissance à des plantes d'aspect parfaitement normal. Quarante-trois combinaisons hormonales ont été étudiées dans le but d'optimiser la production des pousses feuillées. Les trois conditions les plus efficaces pour l'induction de la caulogénèse sont : la zéatine associée à l'acide 3-indole-acétique, la 6-benzylaminopurine associée à l'acide 3-indole-acétique et la 6-benzylaminopurine associée à l'acide 1-naphthalène-acétique. Après passage sur milieu d'allongement, les pousses feuillées se sont enracinées facilement et avec un très bon rendement (jusqu'à 80 p. 100) grâce à une méthode de trempage rapide (2 h) dans une solution concentrée d'auxine (acide 3-indole-butyrique à  $50 \text{ mg l}^{-1}$ ).

## INTRODUCTION

Le kiwi, communément appelé groseille chinoise, Mihoutao, Yangtao, est probablement l'espèce fruitière originaire de Chine la plus récente à avoir été acclimatée dans le monde hors de Chine. Sa culture s'est fortement développée au cours des dernières années et occupe une place de plus en plus importante dans l'économie agricole de certains pays. Cependant la plupart des vergers ont été constitués avec un seul cultivar : Hayward, à partir de plants bouturés venus directement ou indirectement de Nouvelle-Zélande. Cette unicité porte en elle les germes d'une grande fragilité notam-

ment vis-à-vis des agents pathogènes, parasites ou autres. En outre, le cultivar Hayward s'adapte mal à diverses conditions pédoclimatiques, surtout au froid (BLANCHET, 1985).

Pour améliorer le kiwi autrement que par les méthodes traditionnelles d'amélioration génétique et obtenir des variétés nouvelles mieux adaptées aux conditions pédoclimatiques, produisant des fruits de meilleure qualité et surtout se conservant mieux, on fait appel aux techniques de culture *in vitro*. Ces techniques permettent d'utiliser la variabilité somaclonale (EVANS et SHARP, 1986 ; HUANG et TAN, 1988) exprimée en culture *in vitro* dans un but d'amélioration variétale. On espère en effet pouvoir exprimer le potentiel morphogénétique des tissus par la régénération à partir de cals et arriver ainsi à produire rapidement des plantes présentant des caractères intéressants qui pourraient être utilisés dans un programme d'amé-

\* - X.G. XIAO, Anne-Marie HIRSCH et Dominique FORTUNE, Laboratoire d'Histophysiologie végétale, Université Pierre et Marie Curie 12, rue Cuvier - 75005 PARIS - U.R.A. 1180, CNRS.

Xing-Guo XIAO - Institut de Recherches sur les Arbres fruitiers à ZHENG-ZHOU CAAS 450004, ZHENG-ZHOU, R.P. Chine (adresse permanente).

lioration variétale. Pour ce faire, il faut tout d'abord mettre au point une méthode rapide et productive pour obtenir un nombre élevé de plantes.

La régénération du kiwi par culture *in vitro* de segments de tige d'*A. deliciosa* et d'*A. chinensis* a été étudiée et exploitée depuis longtemps (HIRSCH, 1970 ; HARADA, 1975 ; GUI, 1979 ; STANDARDI, 1981 et 1983 ; HUANG *et al.*, 1980 et 1984). Par contre, l'utilisation de jeunes feuilles comme matériel permettant la régénération du kiwi n'est étudiée que depuis peu et a surtout donné matière à des études qualitatives. Parmi ces études qualitatives, nous signalerons tout d'abord le travail de MAGDELEINE (1982) réalisé au Laboratoire d'Histophysiologie végétale de l'Université Pierre et Marie Curie sur *A. chinensis* L. PLANCHON. MAGDELEINE fut l'une des toutes premières à obtenir des pousses feuillées à partir de disques foliaires. Nous citerons aussi les travaux de HONG (1981) sur *A. arguta*, de KUANG *et al.* (1983) sur *A. melanandra* qui signalèrent aussi la possibilité de régénérer des plantes entières à partir de tissus de feuilles. Plus récemment, deux études ont abordé ce problème de façon plus approfondie : ce sont celles de CANHOTO *et al.* (1987) et de PREDIERI *et al.* (1988) sur *A. chinensis* et *A. deliciosa*, qui ont étudié l'action respective de différentes auxines et cytokinines sur la production de pousses feuillées à partir de tissu foliaire.

L'un des problèmes rencontrés lors de la micropropagation *in vitro* à grande échelle du kiwi (*A. deliciosa* cultivar Hayward), surtout lorsque le matériel mis en culture consiste en noeuds, entre-noeuds ou pétioles prélevés en verger, est la décontamination (SAMMARCELLI, 1988). L'un d'entre nous a montré que ce problème est bien moindre quand on utilise comme matériel de culture de jeunes feuilles (XIAO, 1990).

Le but de notre travail a été d'optimiser les conditions de la callogénèse et de la caulogénèse à partir de disques de jeunes feuilles par la recherche des combinaisons hormonales les plus favorables, et d'optimiser également les conditions d'enracinement des pousses feuillées ainsi obtenues.

## MATERIEL ET METHODES

### Matériel de culture.

Le matériel mis en culture est constitué par de jeunes feuilles prélevées sur des pousses feuillées de 5 à 8 cm de longueur produites par vitroculture (fournies par les Ets DELBARD). Des disques foliaires de 8 mm de diamètre sont prélevés stérilement sur ces feuilles et déposés sur le milieu de culture réparti aseptiquement dans des boîtes de Pétri stériles de 10 cm de diamètre. Pour chacune des combinaisons hormonales testées, l'étude a porté sur 30 disques foliaires et les résultats ont été soumis à une analyse statistique (test de Student).

### Milieus de culture.

- Milieu utilisé pour la callogénèse et l'organogénèse.

Le milieu de base pour l'étude de la callogénèse et de l'organogénèse est la solution minérale du milieu B<sub>5</sub> (GAMBORG *et al.*, 1968) contenant du saccharose (30 g l<sup>-1</sup>) et

solidifié par la gélose (agar-agar 6,5 g l<sup>-1</sup>). Quarante-trois combinaisons hormonales de concentrations différentes ont été essayées, des cytokinines : zéatine (Zéa, 1, 2 et 5 mg l<sup>-1</sup>), isopentényladénine (IPA 1 et 2 mg l<sup>-1</sup>), 6-benzylaminopurine (BAP 1 et 2 mg l<sup>-1</sup>), et des auxines : acide naphthalène-acétique (ANA 0, 0,5 et 1 mg l<sup>-1</sup>), acide 3-indolacétique (AIA 0, 0,5 et 1 mg l<sup>-1</sup>) et acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D 0, 0,5 et 1 mg l<sup>-1</sup>). Après ajustement du pH à 5,7, le milieu est stérilisé à l'autoclave à 110°C pendant 20 minutes puis réparti en boîtes de Pétri stériles à raison de 20 ml par boîte.

