

Résumé

Trois essais, plantés en Côte d'Ivoire, analysent la croissance de microboutures de 6 ans issues de semenceaux, d'embryons somatiques de 45 mois de PB 260 et PR 107 et de microboutures de 31 mois de IRCA 18. Les résultats montrent que les vitroplants d'hévéa, produits par embryogenèse somatique ou par microbouturage, ont toujours une croissance égale ou supérieure à celle des greffés classiques. Les différences sont analysées en fonction de la juvénilité des plants-mères, des caractéristiques clonales et du niveau de développement des plants au moment du planting. Ces premiers résultats sont favorables aux vitroplants, d'autant que l'analyse montre qu'il est indispensable d'optimiser la vigueur des plants issus de la culture *in vitro* ainsi que leur croissance en pépinière avant de mesurer le gain de croissance et de production réellement apporté par ce nouveau matériel végétal.

Abstract

Three trials have been set up in Côte d'Ivoire to analyse the growth of six-year-old microcuttings produced from seedlings, 45-month-old somatic embryos of PB 260 and PR 107 and 31-month-old microcuttings of IRCA 18. The results show that Hevea *in vitro* plantlets produced by somatic embryogenesis or microcutting consistently grow as well as if not better than conventional budded plants. The differences were analysed according to mother plant juvenility; clonal characteristics and the stage of plant development at the time of planting. These first results are positive for *in vitro* plantlets, particularly since the analysis showed that before the true growth and production gain offered by this new planting material can be measured, it is essential to optimize the vigor of plants produced by *in vitro* culture, along with their growth in the nursery.

Resumen

Tres ensayos, sembrados en Côte d'Ivoire, analizan el crecimiento de micro esquejes de 6 años de edad oriundos de semillas de siembra, de embriones somáticos de 45 meses de PB 260 y PR 107 y de micro esquejes de 31 meses de IRCA 18. Los resultados muestran que las plántulas clonales de hevea, producidas por embriogénesis somática o por micro esqueje, tienen un crecimiento igual o superior al de los injertados clásicos. Las diferencias se analizan en relación con el carácter juvenil de las plantas-madres, de las características clonales y del nivel de desarrollo de las plantas en el momento del trasplante. Estos primeros resultados son favorables a las plántulas clonales, tanto lo más que el análisis muestra que resulta indispensable optimizar el vigor de las plantas oriundas del cultivo *in vitro* así como su crecimiento en vivero antes de medir la ganancia de crecimiento y de producción realmente proporcionada por este nuevo material vegetal.

Croissance en champ de clones d'*Hevea brasiliensis* issus de culture *in vitro*

Carron M.P.¹, Dea B.G.², Tison J.³, Leconte A.³, Kéli J.²

¹ CIRAD-CP, BP 5035, 34032 Montpellier Cedex 1, France

² IDEFOR-DPL, 01 BP 1536, Abidjan 01, Côte d'Ivoire

³ CIRAD-CP, 01 BP 1536, Abidjan 01, Côte d'Ivoire

Depuis le début des années 80, grâce aux progrès réalisés en micropropagation (par bourgeonnement axillaire ou bourgeonnement adventif), d'abord chez différentes espèces fruitières (Edin *et al.*, 1987), puis chez des angiospermes et des gymnospermes d'intérêt forestier (Gupta *et al.*, 1993 ; Cornu, 1994), de nombreux essais ont été mis en place en champ avec des vitroplants de ligneux. En général, les résultats publiés ne portent que sur les premières années de croissance. Souvent, une forte croissance initiale est constatée, mais ce n'est pas systématique. Ces données ne permettent donc pas de conclure de façon univoque sur les avantages de la propagation *in vitro*. Leur analyse fait toutefois ressortir les fortes incidences de l'origine de l'explant, de la technique de propagation *in vitro*, de l'état de développement des plants au moment de la mise en champ et des caractéristiques du motif « témoin ».

Chez l'hévéa, à partir de 1979, le Cirad⁽¹⁾ a engagé 2 voies de recherches : le microbouturage et l'embryogenèse somatique. Parallèlement à la mise au point de ces techniques, dès 1989, des essais comparatifs en champ ont été mis en place, au fur et à mesure de la production de vitroplants issus de francs de pied, puis de clones sélectionnés.

Les premières plantations d'hévéas furent réalisées, en Asie du Sud-Est entre

1890 et 1930, à partir de semis de provenances le plus souvent non contrôlées. L'hétérogénéité de ce matériel végétal, ainsi que la difficulté à se procurer en grande quantité des graines d'origine déterminée ont fait rechercher une méthode de multiplication végétative des arbres élites. L'impossibilité de bouturer des arbres sélectionnés, donc matures, a conduit à généraliser le greffage sur franc de pied. Cette multiplication « semi-végétative » présente un certain nombre d'inconvénients qui ont justifié la poursuite ininterrompue des recherches pour la mise au point d'une méthode de multiplication « végétative complète », d'abord par bouturage puis, à partir des années 70, par culture *in vitro*. Les meilleurs arbres issus de semis (*seedlings*) expriment une croissance et une production bien supérieures à celles des clones de greffe (Dijkman, 1951). Une part de cette différence de comportement est attribuée à l'hétérogénéité génétique des porte-greffes et à la maturité du matériel clonal issu de bourgeons de branches d'arbres adultes et entretenus pendant des dizaines d'années en « jardin à bois » (Carron *et al.*, 1989). La multiplication végétative par culture *in vitro* devrait corriger ces handicaps.

Nous avons étudié la croissance des arbres de 3 parcelles expérimentales de 30 mois à 6 ans. Les données concernent différents génotypes, sélectionnés ou non, multipliés par culture *in vitro* (microbouturage ou embryogenèse somatique) et par greffage classique. Les croissances sont

(1) Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement.

analysées en fonction du mode de multiplication et des caractéristiques des plants lors de la mise en champ.

Matériel et méthodes

Les vitroplants (microboutures et embryons somatiques) ont été produits dans le laboratoire Biotrop⁽²⁾ du Cirad pour les essais 1 et 2 et par celui de la SMH⁽³⁾ pour l'essai 3. Ils ont été expédiés en tube à la station de recherche IDEFOR-DPL⁽⁴⁾ (Côte d'Ivoire), où les phases d'acclimatation, de pépinière (préparation des motifs greffés témoins) et la mise en place des champs d'essai ont été réalisées. Pour l'essai 2, les plants ont été acclimatés dans les serres du Cirad à Montpellier, puis acheminés en Côte d'Ivoire, un mois avant la plantation. Dans les 3 essais, le motif vitroplant est comparé au motif greffé utilisé comme témoin.

Essai 1

Dix-huit clones issus de graines « illégitimes » du clone GT1 (origine paternelle inconnue) ont été mis en champ en juin 1989, selon un dispositif en bloc de Fisher à 2 traitements (greffage et microbouturage) et 18 répétitions (génotypes). La parcelle élémentaire est de 24 arbres/génotype/mode de multiplication. Ces *seedlings*, non sélectionnés, ont été multipliés soit par microbouturage soit par greffage sur porte-greffes âgés de 10 mois. Ces derniers étaient issus de graines GT1 illégitimes également non sélectionnées. Le prélèvement des explants primaires pour multiplier les 18 génotypes a été fait 5 mois après la germination. La production de plants par microbouturage a suivi la technique Enjalric et Carron 1982 (encadré 1).

Le taux de réussite à l'acclimatation a été d'environ 80 %. Le passage en champ a été réalisé 3,5 mois après la sortie de la culture *in vitro*.

Essai 2

Essai planté, en juin 1992, avec les clones PR 107 et PB 260 multipliés, soit par greffage classique sur porte-greffes de 10 mois, soit par embryogenèse somatique à partir de cals primaires selon la technique décrite par Carron *et al.*, 1995a (encadré 2).

Les plants ont été plantés environ 4 mois (PR 107) et 6 mois (PB 260) après la sortie de la culture *in vitro*. Pour le PR 107, le dis-

■ Encadré 1. Technique Enjalric et Carron 1982.