- Milieu d'allongement des pousses feuillées.

Deux solutions minérales : la solution du milieu B<sub>5</sub> (GAMBORG, 1968) et la solution MS (MURASHIGE et SKOOG, 1962) ont été retenues. On ajoute à la solution minérale du saccharose (30 g l<sup>-1</sup>) et de la gélose (agar-agar 6,5 g l<sup>-1</sup>). L'effet de 12 combinaisons hormonales réalisées à partir de 3 régulateurs de croissance : Zéa (1 mg l<sup>-1</sup>), BAP (1 mg l<sup>-1</sup>) et acide gibbérellique (GA<sub>3</sub> 1 mg l<sup>-1</sup>) a été étudié. Le milieu de culture après ajustement du pH à 5,7 est réparti dans des tubes de culture (de 29 mm de diamètre et de 160 mm de longueur) puis stérilisé à l'autoclave à 110°C pendant 20 minutes.

- Milieu d'enracinement des pousses feuillées.

Le milieu de base est constitué par la solution minérale de MS diluée de moitié, additionnée de saccharose (10 g l<sup>-1</sup>) et de gélose (agar-agar 6,5 g l<sup>-1</sup>). On ajoute à ce milieu de l'ANA (0,1 mg l<sup>-1</sup>) sauf lorsqu'on pratique l'enracinement par la méthode dite du trempage rapide («quick dip»). Le milieu est réparti soit en tubes (voir milieu d'allongement) ou en bocal de 1 l à raison de 250 ml par bocal puis stérilisé à l'autoclave.

### Conditions d'éclairage et de température des cultures.

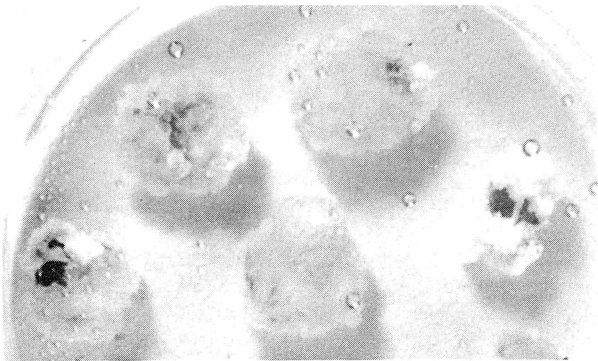
Pour obtenir callogénèse et caulogénèse, les cultures sont laissées à l'obscurité à 25°C ± 1°C pendant une semaine, puis exposées pendant 48 h en lumière rouge continue (TL 15 40W Philips, λ = 655 nm, E = 0,2 W/m<sup>2</sup>) puis placées en lumière blanche (tubes Blanc Brillant OSRAM 40W, E = 2,8 W/m<sup>2</sup>) à 25°C ± 1°C.

Pendant la période d'allongement et d'enracinement des pousses feuillées, celles-ci sont cultivées en lumière blanche sous une photo-période de 16 h à 26°C ± 1°C.

## RESULTATS

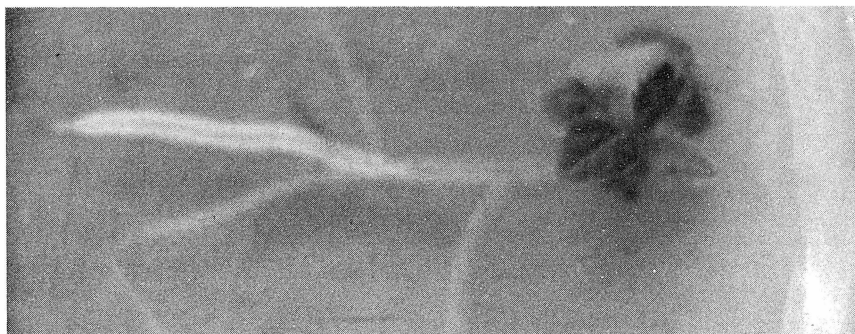
Caractérisation de la callogénèse, de l'organogénèse (caulogénèse et rhizogénèse) ainsi que de l'embryogénèse somatique des disques foliaires.

Le diamètre des disques foliaires s'accroît très rapidement dès la mise en culture : au bout de 4 à 5 jours, leur diamètre passe en moyenne de 8 à 14 mm. Après 4 semaines, on observe plusieurs types de croissance et de développement :



**Photo 1** - Mise en culture de disques foliaires en présence de 2,4-D, abondante callogénèse mais aucun phénomène de bourgeonnement.

**Photo 2** - Mise en culture de disques foliaires en présence d'ANA ou d'AIA, abondante caulogénèse, formation de nombreuses pousses feuillées.



**Photo 3** - Régénération de plantule d'aspect tout à fait normal à partir d'embryon somatique apparu sur des cals de type 2 et 3.

- disques ne formant que des cals (callogénèse) (photo 1),
- disques donnant des pousses feuillées (photo 2),
- disques donnant des racines,
- disques donnant des racines et des pousses feuillées.

Les résultats de la callogénèse laissent apparaître des différences en qualité et en quantité. On note 3 types de cals :

- un cal hyperhydrique, de grande taille, de couleur blanche et recouvert d'une couche de cellules translucides. Ce type de cal ne donne ni pousse feuillée ni racine, même

après transfert à la lumière blanche sur milieu frais sans auxines. Ce cal est dit de type 1.

- un cal plus petit et moins hyperhydrique que le précédent, de couleur blanc-vert. Ce type de cal possède une forte capacité organogène : même en lumière rouge et non repiqué, il produit des pousses feuillées et des racines. Ce cal est dit de type 2.
- un cal dense, très petit en taille, de couleur vert-blanc. Ce type de cal est concentré à l'extrémité des nervures et donne aussi des pousses feuillées et des racines mais en nombre bien inférieur au type précédent après un mois de culture. Ce cal est dit de type 3.

Un phénomène d'embryogénèse somatique a pu être observé à partir des cals de types 2 et 3. Les embryons obtenus se sont parfaitement développés (photo 3) mais la fré-

quence de ce phénomène est encore assez faible dans l'état actuel de nos résultats.

Du point de vue morphologique, le cal provient de différentes parties du disque mis en culture. La plupart des cals proviennent des sections des nervures principales et secondaires et apparaissent sur les deux faces du disque foliaire. Certains disques sont couverts de cals sur toute leur surface, d'autres n'en comportent que sur la nervure ou sur la section de nervure.

On note également plusieurs origines pour les pousses

feuillées :

- à partir de section de nervure, directement et sans formation de cal ;
- à partir des deux faces du disque où on peut parfois voir de petits calcs à la base de la pousse ;
- à partir d'un cal, ce cas est le plus fréquent. La formation de pousses feuillées n'obéit à aucune polarité : elles se développent à partir des deux faces du disque indifféremment, quelle que soit leur position par rapport au milieu.