Le débourrement des bourgeons axillaires sur les explants primaires a été obtenu par trempage pendant 2 heures dans une solution de benzylaminopurine (BAP 44 μM) et d'acide indolbutyrique (AIB 25 μM). Les explants ont ensuite été mis en culture sur un milieu sans régulateur de croissance mais contenant du charbon actif (0,5 g/l) et une forte teneur en saccharose (80 g/l). Les rameaux formés à l'issue de la culture primaire ont été récupérés et enracinés par un trempage pendant 3 jours dans une solution d'acide indolbutyrique (AIB) et d'acide naphthalène acétique (ANA) (25 μM chacun) suivi d'une culture sur milieu sans régulateur de croissance.

■ Encadré 2. Technique Carron *et al.*, 1995a.

Des fragments de tégument interne de graine immature (tissu maternel) ont été déposés sur un milieu gélinifié contenant de l'acide 3,4-dichlorophénoxyacétique (3,4 D) et de la kinétine (KIN), (4,44 μM chacun), à l'obscurité. Après un mois de culture, les explants sur lesquels s'est formé un cal primaire ont été repiqués sur un milieu identique mais moins concentré en régulateur de croissance (1,35 μM 3,4 D et BAP), « complété » en spermidine (50 μM) et en acide abscissique (ABA, 5 x 10⁻³ μM). Des embryons se sont formés sur ce cal entre la fin du 2^e et du 3^e mois de culture. Les embryons les plus développés ont alors été isolés et mis à germer après avoir préalablement subi une phase de maturation sur milieu enrichi en saccharose (351 μM) et ABA (1 μM). Les plants ont été acclimatés après que les premières feuilles se soient développées *in vitro*.

positif en bloc de Fisher a été utilisé ; il comprend 2 traitements (greffage et embryogenèse somatique) et 6 répétitions ; la parcelle élémentaire était de 11 arbres. Pour le PB 260, la plantation a été faite en randomisation totale avec 18 plants par traitement.

Essai 3

Le clone IRCA 18 multiplié, soit par greffage classique sur porte-greffes de 10 mois, soit par microbouturage selon la technique (encadré 3) décrite par Lardet *et al.* (1994), a été planté en juin 1993.

L'essai a été réalisé selon le dispositif de Fisher à 2 traitements (greffés/microboutures) et 3 répétitions. La parcelle élémentaire comportait 30 arbres. Dans cet essai, la reprise de croissance en phase d'acclima-

tation a été très lente et les pertes très importantes (plus de 90 %). Les plants survivants ont été mis en champ après 12 mois d'acclimatation/pépinière.

Pour l'acclimatation, les vitroplants ont été sevrés en minimottes puis repiqués en sacs de polyéthylène noir de 9l, remplis de terre de plantation, avant la mise en pépinière (Carron *et al.*, 1995b). Lors du plantage, les sacs ont été déchirés en ayant soin de préserver la motte de terre qui contient les racines du vitroplant.

Pour les greffés, des graines « tout-venant » ont été mises en germe. Les jeunes plants ont été prélevés 2-3 semaines après germination et repiqués, comme les vitroplants, dans des sacs de 9l pour la phase de pépinière. A 8 mois, ces plants ont été greffés selon la technique classique en hévéaculture de greffage en écusson sur tige aoûtée (Delabarre et Serier, 1995). A 10 mois, la tige de ces plants a été recépée, 5 à 10 cm au-dessus de la greffe et le plant a été planté en motte avec enlèvement du sac, comme précédemment. La greffe a débouffé généralement dans les 2 mois qui suivent.

Pour tous les essais, la densité de plantation était conforme aux normes industrielles, soit 510 arbres/ha (7 x 2,80 m), ainsi que la gestion et la fertilisation.

Paramètres de croissance

La circonférence du tronc à 1 m du sol (C1m) a été mesurée tous les 3 mois. Les moyennes obtenues sur les croissances ont été comparées d'après le test statistique de Student.

■ Encadré 3. Technique Lardet *et al.*, 1994.

Elle implique qu'à l'issue de la culture primaire ayant permis le développement d'un rameau *in vitro* par explant (encadré 1), une phase de multiplication soit initiée. Celle-ci peut durer de plusieurs mois à plusieurs années (environ 2 ans pour les vitroplants d'IRCA 18 utilisés ici) et conduire à une production régulière de plantules. Cette phase a été réalisée par 2 voies menées en parallèle. D'une part le repiquage mensuel, pendant 5 à 6 mois, de l'explant de base dont les rameaux ont été sectionnés, sur un milieu contenant 4,44 μM BAP et 1,25 μM AIB. A chaque nouvelle culture l'explant formait, par bourgeonnement axillaire, 1 à 3 nouvelles tiges feuillées. D'autre part, on a mis à profit la création de nouveaux explants de base à partir des rameaux formés *in vitro* ; un renouvellement permanent du matériel végétal était ainsi assuré.

(2) Biotechnologies appliquées à l'amélioration des plantes tropicales.

(3) Société de microbouturage de l'hévéa.

(4) Institut des forêts-Département des plantes à latex.

Résultats

L'analyse des résultats a été faite en prenant comme point de départ la mise en champ (*planting*), origine temps habituellement utilisée en hévéaculture. Néanmoins, nous avons également comparé les croissances des motifs en fonction des dates de sevrage pour les vitroplants et de semis pour les porte-greffes, afin de mettre en évidence l'incidence sur leur vigueur ultérieure en champ du niveau de croissance des plants au moment du *planting*.

Evolution de la croissance avant mise en saignée

L'essai 1 montre, 6 ans après la plantation, que la croissance des 2 motifs, microboutures (M) et greffés (G), est quasiment identique chez les clones issus de semences (figure 1, photo 1).

Bien que ces 18 génotypes soient issus de graines tout-venant, ils manifestent, en moyenne, une croissance supérieure à celle des clones de greffe GT1, RRIM 600, et proche de celle des clones à croissance rapide tels que IRCA 18 et PB 260 (Ciradcp, 1993). Cette forte vigueur, observée aussi bien chez les vitroplants que chez les greffés, est habituellement le fruit d'une sélection extrêmement poussée conduisant à éliminer au moins 95 % des hybrides issus de croisements contrôlés ! Ici, ce résultat « sans sélection » pourrait être dû à un « effet famille » non contrôlé (utilisation fortuite d'un lot de graine exceptionnellement bon) ou, plus probablement, à la jeunesse du matériel végétal utilisé dans cette expérience.

L'évolution des accroissements annuels met en évidence une différence sensible entre les 2 motifs (figure 2). On remarque une stagnation de la vitesse de croissance au cours de la 3^e année qui provoque une irrégularité dans la courbe en cloche attendue : cette particularité peut être reliée à la sécheresse relative de 1992 (1 650 mm contre 1 830 mm en moyenne). On peut distinguer, par ailleurs, 2 périodes successives :

- les 2 premières années correspondent au temps nécessaire aux microboutures pour rattraper leur handicap initial de croissance. En effet, la hauteur moyenne des microboutures au *planting* était de 13 cm (4 mois d'acclimatation), ce qui correspond à celle d'un *seedling* moins d'un mois après la germination. Dans le même temps, les greffés ont bénéficié des réserves disponibles dans le porte-greffe de 10 mois, lequel mesure environ 1,40 m de hauteur avant recépage. On observe ainsi que, pour chaque génotype,



M.P. Carron

Photo 1. Arbres de l'essai 1 âgés de 6,5 ans après *planting*. Au premier plan un arbre greffé du génotype n° 6, suivi sur la ligne de 6 arbres du même génotype produits par microbouturage. / *Trees in trial 1 six and a half years after planting. In the foreground, a budded plant of genotype no. 6, followed along the row by six trees of the same genotype produced by microcutting.*

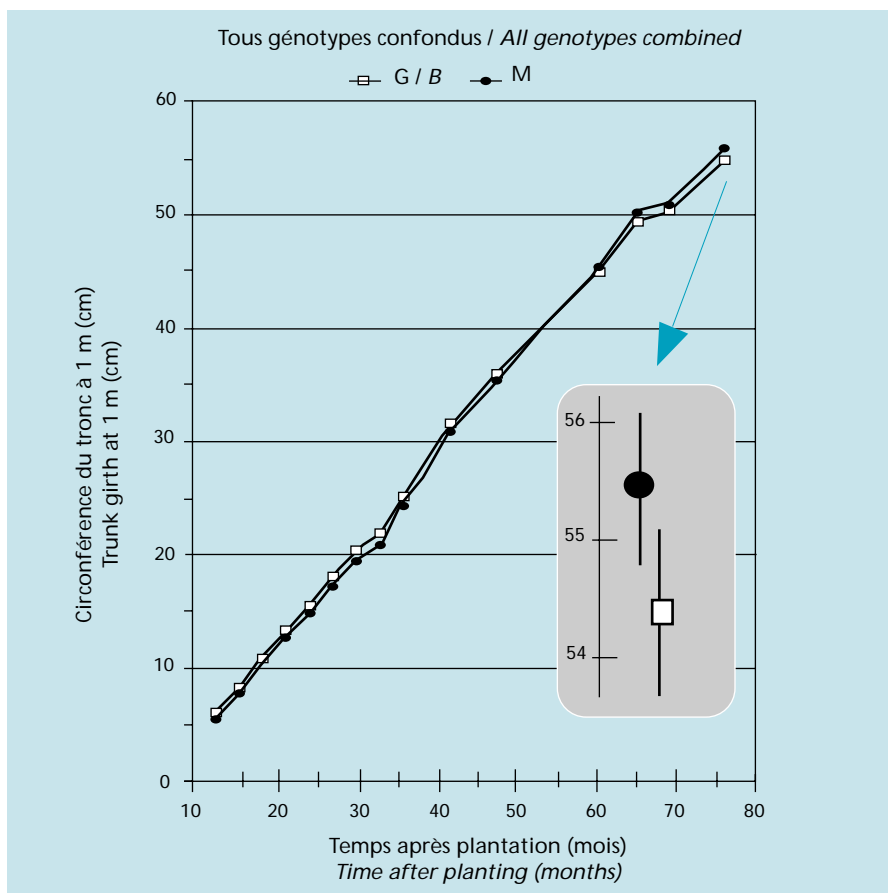


Figure 1. Comparaison de la croissance en champ des arbres obtenus par microbouturage *in vitro* (M) ou par greffage (G) sur porte-greffe issu de graine, chez 18 génotypes issus de graines, non sélectionnés (essai 1). La fenêtre donne un grossissement de la position relative des 2 traitements avec les intervalles de confiance. / *Comparison of the field growth of trees obtained by in vitro microcutting (M) or budding (B) onto seedlings, for 18 non-selected genotypes produced from seed (trial 1). The close-up shows the relative position of the two treatments, with the confidence intervals.*

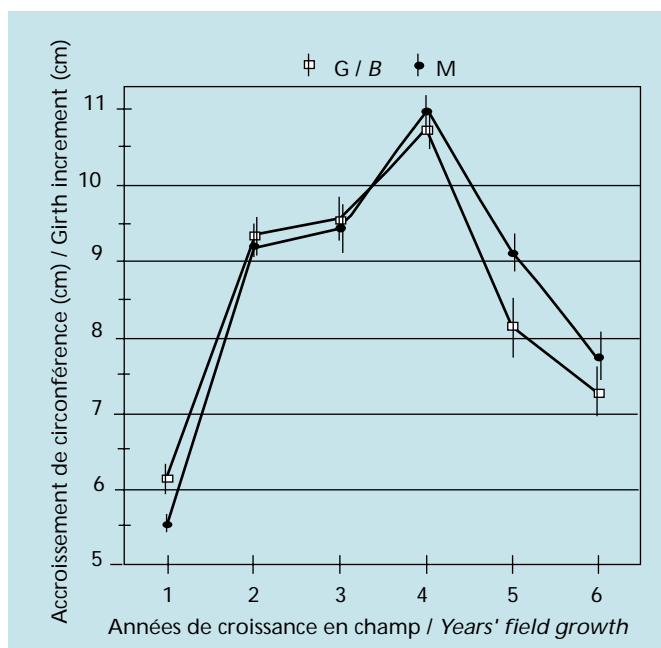


Figure 2. Evolution des accroissements annuels de circonférence du tronc à 1 m au cours des 6 premières années chez les plants produits par microbouturage *in vitro* (M) ou par greffage classique (G), chez 18 génotypes issus de graines, non sélectionnés (essai 1). Annual trunk girth increment at 1 m for the first six years on plants produced by *in vitro* microcutting (M) or conventional budding (B), for 18 non-selected genotypes obtained from seed (trial 1).

les 5 microboutures les plus développées au moment du *planting* (hauteur moyenne 19,9 cm) présentent à 5 ans une circonférence à 1 m de $50,6 \pm 2,0$ cm, qui est supérieure (+ 34 %) à celle des 5 plants les moins développés (hauteur moyenne au *planting* = 7,7 cm ; C1m = $37,7 \pm 1,8$ cm). Cette circonférence moyenne est également très significativement supérieure (+ 13 %) à celle des greffés-juvéniles (C1m = $44,8 \pm 1,7$ cm). Ce résultat conduit à formuler l'hypothèse d'une corrélation inverse entre le niveau de croissance au *planting* et la durée de la phase immature, avant mise en saignée. Etant donnée la dispersion limitée des hauteurs des plants au *planting* dans cette expérience, cette hypothèse a été vérifiée sur l'essai 3 avec les microboutures du clone IRCA 18 (figure 3, photo 2) qui met en évidence une corrélation curvilinéaire extrêmement forte ($r = 0,97$) entre la hauteur au *planting* et la circonférence à 1 m mesurée à 30 mois. Ce motif présente une circonférence moyenne du tronc à 1 m de 24,1 cm, non significativement supérieure à celle du motif IRCA 18 greffé (22,8 cm) ;

- à partir de la 3^e année les microboutures issues de *seedlings* (essai 1) manifestent un accroissement annuel (figure 2) supérieur à celui des greffés-juvéniles, ce qui se traduit, pour la croissance générale, (figure 1) par l'intersection des 2 courbes et par une croissance supérieure des microboutures qui semble se poursuivre au-delà de la mise en saignée. Le gain de croissance à peine perceptible à cette date chez les microboutures s'est tout de même traduit par un nombre d'arbres mis en saignée à 5 ans et 9 mois plus grand (54 % contre 46 % chez les greffés-juvéniles). L'accroissement annuel supérieur chez les microboutures au cours des dernières années d'observation (figure 2) permet d'envisager que la différence entre les 2 courbes devienne significative.

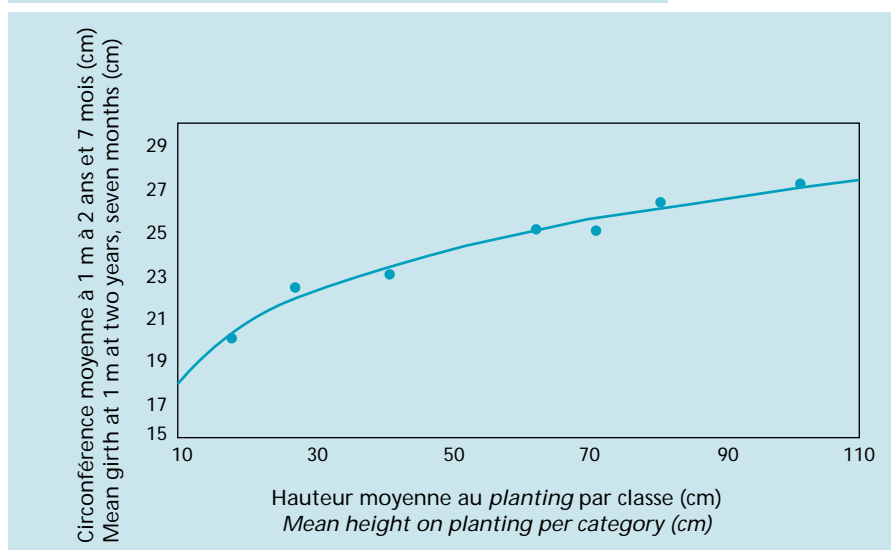


Figure 3. Corrélation entre la hauteur des vitroplants au *planting* et la circonférence des troncs à 31 mois chez le clone IRCA 18 (essai 3). / Correlation between *in vitro* plantlet height on *planting* and trunk girth at 31 months for clone IRCA 18 (trial 3).