Ces trois origines qui viennent d'être décrites pour les pousses feuillées sont également notées dans le cas de la rhizogénèse mais il existe ici une polarité : la plupart des racines proviennent directement de l'extrémité inférieure des nervures. Lorsque les racines proviennent de calcs, elles sont plus longues et plus grosses que dans le cas précédent et peuvent se ramifier.

D'une façon générale, c'est la face du disque qui est au contact du milieu qui est la plus organogène. Ces différents aspects sont liés aux régulateurs de croissance entrant dans la composition du milieu.

#### Influence des différents régulateurs de croissance sur la réactivité des disques de jeunes feuilles.

- Effet de différentes auxines.

- Action du 2,4-D.

L'utilisation du 2,4-D combiné avec Zéa, IPA ou BAP stimule fortement la formation et la croissance des calcs. Les calcs obtenus appartiennent au type 1. Leur taille atteint en moyenne 17,2 mm de diamètre et ils couvrent toute la surface du disque. Cet effet du 2,4-D est durable : en effet, le transfert de ces calcs sur des milieux dépourvus de 2,4-D et d'autres auxines ne modifie pas leur vitesse de croissance ni leurs capacités organogènes. Au bout de deux

mois de culture en lumière blanche, on note que les calcs ne deviennent pas organogènes et que certains se nécrosent. (tableau 1).

- Action de l'ANA.

L'ANA utilisé aux concentrations de 0,5 mg l<sup>-1</sup> et 1 mg l<sup>-1</sup> est aussi efficace que le 2,4-D sur l'induction et la formation de calcs chez les jeunes feuilles (tableau 1). Mais le cal induit par l'ANA diffère de celui induit par le 2,4-D : il est de plus petite taille (Ø moyen 13,7 mm) et moins hyperhydrique, il appartient au type 2. En lumière rouge, la plupart des calcs apparaissent blanc-verdâtre. Une fois transférés en lumière blanche, les calcs verdissent et les processus organogènes s'accroissent. Beaucoup de petits mamelons apparaissent sur le cal à partir desquels se forment de nombreuses pousses feuillées (photo 2). On note également la formation de racines sur le cal. La capacité d'organogénèse globale de l'ANA est beaucoup plus élevée que celle du 2,4-D. En ce qui concerne le nombre total de pousses feuillées observées sur le disque foliaire, l'ANA est l'auxine la plus efficace, et ceci à la concentration de 0,5 mg l<sup>-1</sup>. L'apparition anarchique de racines sur les calcs est un phénomène gênant, notamment lorsqu'il s'agit de faire raciner correctement les pousses feuillées pour régénérer des plantes entières.

L'action combinée de l'ANA et des cytokinines sur la caulogénèse a été représentée dans la figure 1. Quelle que soit la cytokinine utilisée, c'est la concentration d'ANA égale à 0,5 mg l<sup>-1</sup> qui est la plus efficace sur le bourgeonnement. C'est l'association Zéa-ANA qui assure le meilleur pourcentage de pousses feuillées (28,57 p. 100) ; vient ensuite l'association BAP-ANA (19,82 p. 100), et enfin loin derrière l'association IPA-ANA (3,13 p. 100).

TABLEAU 1 - Effet comparé de différentes concentrations d'auxines sur la caulogénèse et sur l'organogénèse (caulogénèse et rhizogénèse) des disques foliaires.

Auxine	Concentration mg l <sup>-1</sup>	Nombre de disques mis en culture	p. 100 de disques ayant développé un cal	Diamètre des calcs (mm)	Organogénèse			
					p. 100 de calcs organogènes	p. 100 de calcs avec pousses feuillées	p. 100 de calcs avec racines	p. 100 de calcs avec pousses feuillées et racines
Témoin	0	97	98 a	14,86 a	44,33 a	32,99 a	11,34 b	0 b
2,4-D	1	370	95,68 a	17,22 b	0 b	0 d	0 c	0 b
ANA	0,5 et 1	333	95,2 a	13,74 a	38,43 a	11,74 c	23,72 a	3,00 a
AIA	0,5 et 1	330	98,18 a	14,38 a	37,37 a	20,30 b	15,45 b	1,52 a
ANA	0,5	144	97,92 a	13,47 a	45,83 a	20,14 a	23,61 a	2,08 a
	1	189	93,12 b	14,01 a	32,80 b	5,29 b	23,81 a	3,70 a
AIA	0,5	186	97,31 a	14,00 a	40,32 a	24,73 a	15,05 a	0,54 a
	1	144	99,31 b	14,75 a	33,33 a	14,58 b	16,67 a	2,15 b

(a,b,c,d) des lettres différentes dans la même colonne indiquent que la différence est statistiquement significative. La même lettre dans la même colonne montre que la différence n'est pas significative. Test de Student  $p < 0,05$ .

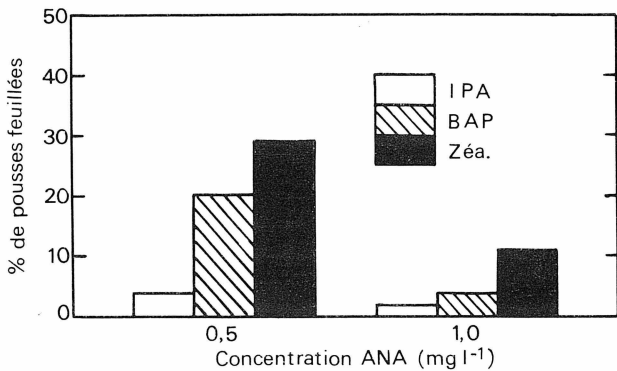


Fig. 1 • ACTION COMBINÉE DE L'ANA ET DES CYTOKININES SUR LA CAULOGÈNESE.

- Action de l'AIA.

L'AIA (0,5 et 1 mg l<sup>-1</sup>) a un effet callogène très voisin de celui du témoin. Le cal induit par l'AIA est de type 3, de petite taille, concentré à l'extrémité des nervures des disques, dense et de couleur verte. Après 4 semaines de mise en culture, ces cals possèdent une grande capacité caulogène et rhizogène (tableau 1). Les pousses feuillées apparaissent même en lumière rouge. Lorsque les cultures sont transférées en lumière blanche, la surface de certains cals rougit par transformation de leuco-anthocyanes en anthocyanes ; cela est sans influence sur la capacité caulogène des cals. Ces cals caulogènes sont mamelonnés et on peut y observer la formation de nombreux embryons somatiques au bout de deux mois de culture. Des deux concentrations d'AIA essayées, c'est la concentration de 0,5 mg l<sup>-1</sup> qui est la plus efficace pour la caulogénèse (tableau 1).