M.P. Carron

Photo 2. IRCA 18 sur ses propres racines, multiplié par microbouturage, âgé de 2,5 ans après le *planting*. / IRCA 18 on its own roots, propagated by microcutting, two and a half years after *planting*.

sances moyennes notées pour ces clones en basse Côte d'Ivoire, (Cirad-cp, 1993). Par ailleurs, depuis la première année, les vitroplants du clone PB 260 (photo 3) possèdent un avantage net sur les greffés et l'écart entre les 2 courbes va en augmentant, ce qui traduit un accroissement annuel toujours supérieur chez les vitroplants. A 3,5 ans, cet avantage représente 17 % de « surface d'écorce saignable » supplémen-



M.P. Carron

Photo 3. PB 260 greffé à l'extrême droite et PB 260 sur ses propres racines par embryogenèse somatique, au centre, 3,5 ans après le *planting*. / Budded PB 260 on the far right and PB 260 on its own roots, produced by somatic embryogenesis, in the centre, three and a half years after planting.



M.P. Carron

Photo 4. PR 107 sur ses propres racines par embryogenèse somatique (ligne au premier plan) et PR 107 greffé (ligne au second plan), 3,5 ans après le *planting*. / PR 107 on its own roots, produced by somatic embryogenesis (row in the foreground) and budded PR 107 (row in the background), three and a half years after planting.

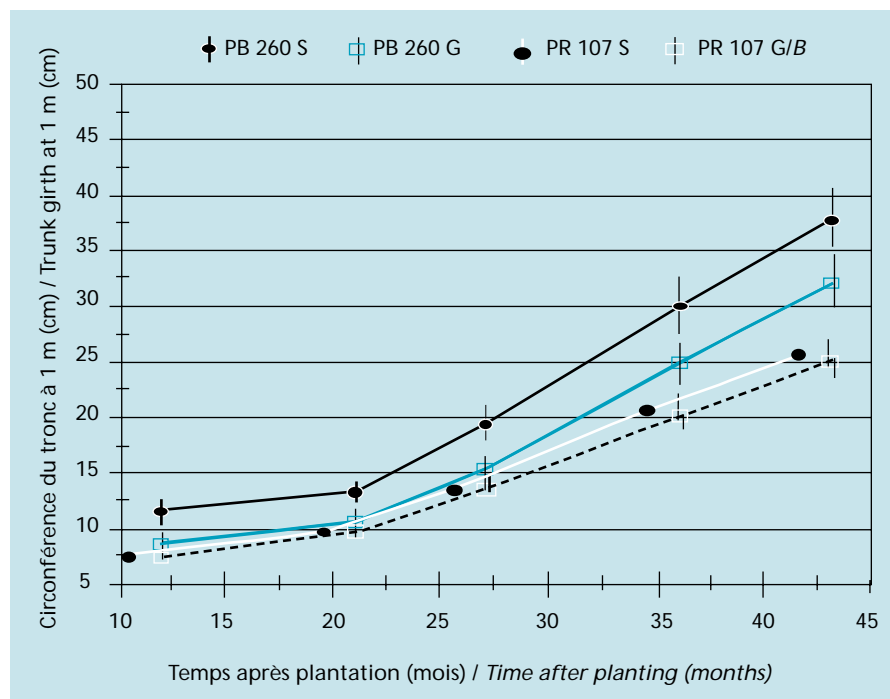


Figure 4. Comparaison de la croissance en champ des arbres des clones PB 260 et PR 107 produits par embryogenèse somatique (S) ou par greffage (G). / Comparison of the field growth of trees of clones PB 260 and PR 107 produced by somatic embryogenesis (S) or budding (B).

taire. Pour le clone PR 107 (photo 4) les courbes de croissance sont quasiment superposées. En regard des résultats obtenus sur les essais 1 et 3, on peut relier ce résultat, chez le PR 107, à la faible taille initiale des vitroplants (13 cm de hauteur moyenne au *planting*). Mais il faut probablement aussi prendre en compte le fait que le clone PR 107 est connu pour avoir un phénotype à croissance lente (mise en saignée vers 6,5-7 ans, dans les conditions de basse Côte d'Ivoire) alors que le PB 260 a un phénotype à croissance rapide (mise en saignée à 5 ans).

Dans ces 3 essais, les arbres issus de culture *in vitro* ne présentent aucune anomalie de croissance et possèdent les mêmes caractéristiques morphologiques (couronne, feuillage...) que le clone de greffe auquel ils sont comparés.

Discussion et conclusion

En raison des difficultés rencontrées pour la multiplication de l'hévéa sur ses propres racines (par bouturage, marcottage ou culture *in vitro*), les données bibliographiques sur ce sujet concernent principalement des mises au point techniques. Les données existantes, sur le comportement en champ de ce type de matériel, sont ponctuelles ; le plus souvent qualitatives, consignées dans des rapports internes des instituts de recherche, donc difficiles d'accès. L'intérêt agrono-

mique de clones d'hévéas sur leurs propres racines ne relève donc, jusqu'à aujourd'hui, que d'hypothèses de travail basées sur une accumulation d'observations faites sur des *seedlings* et sur des greffés. Cette étude fournit donc, pour la première fois, des données quantitatives issues de champ d'expérimentation à dispositif statistique.

L'observation directe des résultats de ces 3 essais montre que les vitroplants d'hévéa, produits par microbouturage ou par embryogenèse somatique, ont toujours une croissance égale ou supérieure à celle des greffés classiques (figures 1 et 4). Ces résultats rappellent ceux obtenus chez le pommier : ses vitroplants manifestent une vigueur supérieure à celle des plants greffés, exprimée par un plus grand accroissement annuel, qui lui permet de rattraper le motif greffé entre la 2^e et la 3^e année puis de le dépasser (Webster *et al.*, 1985 ; Embree et Hicks, 1985 ; Jones et Hadlow, 1989 ; Larsen et Higgins, 1990). Ce n'est pas le cas chez l'eucalyptus et le teck, où l'on observe une très forte supériorité de croissance initiale qui disparaît progressivement 2-3 ans après le *planting* (Mascarenhas *et al.*, 1988). Enfin, des résultats opposés ont été observés avec une croissance équivalente, voire inférieure, des vitroplants chez le pêcher, le cerisier, des *Prunus*, *Pinus radiata*, *Pinus taeda* (Frampton et Isik, 1987 ; Navatel et Bourrain, 1989 ; Bonga et Von Aderkas, 1992). Les cas de faible

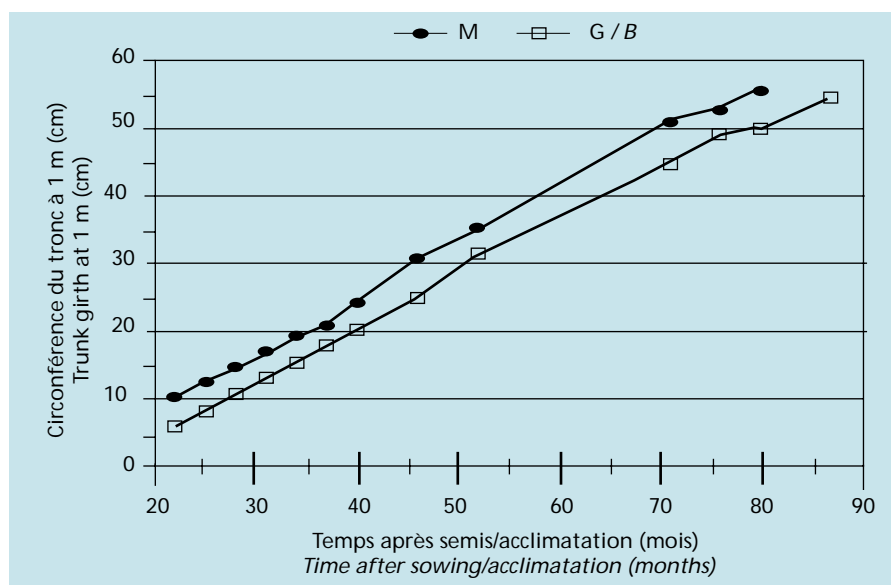


Figure 5. Comparaison de la croissance des arbres (essai 1) en prenant comme point de référence le semis du porte-greffe pour les greffés (G) et l'acclimatation des vitroplants pour les microboutures (M). L'intervalle de confiance étant de l'ordre de $\pm 0,3$ cm (figure 1), la différence entre les 2 courbes est très significative en faveur des microboutures. / Comparison of tree growth (trial 1), taking as a reference the stock sowing date for budded plants (B) and the in vitro plantlet acclimatization date for microcuttings (M). With a confidence interval of around ± 0.3 cm (figure 1), the difference between the two curves is highly significant in favour of microcuttings.

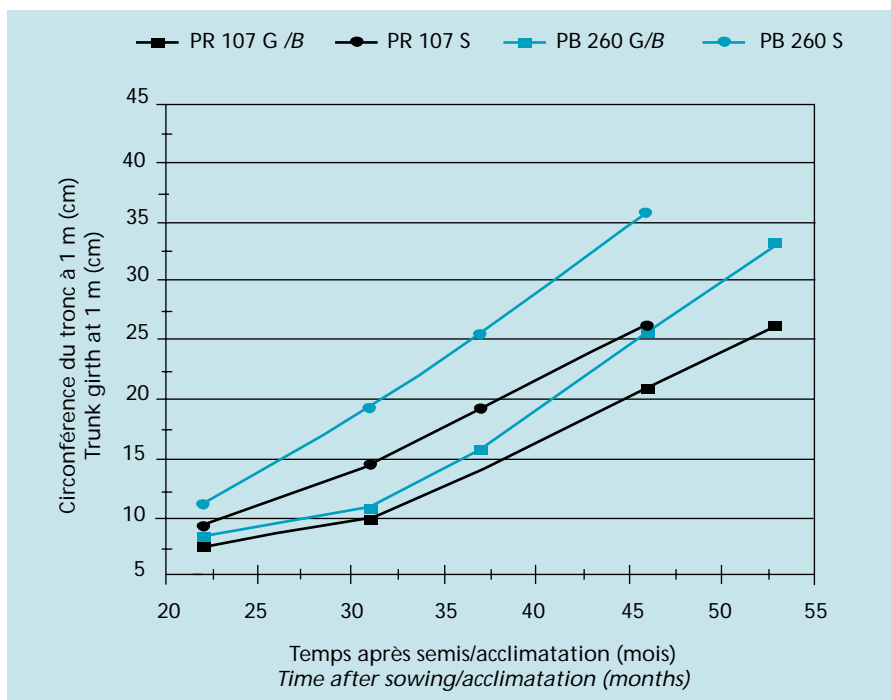


Figure 6. Comparaison de la croissance des arbres de (essai 2) en prenant comme point de référence le semis du porte-greffe pour les greffés (G) et l'acclimatation pour les vitroplants issus d'embryogenèse somatique (S). Dans ces conditions, la différence entre les 2 courbes est très significative et en faveur des vitroplants, tant pour le clone PB 260 (+ 39 %) que pour le clone PR 107 (+ 23 %). / Comparison of tree growth (trial 2), taking as a reference the stock sowing date for budded plants (B) and the acclimatization date for in vitro plantlets produced by somatic embryogenesis (S). Under these conditions, the difference between the two curves is highly significant in favour of in vitro plantlets for both clone PB 260 (+ 39%) and clone PR 107 (+ 23%).

vigueur chez les vitroplants sont souvent associés à des observations faisant état d'une maturation précoce comme la fructification (Martin *et al.*, 1983), la plagiotropie (Shelbourne *et al.*, 1989) ou encore la for-

mation de nodosités bactériennes sur les racines d'*Alnus glutinosa*. Chez le pommier (Edin *et al.*, 1987 ; Zimmerman et Steffens, 1989) comme chez l'hévéa (Carron *et al.*, comm. pers.), la forte vigueur est associée à

un gain de juvénilité des vitroplants. Par delà les spécificités génétiques, ces différences de comportement selon les espèces peuvent trouver leur source dans les conditions de multiplication *in vitro*. La néoformation de bourgeons semble la source d'un taux important de variations somaclonales et de problèmes de plagiotropie, notamment chez les conifères pour lesquels elle a fréquemment été obtenue à partir des cotylédons. Par opposition, le bourgeonnement axillaire est beaucoup plus fiable. De grandes inégalités existent également dans les caractéristiques du « témoin » utilisé qui peut être très divers : des *seedlings* pour le *Pinus taeda* (Frampton et Isik, 1987), des boutures pour l'eucalyptus (Mascarenhas *et al.*, 1988), des greffés sur boutures chez le pêcher (Liverani *et al.*, 1991) ou, chez le pommier, des greffés sur porte-greffe nanisant tel le M27 ou revigérant tel le M25 (Jones et Hadlow, 1989).

L'essai 1 présente la particularité de comparer 2 motifs dont le matériel est d'origine juvénile. En conséquence, les différences entre ces motifs tiennent essentiellement à la technique de multiplication et à l'hétérogénéité des porte-greffes. La valeur relativement élevée de la croissance moyenne dans cette expérimentation tend à confirmer l'importance de la juvénilité sur la vigueur. Dans cet essai, la grande similitude des 2 courbes de croissance pousse à conclure à une incidence faible du mode de multiplication. Cette conclusion globale doit cependant être tempérée par les faits suivants :

- les microboutures sont issues de cultures primaires, ce qui a maintenu une certaine variabilité physiologique entre les plants (la « mémoire » du bourgeon axillaire en fonction de sa position d'origine sur la tige) ;
- les 18 génotypes utilisés dans cette expérience, en tant que répétitions, ont des comportements légèrement différents, ce qui « tamponne » l'effet général ;
- l'évolution de la courbe de croissance au cours des dernières années pourrait générer une différence significative de niveau de production durant les années ultérieures.

Par ailleurs, la corrélation mise en évidence entre la taille des vitroplants au *planting* et la circonférence du tronc à 1 m, mesurée à 30 mois (essai 3) ou à 5 ans (essai 1), pourrait s'expliquer par le fait que lors du sevrage, les vitroplants étaient beaucoup plus petits qu'un *seedling*. En outre, la reprise de croissance est lente au cours des premiers mois d'acclimatation,

notamment pour les vitroplants d'IRCA 18. Il conviendrait, en conséquence, de réaliser une phase de pépinière équivalente à celle des témoins greffés, c'est-à-dire d'une durée de 8 à 10 mois et de mettre en champ des vitroplants mesurant 60 à 80 cm de hauteur. A titre d'hypothèse, les courbes d'évolution de la circonférence du tronc ont été tracées en fonction de la date de sevrage, pour les vitroplants, et de la date de semis pour les porte-greffes (figures 5 et 6). Elles montrent bien que la supériorité de croissance des vitroplants pourrait être, ainsi, mieux exploitée.

Une autre hypothèse doit également être prise en compte ; elle serait basée sur l'existence d'une corrélation directe entre la taille du vitroplant à la sortie de la culture *in vitro*, ou encore sa vitesse de croissance en acclimatation/pépinière, et sa vigueur ultérieure en champ. Une telle corrélation a été établie chez le *Pinus taeda* par Wisniewski *et al.* (1986).

Pour les 3 clones sélectionnés en essai, on note que la vigueur est très significativement supérieure pour le clone PB 260 issu d'embryogenèse somatique, tandis que pour les 2 autres clones, IRCA 18 issu de microbouturage et PR 107 issu d'embryogenèse somatique, la différence n'est pas significative.