L'action combinée de l'AIA et des cytokinines sur la caulogénèse a été représentée sur la figure 2. C'est la combinaison 0,5 mg l<sup>-1</sup> d'AIA et Zéa qui est la plus efficace sur l'induction de la caulogénèse (51,72 p. 100 des disques forment des pousses feuillées), viennent ensuite les associations 1 mg l<sup>-1</sup> d'AIA et Zéa et puis enfin de 0,5 mg l<sup>-1</sup> d'AIA et BAP, avec 27,08 p. 100 et 12,5 p. 100 de pousses feuillées respectivement (figure 2).

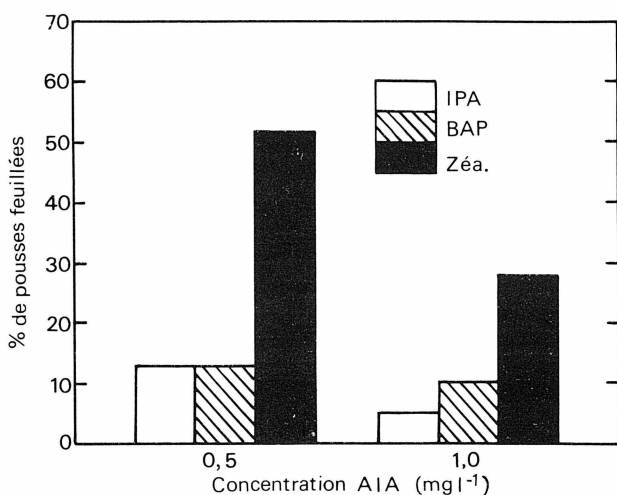


Fig. 2 • ACTION COMBINÉE DE L'AIA ET DES CYTOKININES SUR LA CAULOGÈNESE.

- Effet comparé des différentes auxines sur la callogénèse et la caulogénèse.

On peut conclure de l'examen du tableau 1 que le 2,4-D est l'auxine la plus efficace en ce qui concerne l'induction et la formation de cals, mais les cals formés sont de type 1 (de nature hyperhydrique) alors que les cals induits par l'ANA et l'AIA sont de types 2 et 3. L'ANA et l'AIA ont un effet organogène important. En ce qui concerne la callogénèse et l'organogénèse totale (caulogénèse et rhizogénèse), l'ANA et l'AIA ont des capacités très voisines. Par contre, c'est en présence d'AIA que la capacité caulogène est la plus forte. L'effet rhizogène au niveau du cal est très important en présence d'ANA.

• Effet de différentes cytokinines.

- Action de la zéatine.

Aux deux concentrations de Zéa étudiées (1 et 2 mg l<sup>-1</sup>), cette cytokinine présente un effet callogène très important. L'étude quantitative du pouvoir callogène et organogène de la Zéa figure dans le tableau 2. Sous l'effet des associations zéatine-auxine, la structure du cal dépend de la nature de l'auxine utilisée. Ainsi le cal induit par l'association Zéa-2,4-D est de type 1, dans l'association Zéa-ANA, le cal est de type 2, alors que l'association Zéa-AIA induit des cals intermédiaires entre les types 2 et 3. La capacité organogène de la zéatine dépend également de ses combinaisons avec les différentes auxines : les résultats obtenus figurent dans la figure 3. Quand la zéatine est combinée au 2,4-D (0,5 et 1 mg l<sup>-1</sup>), il ne se produit aucune organogénèse au bout de deux mois de culture. Au contraire, quand la zéatine est combinée avec l'ANA et l'AIA, on observe l'induction de nombreuses pousses feuillées ainsi que celle de racines (figure 3 et tableau 2).

- Action de la BAP.

Les résultats concernant la callogénèse sont les mêmes que ceux obtenus avec Zéa : dans les associations BAP-auxines, la structure du cal dépend de l'auxine utilisée.

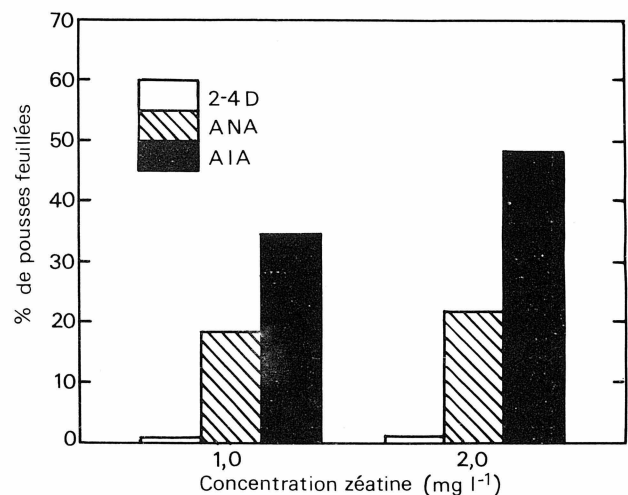


Fig. 3 • ACTION COMBINÉE DE LA ZÉATINE ET DES AUXINES SUR LA CAULOGÈNESE.

TABLEAU 2 - Effet comparé de différentes concentrations de cytokinines sur la callogénèse et sur l'organogénèse (caulogénèse et rhizogénèse) des disques foliaires.

Cytokinine	Concentration mg l <sup>-1</sup>	Nombre de disques mis en culture	p. 100 de disques ayant développé un cal	Diamètre des cals (mm)	Organogénèse			
					p. 100 de cals organogènes	p. 100 de cals avec pousses feuillées	p. 100 de cals avec racines	p. 100 de cals avec pousses feuillées et racines
Zéa	1	225	98,67 a	15,97 a	24,89 a	16,89 a	5,33 a	2,67 a
	2	186	96,68 a	15,37 a	23,49 a	21,79 a	1,08 a	1,08 a
BAP	1	168	96,42 a	14,62 a	24,40 a	5,36 b	14,29 a	0,6 a
	2	256	83,20 b	14,61 a	15,23 b	7,42 a	7,03 b	0,78 a
IPA	1	189	95,00 a	14,98 a	30,11 a	3,17 a	26,46 a	0 a
	2	168	99,83 b	14,34 a	29,17 a	5,95 a	20,83 a	2,38 b
Zéatine	1 et 2	411	97,80 a	15,77 a	26,52 a	21,17 a	3,41 c	1,95 a
BAP	1 et 2	424	88,62 b	14,62 b	18,87 b	8,25 b	9,91 b	0,71 c
IPA	1 et 7	357	95,80 a	14,68 a	29,41 a	4,48 c	23,81 a	1,12 b

(a, b, c) voir tableau 1

Par contre, en ce qui concerne l'organogénèse, les deux concentrations de BAP étudiées (1 et 2 mg l<sup>-1</sup>), ont des effets différents : la concentration de 1 mg l<sup>-1</sup> est globalement plus organogène que celle de 2 mg l<sup>-1</sup>, alors que cette dernière est plus efficace sur la caulogénèse et diminue l'effet rhizogène (tableau 2). La figure 4 montre l'effet des associations BAP-auxines. Le meilleur rendement de la caulogénèse est observé pour l'association BAP (2 mg l<sup>-1</sup>) et AIA. En outre, de toutes les combinaisons hormonales étudiées, c'est l'association BAP (2 mg l<sup>-1</sup>) et ANA qui permet d'obtenir le nombre maximal de pousses feuillées par disque.