Ces résultats corroborent ceux trouvés dans la littérature à propos des ligneux issus de micropropagation ; ils mettent en lumière que la supériorité de vigueur des vitroplants peut être réduite par la maîtrise imparfaite de la technique de culture *in vitro* (plants chétifs), ainsi que par la méconnaissance des exigences spécifiques de ce nouveau matériel végétal en phase d'acclimatation/pépinière. La supériorité des vitroplants varie également en fonction des génotypes. Les motifs greffés d'hévéas, utilisés dans les essais en champ, bénéficient de plus d'un demi-siècle d'expériences ayant conduit à optimiser les techniques de pépinière et de *planting*. Les

Remerciements

Les auteurs tiennent à remercier les Dr L. Lardet, F. Enjalric, H. Etienne, J. d'Auzac, I. El Hadrami, P. Montoro, N. Michaux-Ferrière qui ont participé à la mise au point des techniques de culture *in vitro* et à la production des vitroplants. M. Lartaud pour ceux de l'essai 1. C. Chaîne pour ceux de l'essai 2. F. Boazo et S. Tielo pour leur très précieux appui technique dans la mise en place des essais en champ et l'enregistrement méthodique des données. K. Amani, P. Vershave et V. Caussanel pour leur participation au traitement des données.

résultats enregistrés au cours de ces premiers essais en champ de vitroplants sont d'abord destinés à optimiser la gestion de ce nouveau type de matériel végétal. De nouveaux essais en champ sont déjà en place qui permettront notamment d'analyser l'influence des différents modes de multiplication par greffage, microbouturage et embryogenèse somatique sur la croissance et la production d'un même clone. ■

Bibliographie / References

- BONGA J.M., VON ADERKAS P., 1992. *In vitro* culture of trees. Dordrecht, Pays-Bas, Kluwer Academic Publishers, Forestry Sciences 38, 236 p.
- CARRON M.P., ENJALRIC F., LARDET L., DESCHAMPS A., 1989. Rubber (*Hevea brasiliensis* Müll. Arg.). In : Trees II, Y. P. S. Bajaj éd., Berlin, Allemagne, Springer-Verlag, Biotechnology in agriculture and forestry 5, p. 222-245.
- CARRON M.P., ETIENNE H., MICHAUX-FERRIERE N., MONTORO P., 1995a. Somatic embryogenesis in rubber tree (*Hevea brasiliensis* Müll. Arg.). In : Somatic embryogenesis and synthetic seed I, Y. P. S. Bajaj éd., Berlin, Allemagne, Springer-Verlag, Biotechnology in agriculture and forestry 30, p. 353-369.
- CARRON M.P., ETIENNE H., LARDET L., CAMPAGNA S., PERRIN Y., LECONTE A., CHAINE C., 1995b. Somatic embryogenesis in rubber (*Hevea brasiliensis* Müll. Arg.). In : Somatic embryogenesis in woody plants, 2, S.M. Jain, P.K. Gupta et R. J. Newton éd., Dordrecht, Pays-Bas, Kluwer Academic Publishers, p. 117-136.
- Cirad-cp, 1993. Recueil de fiches de clones hévéa. Montpellier, France, Cirad-cp, 150 p. (document interne).
- Cornu D., 1994. Forêt, de la gélouse à la terre. Biofutur (131) : 25-32.
- Delabarre M., Serier J.B., 1995. In : L'hévéa. Paris, France, Maisonneuve et Larose, coll. Le technicien d'agriculture tropicale 32, 238 p.
- Dijkman M.J., 1951. Hevea, thirty years of research in the far-east. Coral Gables, Floride, Etats-Unis, University of Miami Press, 329 p.
- Edin M., Mandrin J.F., Navatel J.C., Rosati P., Gaggioli D., 1987. Comportement en verger de porte-greffes obtenus par micropropagation. Cas particulier du porte-greffe du pêcher. Infos-CTIFL (35) : 14-18.
- EMBREE C.G., HICKS G.S., 1985. Field performance and micropropagation of a hardy apple rootstock candidate KSC-3. Can. J. Plant Sci. 65 : 459-464.
- ENJALRIC F., CARRON M.P., 1982. Microbouturage *in vitro* de jeunes plants d'*Hevea brasiliensis* (Kunth., Müll. Arg.). C. R. Acad. Sci. Paris, série III 295 : 259-264.
- FRAMPTON L.J., ISIK K., 1987. Comparison of field growth among loblolly pine seedlings and three plant types produced *in vitro*. Tappi (Tech. Assoc. Pulp Pap. Ind.) J. (7) : 119-123.
- GUPTA P.K., TIMMIS R., CARLSON W.C., 1993. Somatic embryogenesis: a possible tool for large-scale propagation of forestry species. In : Advances in developmental biology and biotechnology of higher plants, W.Y. Soh, J.R. Liu et A. Komamine éd., p. 18-37.
- JONES O.P., HADLOW C.C., 1989. Juvenile-like character of apple trees produced by grafting scions and rootstocks produced by micropropagation. J. Hort. Sci. 64 (4) : 395-401.
- LARDET L., BES M., ENJALRIC F., CARRON M.P., 1994. Mineral imbalance in *Hevea brasiliensis* microcuttings: relation with *in vitro* multiplication and acclimatization. J. Plant Nutr. 17 (12) : 2135-2150.
- LARSEN F.E., HIGGINS S.S., 1990. Early field performance of several self-rooted, micropropagated apple cultivars vs. trees on seedling or M. 7a rootstocks. Fruit Var. J. 44 (4) : 185-192.
- LIVERANI A., COBIANCHI D., SALVADOR F.R. DE, INSERO O., MINGUZZI A., 1991. Field performance of two peach and nectarine cultivars propagated *in vitro*. Annali Dell'Istituto Sperimentale per la Frutticoltura 19 : 39-45.
- MARTIN C., CARRE M., VERNON R., 1983. La multiplication végétative *in vitro* des végétaux ligneux cultivés : cas des arbres fruitiers et discussion générale. Rev. Agron. 4 : 19-22.
- MASCARENHAS A.F., KHUSPE S.S., NADGAUDA R.S., GUPTA P.K., KHAN B.M., 1988. Potential of cell culture in plantation forestry programs. In : Genetic manipulation of woody plants, J. W. Hanover et D.E. Keatley éd., New York, Etats-Unis, Plenum Press, p. 391-412.
- NAVATEL J.C., BOURRAIN L., 1989. Micropropagation et arbres fruitiers. Infos-CTIFL (51) : 6-10.
- SHELBOURNE C.J.A., CARSON M.J., WILCOX M.D., 1989. New techniques in the genetic improvement of radiata pine. Commonw. For. Rev. 68 (216) : 191-201.
- WEBSTER A.D., OEHL V.H., JACKSON J.E., JONES O.P., 1985. The orchard establishment, growth and precocity of four micropropagated apple scion cultivars. J. Hort. Sci. 60 (2) : 169-180.
- WISNIEWSKI L.A., FRAMPTON L.J., MCKEAN S.E., 1986. Early shoot and root quality effects on nursery and field development of tissue-cultured loblolly pine. HortScience 21 : 1185-1186.
- ZIMMERMAN R.H., STEFFENS G.L., 1989. Management of self-rooted tissue-cultured apple trees: I. Orchard establishment and early growth. Acta Hort. 239 : 117-120.

Field growth of *Hevea brasiliensis* clones produced by *in vitro* culture

Carron M.P.¹, Dea B.G.², Tison J.³, Leconte A.³, Kéli J.²

¹ CIRAD-CP, BP 5035, 34032 Montpellier Cedex 1, France

² IDEFOR-DPL, 01 BP 1536, Abidjan 01, Côte d'Ivoire

³ CIRAD-CP, 01 BP 1536, Abidjan 01, Côte d'Ivoire

Following the progress made in micropropagation (by axillary or adventive budding) since the start of the 1980s, firstly on different fruit species (Edin *et al.*, 1987) and then on angiosperm and gymnosperms of interest in forestry (Gupta *et al.*, 1993; Cornu, 1994), numerous field trials have been set up with *in vitro* plantlets of woody species. Generally speaking, the results published concern only the first years of growth. In many cases, strong initial growth is observed, but this is not systematic. As a result, these data do not provide unequivocal conclusions as to the advantages of *in vitro* propagation. However, their analysis does reveal the strong impact of explant origin, the *in vitro* propagation technique, the stage of plant development when transferred to the field and the characteristics of the "control" treatment.

On rubber, CIRAD⁽¹⁾ embarked upon two research topics in 1979: microcuttings and somatic embryogenesis. Alongside the development of these techniques, field comparative trials were set up from 1989 onwards, as and when *in vitro* plantlets were produced from seedlings and then from selected clones.

The first rubber estates were set up in Southeast Asia between 1890 and 1930, often using seed of uncontrolled origin. The heterogeneity of this planting material and the difficulty of obtaining large quantities of seed of known origin prompted the search for a way of vegetatively propagating elite trees. The impossibility of taking cuttings from selected, hence mature trees led to the widespread practice of budding onto seedlings. This "semi-vegetative" propagation technique had a certain number of drawbacks, which warranted continuous research to develop a "complete vegetative" propagation method, first by cuttings and then, from the 1970s onwards, by *in vitro* culture. The best seedlings grow much better and produce much more than budded clones (Dijkman, 1951). Some of the difference in performance can be put down to the genetic heterogeneity of the stock and the maturity of the clonal material produced from buds from adult branches maintained for several decades in "budwood gardens" (Carron *et al.*, 1989). Vegetative propagation by *in vitro* culture should resolve these problems.