#### - Action de l'IPA.

Comme pour les deux cytokinines précédentes, c'est de la nature de l'auxine associée à IPA que dépend la structure du cal. On ne constate pas de différences d'effet organogène entre les deux concentrations de IPA étudiées

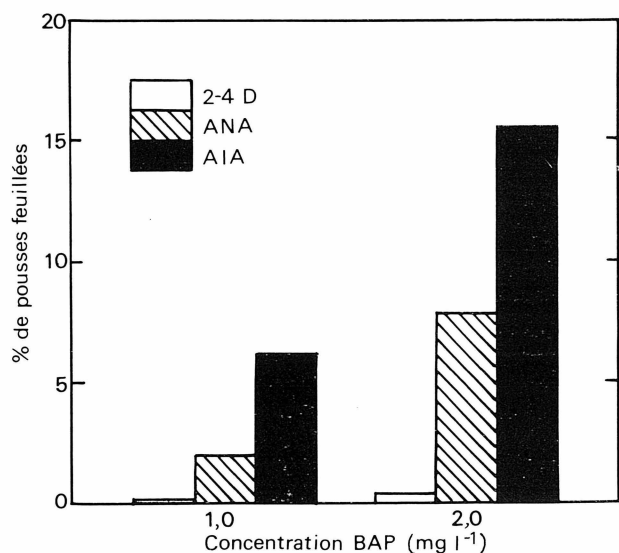


Fig. 4 • ACTION COMBINÉE DE LA BAP ET DES AUXINES SUR LA CAULOGÉNESE.

(1 et 2 mg l<sup>-1</sup>, tableau 2). L'action rhizogène de IPA sur les cals est très importante, ce qui constitue plutôt une gêne dans la régénération des plantes entières. En ce qui concerne l'effet des associations IPA-auxines, la figure 5 montre que l'association IPA (2 mg l<sup>-1</sup>) et AIA est la plus efficace pour l'induction des pousses feuillées alors que les associations IPA et 2,4-D n'induisent que des cals sans aucune organogénèse.

#### - Effet comparatif des différentes cytokinines sur l'organogénèse.

L'effet des trois cytokinines étudiées est identique sur le rendement de la callogénèse (tableau 2). Toutefois, la structure du cal dépend de la nature de l'auxine associée à la cytokinine étudiée. En ce qui concerne la capacité organogène globale, Zéa et IPA ont un effet similaire et bien supérieur à celui de BAP (tableau 2). Pour ce qui est de la caulogénèse, Zéa est la plus efficace ; en ce qui concerne la rhizogénèse des cals, c'est IPA qui donne les meilleurs résultats.

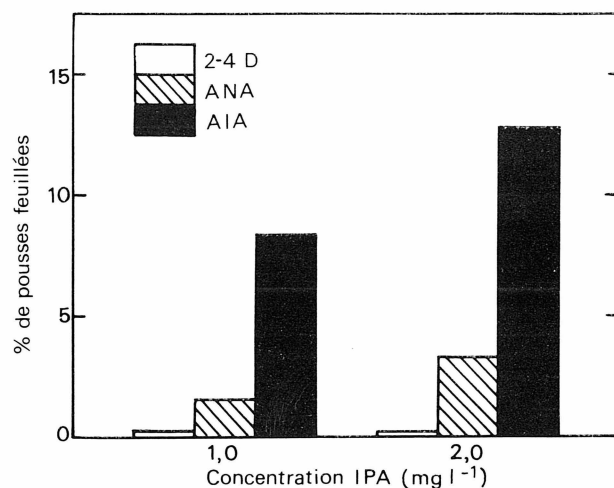


Fig. 5 • ACTION COMBINÉE DU IPA ET DES AUXINES SUR LA CAULOGÉNESE.



**Photo 4** - Néoformation avec un excellent rendement de pousses feuillées à partir de disques foliaires cultivés en présence de BAP ( $2 \text{ mg l}^{-1}$ ) et d'ANA ( $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ ).

leurs résultats (tableau 2). Le rendement en pousses feuillées par disque foliaire est maximal avec l'association BAP-ANA (photo 4).

#### Allongement des pousses feuillées.

Au premier stade de la caulogénèse, on ne voit pas l'apex des pousses feuillées ; deux mois après, l'apex est visible sur certaines d'entre elles, mais la plupart sont sans apex avec des feuilles étroites et longues, de caractère juvénile. Le passage sur milieu d'allongement est une étape indispensable pour pouvoir par la suite enraciner les pousses feuillées. Les critères d'allongement retenus sont le nombre de tigelles par disque foliaire et la longueur de la tigelle. Pour chacune des conditions étudiées, 24 explants ont été essayés et les résultats analysés par le test de Student.

- Influence de la solution minérale du milieu nutritif sur l'allongement des pousses feuillées.

La longueur des tigelles est significativement supérieure sur MS par rapport à B<sub>5</sub>, mais le nombre de tigelles par disque est le même avec les deux solutions (tableau 3).

- Influence de deux cytokinines : Zéa et BAP.

Zéa ( $1 \text{ mg l}^{-1}$ ) et BAP ( $1 \text{ mg l}^{-1}$ ) stimulent l'allongement des tigelles de pousses feuillées. Comparée aux témoins sans phytohormones, la longueur des tigelles provenant de disques foliaires cultivés sur milieux additionnés de Zéa et de BAP est double. Avec Zéa ou BAP, le nombre de tigelles par disque est également plus élevé que celui des témoins (tableau 4). Cependant, entre Zéa et BAP, il n'apparaît de différence significative ni quant à la longueur de la tigelle ni quant au nombre de tigelles par disque.

- Influence de l'acide gibberellique (GA<sub>3</sub>).

Contrairement à Zéa et à BAP, GA<sub>3</sub> ne stimule pas significativement l'allongement des pousses feuillées. La

**TABLEAU 3** - Influence de la solution minérale sur l'allongement des pousses feuillées.

Milieu	Longueur des tiges	Nombre de tiges par disque
B <sub>5</sub>	12,75 a	11,19 a
MS	16,07 b	10,31 a

(a, b) voir tableau 1.

24 explants ont été mis en culture pour chacune des conditions étudiées.