We studied the growth of trees in three experimental plots from 30 months to six years. The

data concerned different genotypes, selected or not, propagated by *in vitro* culture (microcuttings or somatic embryogenesis) and by conventional budding. Growth was analysed according to the propagation method and the characteristics of the plants when transferred to the field.

Material and methods

The *in vitro* plantlets (microcuttings and somatic embryos) were produced in the CIRAD Biotrop⁽²⁾ laboratory for trials 1 and 2 and the SMH⁽³⁾ laboratory for trial 3. They were sent in tubes to the IDEFOR-DPL⁽⁴⁾ research station (Côte d'Ivoire), where acclimatization, nursery (preparation of control budded plants) and field

transfer operations were carried out. For trial 2, the plants were acclimatized in the CIRAD greenhouses in Montpellier and then sent to Côte d'Ivoire a month before planting. In all three trials, the *in vitro* plantlet treatment was compared to the budded plants used as a control.

Trial 1

Eighteen clones produced from "illegitimate" seeds of clone GT1 (paternal origin unknown) were planted out in June 1989, in a Fisher block design with two treatments (budded plants and microcuttings) and 18 replicates (genotypes). Each elementary plot contained 24 trees/genotype/propagation method. These non-selected seedlings were propagated either by microcutting or by budding onto 10-month-old stocks, produced from illegitimate GT1 seeds that were also non-selected. The primary explants required to multiply the 18 genotypes were sampled five months after germination. Plant production by microcutting used the technique described by Enjalric and Carron 1982 (box 1).

The acclimatization success rate was around 80%. The plants were transferred to the field three and a half months after the end of *in vitro* culture.

Trial 2

Trial was planted in June 1992 with clones PR 107 and PB 260, propagated either by conventional budding onto 10-month-old stocks or by somatic embryogenesis from primary calli, as per the technique described by Carron *et al.*, 1995a(box 2).

The plants were planted out around four months (PR 107) and six months (PB 260) after the end of *in vitro* culture. For PR 107, a Fisher block design was used; it comprised two treatments (budding and somatic embryogenesis) and six replicates; each elementary plot contained 11 trees. For PB 260, the planting design was totally random, with 18 plants per treatment.

■ Box 1. Enjalric and Carron's technique, 1982.

The axillary buds on the primary explants are opened by soaking for two hours in a benzylaminopurine (BAP 44 μM) and indolebutyric acid (IBA 25 μM) solution. The explants are then cultured on a medium without growth regulators but with activated charcoal (0.5 g/l) and a high sucrose content (80 g/l). The sticks formed after primary culture are collected and rooted by soaking for three days in an indolebutyric acid (IBA) and naphthalene acetic acid (NAA) solution (25 μM of each), followed by culturing on a medium without growth regulators.

■ Box 2. Technique described by Carron *et al.*, 1995a.

Fragments of the internal coat of immature seeds (maternal tissue) are placed on an agar medium containing 3,4-dichloro-phenoxyacetic acid (3,4 D) and kinetin (KIN), (4.44 μM of each), in the dark. After a month's culture, the explants on which a primary callus has formed are transferred to an identical medium but with a lower concentration of growth regulators (1.35 μM 3,4-D and BAP) and added spermidine (50 μM) and abscisic acid (ABA, 5 x 10⁻³ μM). Embryos form on this callus between the end of the second and third months of culture. The most developed embryos are then isolated and germinated following a maturation stage on a sucrose (351 μM) and ABA (1 μM) enriched medium. The plants are acclimatized once the first leaves have developed *in vitro*.

(1) Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement.

(2) Biotechnologies appliquées à l'amélioration des plantes tropicales.

(3) Société de microbouturage de l'hévéa.

(4) Institut des forêts-Département des plantes à latex.

■ Box 3. The technique described by Lardet *et al.*, 1994.

This technique includes a propagation phase following the development of a stick *in vitro* from an explant (box 1). This phase can take from several months to several years (around two years for the IRCA 18 *in vitro* plantlets used in this case) and lead to regular plantlet production. The phase is conducted by two parallel operations. On the one hand the basic explant from which the sticks have been cut is transferred monthly for five to six months onto a medium containing 4.44 μM BAP and 1.25 μM IBA. In each new culture, the explant forms one to three new shoots, by axillary budding. On the other hand, new basic explants are created from the sticks formed *in vitro*, hence ensuring constant renewal of the plant material.

Trial 3

Clone IRCA 18 propagated either by conventional budding onto 10-month-old stocks or by microcutting as per the technique (box 3) described by Lardet *et al.* (1994) was planted in June 1993.

The trial was planted in a Fisher block design with two treatments (budded stumps/microcuttings) and three replicates. Each elementary plot contained 30 trees. In this trial, striking during the acclimatization phase was very slow and losses very high (over 90%). The surviving plants were planted out after 12 months' acclimatization/nursery.

For acclimatization, the *in vitro* plantlets were weaned on mini-blocks and then transferred to 9-l black polybags filled with field soil, before being transferred to the nursery (Carron *et al.*, 1995b). When planting, the polybags were torn, taking care to preserve the block of soil containing the roots of the *in vitro* plantlet.

For the budded stumps, non-selected seeds were placed in the germination bed. The young seedlings were removed two to three weeks after germination and transferred, like the *in vitro* plantlets, to 9-l polybags for the nursery phase. After eight months, the seedlings were budded as per the conventional technique of budgrafting onto a woody stock (Delabarre and Serier, 1995). After ten months, the stock was cut back 5 to 10 cm above the bud patch and the budding was planted in a soil block after removing the polybag, as above. The buds generally opened within two months.

For all the trials, the planting density tallied with commercial standards: 510 trees/ha (7 x 2.80 m), as did management and fertilization.

Growth parameters

Trunk girth 1 m from the ground (G1m) was measured every three months. The mean growth

rates obtained were compared using Student's statistical test.

Results

The results were analysed taking planting as the starting point, as usual for rubber. However, we also compared the growth of the different treatments according to the weaning date for the *in vitro* plantlets and the sowing date for the budded plants, to determine the impact on field vigour of the stage of plant growth at the time of planting.

Growth trends before opening

Six years after planting, trial 1 showed that the growth of the two treatments, microcuttings (M) and budded plants (B) was almost identical for the clones produced from seedlings (figure 1, photo 1).

Although these 18 genotypes were produced from non-selected seed, their average growth was better than that of budded clones GT1 and RRIM 600, and similar to that of fast-growing clones such as IRCA 18 and PB 260 (Cirad-cp, 1993). This strong vigour, which was seen in both *in vitro* plantlets and budded plants, is generally the result of extremely strict selection leading to the elimination of at least 95% of the hybrids produced from controlled crosses! In this case, this result "without selection" may be due to an unintentional "family effect" (chance use of an exceptionally good batch of seed) or, more probably, to the juvenility of the plant material used in this trial.