**TABLEAU 4** - Influence de zéatine, BAP et GA<sub>3</sub> sur l'allongement des pousses feuillées.

Traitement	Longueur des tiges (mm)	Nombre des tiges par disque
1. Témoin (sans phytohormone)	8,46 a	2,72 a
2. Zéa ( $1 \text{ mg l}^{-1}$ ) + GA <sub>3</sub> ( $1 \text{ mg l}^{-1}$ )	19,13 b	17,47 b
3. Zéa ( $1 \text{ mg l}^{-1}$ )	19,02 b	15,67 b
4. BAP ( $1 \text{ mg l}^{-1}$ ) + GA <sub>3</sub> ( $1 \text{ mg l}^{-1}$ )	14,7 b	9,99 ab
5. BAP ( $1 \text{ mg l}^{-1}$ )	16,95 b	15,33 b
6. GA <sub>3</sub> ( $1 \text{ mg l}^{-1}$ )	8,82 a	3,34 a

(a, b) voir tableau 1.

24 explants ont été mis en culture pour chacune des combinaisons étudiées.

longueur des tigelles et leur nombre par disque sont les mêmes que chez les témoins ; de même associé à Zéa ou à BAP, GA<sub>3</sub> n'a pas d'effet positif sur l'allongement des pousses feuillées (tableau 4).

#### Enracinement des pousses feuillées.

Soixante pousses feuillées avec tigelles de 3-4 cm de longueur sont mises à raciner. Deux méthodes d'enracinement ont été essayées sur deux lots de 30 pousses chacun. Dans la première méthode, induction et allongement racinaires se font en une seule étape. Dans la deuxième, on adopte la technique du trempage rapide qui consiste en un trempage de deux heures dans une solution d'AIB (50 mg l<sup>-1</sup>) provoquant l'induction racinaire, suivi d'un transfert sur milieu d'allongement racinaire. Le rendement de la méthode est mesuré par le nombre de racines formées par tigelles et par la longueur des racines formées. Les auxines testées comme inducteurs racinaires sont l'ANA et l'AIB. Les résultats obtenus figurent dans le tableau 5 et on voit que c'est la méthode du trempage rapide qui est la meilleure, tout au moins quand les mesures d'enracinement sont faites au bout de 2 semaines (photo 5). Il faut toutefois remarquer que les plantes entières dont l'enracinement s'est fait sous l'effet de l'AIB et par cette technique du trempage rapide sont moins vigoureuses que celles mises à raciner par la méthode où induction et allongement racinaires se font en une seule étape en présence d'ANA. Les deux méthodes utilisées diffèrent par deux paramètres, la façon d'apporter l'auxine et le type d'auxine ; elles ne sont donc pas directement comparables. Néanmoins, les résultats obtenus montrent que la technique du trempage rapide est plus efficace que la première méthode utilisée où induction et allongement racinaires se font en une seule étape.

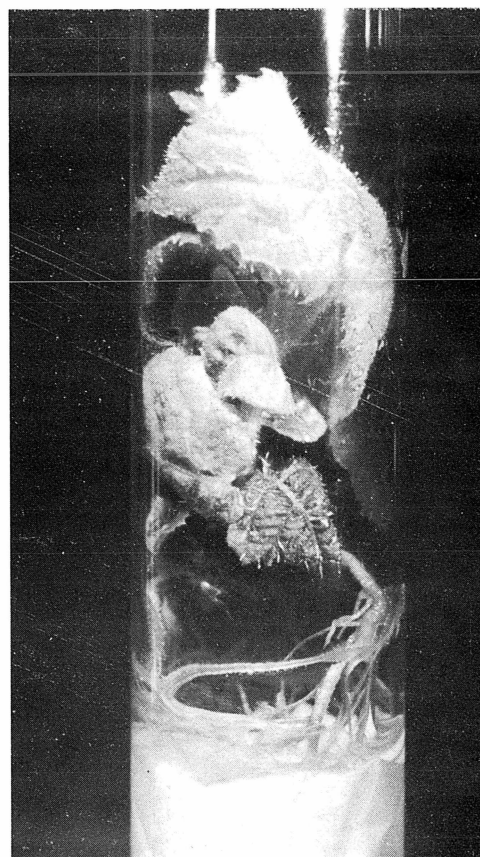


Photo 5 - Enracinement de pousses feuillées soumises à la méthode dite de «trempage rapide» (2 heures) dans AIB (50 mg l<sup>-1</sup>), deux semaines après le trempage.

TABLEAU 5 - Influence de AIB et de ANA sur l'enracinement des pousses feuillées.

Traitement	Nombre de pousses feuillées	Pourcentage de tiges racinées	Nombre de racines par plante	Longueur des racines en mm
MS au 1/2 ANA 0,1 mg l <sup>-1</sup>	30	11,11	2	3,5
MS au 1/2 AIB 50 mg l <sup>-1</sup>	30	61,11	5,72	7,64

#### DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Les résultats obtenus montrent que si l'on choisit comme matériel de micropropagation du kiwi les jeunes feuilles, même prélevées en verger, les problèmes d'asepsie sont bien moindres qu'avec des noeuds, des entre-noeuds ou des pétioles (XIAO, 1990). Ceci provient du fait que ce matériel juvénile est resté moins longtemps au contact des contaminations du milieu extérieur et que sa pilosité est différente (type de poil et densité). Les disques foliaires mis en culture croissent très rapidement, cette observation conforte celle faite par MAGDELEINE (1982), et produisent une abondante callogénèse. Trois types de cals ont été obtenus, les cals néoformés des types 2 et 3 sont devenus

très rapidement caulogènes et ont produit en abondance des pousses feuillées.

Ces résultats sont à rapprocher de ceux de HUANG *et al.* (1980) qui ont observé deux cals de types différents dans la culture d'endosperme d'*A. chinensis* et de ceux de FRASER *et al.* (1986) qui ont obtenu trois cals de types différents dans la culture de tissu de connectif d'anthères d'*A. deliciosa*. C'est la face du disque foliaire au contact du milieu nutritif qui produit le plus grand nombre de pousses feuillées et les cals se forment principalement à l'extrémité des nervures. On a observé également la néoformation directe de pousses feuillées à partir de sections de nervures sans formation préalable de cal, cette observa-



tion est à rapprocher de celle faite par BROSSARD-CHRIQUI *et al.* (1984) au cours de la régénération d'*Actinidia* à partir de filet d'étamine ; ces auteurs avaient noté que les pousses feuillées se formaient directement à partir des cellules entourant les faisceaux vasculaires.

En ce qui concerne le phénomène d'embryogénèse somatique apparue sur les cals de types 2 et 3, nos observations sont à rapprocher de celles de CADE *et al.* (1990) qui, sur des cotylédons de concombre, ont montré que les embryons néoformés ont une origine multicellulaire. Ces embryons se sont parfaitement développés et ont donné naissance à des plantes d'aspect normal ; mais la fréquence de ce phénomène d'embryogénèse est encore faible et il faudra s'attacher à établir des conditions de culture qui orienteront la morphogénèse des cals plutôt vers l'embryogénèse que vers la caulogénèse.

Pour ce qui est de l'effet des régulateurs de croissance sur la callogénèse et la caulogénèse des tissus d'*Actinidia*, les cytokinines et les auxines seront envisagées successivement. On sait que les cytokinines sont indispensables à la caulogénèse, cependant les opinions divergent quant à l'efficacité des différentes cytokinines. Pour ce qui concerne les tissus de tiges, HARADA (1975), GUI (1979), HUANG *et al.* (1980), VELAYANDOM *et al.* (1985) considèrent que la zéatine est la plus efficace. STANDARDI (1981, 1983), WESSELS *et al.* (1984) ainsi que BARBIERI *et al.* (1987) considèrent au contraire que la cytokinine la plus efficace est BAP. Pour LEVA (1986) ce serait IPA qui serait la plus active. Notre étude confirme que la zéatine est la cytokinine la plus efficace pour la caulogénèse des disques foliaires, mais BAP est presque aussi active que la zéatine alors que IPA est beaucoup moins efficace. Ces résultats incitent à penser que l'on pourrait parfaitement, lorsqu'on envisagera la micropropagation à grande échelle à partir de feuilles, remplacer la zéatine par BAP beaucoup moins onéreuse. Nos résultats sont en accord avec ceux de PREDIERI *et al.* (1988).

En ce qui concerne l'effet des auxines, nos résultats établissent que la structure du cal dépend de la nature de l'auxine utilisée : si on utilise du 2,4-D, on obtient un cal très abondant dont les cellules se divisent très activement mais qui ne devient pas organogène même après transfert sur un milieu frais sans auxine. Pour obtenir de nombreux bourgeons, il faut que le cal formé soit de grande taille ; l'AIA est un inducteur très efficace de la caulogénèse sur les disques de tissu foliaire, mais l'utilisation d'ANA nous semble préférable car le nombre final de pousses feuillées comportant des tiges est supérieur lorsqu'on remplace l'AIA par l'ANA.

Notre étude concernant l'optimisation de la production des pousses feuillées a porté sur 43 combinaisons hormonales. Nous avons établi que les associations suivantes sont les plus efficaces :

- Zéa (1 et 2 mg l<sup>-1</sup>) + AIA (0,5 mg l<sup>-1</sup>)
- Zéa (1 et 2 mg l<sup>-1</sup>) + ANA (0,5 mg l<sup>-1</sup>)
- BAP (2 mg l<sup>-1</sup>) + AIA (0,5 mg l<sup>-1</sup>)
- BAP (2 mg l<sup>-1</sup>) + ANA (0,5 mg l<sup>-1</sup>)

PREDIERI *et al.* (1988) avaient montré l'efficacité de l'association BAP-ANA. Mais dans notre cas, si l'effet optimal est bien obtenu pour une concentration identique en ANA (0,5 mg l<sup>-1</sup>), nous avons montré que la concentration optimale de BAP doit être de 2 mg l<sup>-1</sup> ; il faut donc utiliser une concentration de BAP plus forte que celle établie par PREDIERI *et al.* (1988).

Les pousses feuillées régénérées par culture de disques de tissu foliaire diffèrent de la plantule obtenue par germination des graines car ces pousses sont dépourvues de cotylédons et les deux premières feuilles sont de vraies feuilles. Cette observation conforte celle de GUI *et al.* (1982) sur des plantes régénérées à partir de culture d'endosperme et celle de FRASER *et al.* (1986) sur des plantes régénérées à partir de tissu de connectif d'anthères. Il faut noter que le passage des pousses feuillées sur le milieu d'allongement est absolument nécessaire, si on ne le fait pas, apex et tige ne seront pas encore convenablement développés au bout de 2 mois de culture. En ce qui concerne l'allongement des pousses feuillées, les 2 solutions minérales essayées, celle du milieu de MS et celle du milieu B<sub>5</sub>, conviennent. On note toutefois que si le nombre de tigelles par disque est le même avec les deux solutions, la longueur des tigelles est significativement supérieure lorsqu'on utilise la solution MS. Pour ce qui est de l'action des facteurs de croissance, Zéa (1 mg l<sup>-1</sup>) et BAP (1 mg l<sup>-1</sup>) stimulent significativement le nombre de tigelles formées par disque ainsi que leur allongement qui est deux fois plus important que celui du témoin. Par contre GA<sub>3</sub>, tout au moins à la concentration étudiée, s'est montré sans effet, aussi bien utilisé seul qu'en association avec des cytokinines (BAP ou Zéa).

En ce qui concerne l'enracinement des pousses feuillées, c'est la technique du trempage rapide qui a assuré le meilleur rendement : 70 à 80 p. 100 des tigelles mises en expérience ont raciné. On pourra améliorer encore ce rendement en prolongeant le temps de culture des pousses feuillées sur le milieu d'allongement.

En conclusion, les résultats que nous apportons permettent de proposer une méthode de régénération de plants de kiwi par mise en culture *in vitro* de disques de tissu foliaire. Une étude qualitative et surtout quantitative de l'induction des cals organogènes et de la production des pousses feuillées a été menée aboutissant à une méthode permettant d'obtenir une régénération de plantes avec un excellent rendement. Nous avons signalé également la formation d'embryons somatiques aboutissant à des plantes d'apparence tout à fait normale à partir de disques foliaires mis en culture. Des études ultérieures seront nécessaires pour orienter la morphogénèse des disques foliaires soit vers la caulogénèse suivie de la formation de pousses feuillées, soit vers la production d'embryons somatiques.

#### REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient les Ets DELBARD ainsi que Mrs BLANCHET et ELLIS pour la fourniture du matériel végétal mis en expérience.