Annual growth trends revealed a marked difference between the two treatments (figure 2). Growth stagnated in year 3, producing an irregularity in the expected bell-shaped curve: this particularity can be put down to the relative drought in 1992 (1,650 mm compared to 1,830 mm on average). Moreover, two periods can be identified:

- the first two years, corresponding to the time taken for the microcuttings to make up their initial growth deficit. In effect, the mean height of the microcuttings on planting was 13 cm (four months' acclimatization), which corresponds to a seedling less than a month after germination. At the same time, the budded plants benefitted from the reserves available in the 10-month-old stock, which was around 1.40 m tall before cutting back. For each genotype, the five most developed microcuttings at the time of planting (mean height 19.9 cm) had a girth at 1 m of 50.6 ± 2.0 cm at five years, which was greater (+ 34%) than that of the five least developed plants (mean height on planting = 7.7 cm; $G1m = 37.7 \pm 1.8$ cm). The mean girth was also very significantly greater (+ 13 %) than that of juvenile budded plants ($G1m = 44.8 \pm$

1.7 cm). This result suggested that there was an inverse correlation between growth stage at the time of planting and the length of the immature phase, before opening. Given the limited range of plant heights at the time of planting in this trial, this hypothesis was tested in trial 3 with microcuttings of clone IRCA 18 (figure 3, photo 2), which revealed a very strong curvilinear correlation ($r = 0.97$) between height on planting and girth at 1 m at 30 months. This treatment had a mean girth at 1 m of 24.1 cm, not significantly greater than that of the budded IRCA 18 treatment (22.8 cm);

- from year 3 onwards, the microcuttings produced from seedlings (trial 1) showed a greater annual increment (figure 2) than the juvenile budded plants, which in terms of overall growth (figure 1) was reflected in the intersection of the two curves and by the better growth of the microcuttings, which seemed to continue beyond opening. The almost imperceptible growth gain of the microcuttings at this stage nevertheless resulted in a greater number of trees being opened at five years, nine months (54% compared to 46% of juvenile budded plants). The greater annual increment of the microcuttings in the last few years of observations (figure 2) suggests that the difference between the two curves will become significant.

Comparative growth of conventional budded plants and plants produced by somatic embryogenesis

The growth rates recorded for the budded controls of clones PR 107 and PB 260 (trial 2, figure 4) were identical to the mean growth rates recorded for the clones in lower Côte d'Ivoire (Cirad-cp, 1993). Moreover, from year 1, the *in vitro* plantlets of clone PB 260 (photo 3) had a marked advantage over the budded plants, and the gap between the two curves grew, reflecting a consistently greater annual increment for *in vitro* plantlets. At 3.5 years, the advantage represented an additional 17% "tappable bark area". For clone PR 107 (photo 4), the growth curves are virtually superimposed. In view of the results obtained in trials 1 and 3, we can link this result for PR 107 to the small initial size of the *in vitro* plantlets (13 cm on average on planting). However, it is probably also important to allow for the fact that clone PR 107 is known to have a slow-growing phenotype (opening at around six and a half to seven years under the conditions in lower Côte d'Ivoire), whereas PB 260 has a fast-growing phenotype (opening at five years).

In these three trials, none of the plants produced by *in vitro* culture had any growth abnormal-

lities, and they all had the same morphological characteristics (canopy, foliage, etc.) as the budded clones with which they were compared.

Discussion and conclusion

Given the difficulty of propagating *Hevea* on its own roots (by cutting, marcottage or *in vitro* culture), the bibliographical data on the subject concentrate on technical details. The data available on the field performance of this type of material are sketchy, often qualitative and recorded in internal reports at different research organizations, hence difficult to consult. The agronomic merits of *Hevea* clones on their own roots have therefore previously only been assumed in the form of working hypotheses based on an accumulation of observations on seedlings and budded plants. For the first time, this study provides quantitative data obtained from field trials planted in statistical designs.

Direct observation of the results of these three trials shows that *Hevea in vitro* plantlets produced by microcutting or somatic embryogenesis always grow as well as if not better than conventional budded plants (figures 1 and 4). These results tally with those obtained for apple: apple *in vitro* plantlets have greater vigour than budded plants, reflected in a greater annual increment, enabling *in vitro* plantlets to catch up with budded plants between years 2 and 3, and then overtake them (Webster *et al.*, 1985; Embree and Hicks, 1985; Jones and Hadlow, 1989; Larsen and Higgins, 1990). This is not the case with eucalyptus and teak, where initial growth is much greater, but the difference gradually disappears two to three years after planting (Mascarenhas *et al.*, 1988). Lastly, opposite results were observed, with equivalent if not inferior *in vitro* plantlet growth, in peach, cherry, *Prunus*, *Pinus radiata*, *Pinus taeda* (Frampton and Isik, 1987; Navatel and Bourrain, 1989; Bonga and Von Aderkas, 1992). The cases of poor *in vitro* plantlet vigour are often associated with observations of early maturation and fruiting (Martin *et al.*, 1983), plagiotropism (Shelbourne *et al.*, 1989) or the formation of bacterial nodules on the roots of *Alnus glutinosa* (Evers *et al.*, 1988). In apple (Edin *et al.*, 1987; Zimmerman and Steffens, 1989) as in *Hevea* (Carron *et al.*, pers. comm.), the strong vigour is associated with increased *in vitro* plantlet juvenility. Over and above genetic specificities, these differences in performance depending on the

species may stem from *in vitro* propagation conditions. Bud neof ormation seems to be the cause of a substantial proportion of somaclonal variations and plagiotropism problems, particularly in conifers, for which it has often been achieved from cotyledons. By opposition, axillary buds are much more reliable. There are also considerable variations in the characteristics of the "control" used: seedlings for *Pinus taeda* (Frampton and Isik, 1987), cuttings for eucalyptus (Mascarenhas *et al.*, 1988), budded cuttings for peach (Liverani *et al.*, 1991) or, for apple, budded dwarfing stumps such as M27 or reinvigorating stumps such as M25 (Jones and Hadlow, 1989).

Trial 1 has the particularity of comparing two treatments with material of juvenile origin. As a result, the differences between the treatments essentially stem from the propagation technique and stock heterogeneity. The relatively strong mean growth in this trial tends to confirm the impact of juvenility on vigour. In this trial, the great similarity of the two growth curves suggests that the propagation method has little impact. However, this overall conclusion should be tempered by the following facts:

- the microcuttings were produced from primary cultures, which maintained a degree of physiological variability between the plants (the "memory" of the axillary bud depending on its original position on the branch);
- the 18 genotypes used as replicates in the trial performed slightly differently, which "buffered" the overall effect;
- the pattern of the growth curve in the last few years could lead to a substantial difference in production levels in future.

Moreover, the correlation detected between *in vitro* plantlet size on planting and trunk girth at 1 m measured at 30 months (trial 3) or five years (trial 1) may be due to the fact that during weaning, the *in vitro* plantlets were much smaller than a seedling. Furthermore, striking was slow during the first few months of acclimatization, particularly for IRCA 18 *in vitro* plantlets.

As a result, it would be wise to conduct a nursery stage equivalent to that for the budded controls, i.e. eight to ten months, and to plant out *in vitro* plantlets 60 to 80 cm tall. As an experiment, trunk girth increment curves were drawn as a function of weaning date for the *in vitro* plantlets and sowing date for the stocks (figures 5 and 6). They clearly showed that the stronger growth of *in vitro* plantlets could be put to more effective use in this way.

Another hypothesis should also be taken into account, based on the existence of a direct correlation between *in vitro* plantlet size at the end of *in vitro* culture, or its growth rate during the acclimatization/nursery stage, and its subsequent vigour in the field. Such a correlation was established in *Pinus taeda* by Wisniewski *et al.* (1986).

For the three selected clones tested, clone PB 260, produced by somatic embryogenesis, was much more vigorous, whilst the other two, IRCA 18 produced by microcutting and PR 107 produced by somatic embryogenesis, were not significantly different from each other.

These results tally with those found in the literature concerning woody plants produced by micropropagation; they highlight the fact that the greater vigour of *in vitro* plantlets can be tempered by imperfect mastery of the *in vitro* culture technique (stunted plants), and by inadequate knowledge of the specific requirements of this new type of planting material during the acclimatization/nursery stage. *In vitro* plantlet superiority also varies depending on the genotype. The budded *Hevea* trees used in the field trials have the benefit of over half a century of trials to optimize nursery and planting techniques. The results recorded during these first field trials of *in vitro* plantlets are primarily intended to optimize management of this new type of planting material. New field trials have already been set up, notably to analyse the effect of different types of propagation by budding, microcutting and somatic embryogenesis on the growth and production of a given clone. ■

Acknowledgements

The authors wish to thank Drs L. Lardet, F. Enjalric, H. Etienne, J. d'Auzac, I. El Hadrami, P. Montoro and N. Michaux-Ferrière, who participated in developing the *in vitro* culture techniques and in *in vitro* plantlet production; M. Lartaud for those for trial 1; C. Chaîne for those for trial 2; F. Boazo and S. Tielo for their invaluable technical support in setting up field trials and methodical data recording; K. Amani, P. Vershave and V. Caussanel for their contribution to data processing.