## BIBLIOGRAPHIE

- BARBIERI (C.) et MORINI (S.). 1987.  
Plant regeneration from *Actinidia callus* cultures.  
*Journal of Horticultural Science*, 62 (1), 107-109.
- BLANCHET (P.). 1985.  
Les dégâts de gels sur le kiwi (*Actinidia chinensis* PLANCHON),  
les risques du verger français.  
*Arboriculture fruitière*, 370, 43-49.
- BROSSARD-CHRIQUI (D.) et 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.
- CADE (R.M.), TODD (C.W.) and BLAZICH (F.A.). 1990.  
Somatic embryos derived from cotyledons of cucumber.  
*J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 115 (4), 691-696.
- CANHOTO (J.M.) and CRUZ (G.). 1987.  
*In vitro* multiplication of *Actinidia* by culture of young leaves.  
*Bol. Soc. Broteriana Coimbra*, 60, 235-251.
- EVANS (D.A.) and SHARP (W.R.). 1986.  
Somaclonal and gametoclonal variation.  
in *Handbook of plant cell culture*.  
*Mac Millan Publishing, New-York*, 4, 97-133.
- FRASER (L.G.) and HARVEY (C.F.). 1986.  
Somatic embryogenesis from anther derived callus in two *Actinidia*  
species.  
*Sci. Hortic.*, 29 (4), 335-346.
- GAMBORG (O.L.), MILLER (R.A.) and OJIMA (K.). 1968.  
Plant cell culture : 1. Nutrient requirements of suspension cultures  
of soybean root cells.  
*Exp. Cell. Res.*, 50, 151-158.
- 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.) and XU (T.Y.). 1982.  
Studies on morphological differentiation of endosperm plantlets of  
chinese gooseberry *in vitro*.  
*Acta Bot. Sin.*, 24, 216-221.
- HARADA (H.). 1975.  
*In vitro* organ culture of *Actinidia chinensis* Planchon, as a technique  
for vegetative multiplication.  
*J. Hortic. Sci.*, 50, 81-83.
- HIRSCH (A.M.). 1970.  
Identification et dosage des acides aminés libres de fragments de  
tiges d'*Actinidia chinensis* PLANCHON.  
Mise en culture de ces fragments.  
*C.R. Acad. Sci. Paris, Sér. D*, 270, 1462-1464.
- HONG (S.R.). 1981.  
Induction of callus and regeneration of plantlets in cultures of stem  
explant and leaves.  
*Agric. Sci. Hubei*, 9, 28-30.
- HUANG (Z.G.) and HUANG-PU (Y.L.). 1980.  
Culture of stem explant of chinese gooseberry *in vitro*.  
in *Research reports for Actinidia*.  
*Ed. Zhengzhou Inst. Pomol. CAAS*, 225-232.
- HUANG (Z.G.) and TAN (C.Y.). 1988.  
Chinese gooseberry, kiwifruit (*Actinidia* spp).  
in *Biotechnology in agriculture and forestry*.  
*Academic Press*, 6 crops II, 166-180.
- HUANG (Z.G.), WANG (Q.M.), HUANG-PU (Y.L.) and XU (L.Y.).  
1984.  
Raising the survival rate of transplanted chinese gooseberry plantlets  
propagated by tissue culture.  
*Fruit Sci.*, 1, 29-33.
- KUANG (A.X.) and LI (R.Q.). 1983.  
Cytological studies of plant regeneration from young leaves in  
*Actinidia melanandra*.  
*J. Wuhan Univ. (Natural Ed.)*, 3, 109-113.
- LEVA (A.R.). 1986.  
Tests on organogenesis from callus of *Actinidia chinensis*.  
*Acta Hortic.*, 2 (179), 883-884.
- MAGDELEINE (C.). 1982.  
Etude de la multiplication végétative des plantes mâles et femelles  
d'*Actinidia chinensis*, à partir d'explants foliaires cultivés *in vitro*.  
*DEA de Biologie et Physiologie végétales, Université Pierre et Marie  
Curie, Paris*.
- MURASHIGE (T.) and SKOOG (F.). 1962.  
A revised medium for rapid growth and biomass assays with tobacco  
tissue cultures.  
*Physiol. Plant.*, 15, 473-497.
- PREDIERI (S.), MEZZETI (B.) et RANIERI (R.). 1988.  
Rigenerazione *in vitro* de foglie di *Actinidia deliciosa* cultivar  
Hayward.  
*Rivista di Frutticoltura*, 11, 69-72.
- SAMMARCELLI (F.). 1988.  
Callogénese et régénération par culture *in vitro* chez *Actinidia  
deliciosa* (cultivar Hayward).  
*DEA de Sciences agronomiques « Physiologie et Productions  
végétales », Université des Sciences et Techniques du Languedoc,  
Montpellier*.
- STANDARDI (A.). 1981.  
Micropropagazione dell' *Actinidia chinensis* PLANCHON, mediante  
cultura *in vitro* di apical meristematici.  
*Frutticoltura*, 43, 23-27.
- STANDARDI (A.). 1983.  
La micropropagazione nella moltiplicazione dell' *Actinidia*.  
*Frutticoltura*, 45, 17-22.
- XIAO (X.G.). 1990.  
Micropropagation du kiwi (*Actinidia* spp) à partir de disques  
foliaires cultivés *in vitro*.  
*DEA de Biologie végétale tropicale, Université Pierre et Marie Curie,  
Paris*.
- VELAYANDOM (L.), HIRSCH (Anne-Marie) et FORTUNE (D.). 1985.  
Propagation du kiwi, *Actinidia chinensis* (L.) PLANCHON, par  
microbouturage *in vitro* de noeuds.  
*C.R. Acad. Sci. Paris, Sér. III*, 301 (12), 597-600.
- WESSELS (E.), NEL (D.D.) and STADEN (D.F.A.) von. 1984.  
*In vitro* propagation of *Actinidia chinensis* cultivar Hayward.  
*Deciduous Fruit Grower*, 34 (12), 453-457.

REGENERACION DEL KIWI (*ACTINIDIA DELICIOSA* CULTIVAR  
HAYWARD) A PARTIR DE HOJAS JOVENES.

X.G. XIAO, Anne-Marie HIRSCH y Dominique FORTUNE.

*Fruits*, Jan.-Feb. 1991, vol. 46, n° 1, p. 57-66.

RESUMEN - Varias modalidades diferentes de callogénesis y de organogénesis han sido puestas en evidencia por el cultivo *in vitro* de discos de tejido foliar. Tres tipos de callos han sido caracterizados: callos hyperhídricos de gran talla desprovistos de capacidad organogénica, callos más pequeños y menos hyperhídricos y callos densos muy pequeños en tamaño. Estos dos últimos tipos de callos muy caulógenos formaron en abundancia brotes foliares. Los mismos formaron

igualmente, pero con un débil rendimiento, embriones somáticos que se desarrollaron muy bien, dando origen a plantas de aspecto perfectamente normal. Cuarenta y tres combinaciones hormonales fueron estudiadas con el objetivo de optimizar la producción de los brotes foliares. Las tres condiciones más eficaces para la inducción de la callogénesis son : la zeatina asociada al ácido 3-indol-acético, la 6-benzilamino-purina al ácido 3-indol-acético y la 6-benzilamino-purina asociada al ácido 1-naftaleno-acético. Después de pasarlo en medio de alargamiento, los brotes foliares son enraizados fácilmente y con muy buen rendimiento (hasta 80 p. 100) gracias a un método de inmersión rápida (2 h) en una solución concentrada de auxina (ácido 3-indol-butírico a 50 mg l).

