Rajeunissement de clones matures d'*Hevea brasiliensis* (Müll. Arg.) par microgreffage in vitro

Y. Perrin, L. Lardet, F. Enjalric, et M. P. Carron[1]

CIRAD-CP, Programme Hévéa — Unité BIOTROP, Avenue du Val de Montferrand, BP 5035, 34032 Montpellier Cedex, France. *Reçu le 29 septembre 1993, accepté le 18 février 1994.*

Can. J. Plant Sci. Downloaded from cdnsciencepub.com by 31.33.243.125 on 08/04/23

Perrin, Y., Lardet, L., Enjalric, F. et Carron, M. P. 1994. **Rajeunissement de clones matures d'*Hevea basiliensis* (Müll. Arg.) par microgreffage in vitro.** Can. J. Plant Sci. **74**: 623–630. L'application à deux clones matures d'*Hevea brasiliensis* (Müll. Arg.), IRCA 18 et PB 235, de la technique de microgreffage d'apex sur des plantules âgées de trois semaines germées in vitro permet le microbouturage de ces clones. Lorsqu'il est effectué à partir d'explants nodaux ou d'extrémités de pousses prélevés sur les greffons développés in vitro sur les porte-greffes, le microbouturage du matériel clonal microgreffé n'est pas possible. De tels explants sont en effet inaptes à reprendre une activité caulogène après leur isolement. Ce problème est surmonté par l'utilisation d'explants mixtes, constitués d'une partie du porte-greffe en contact avec le milieu de culture et du greffon clonal à partir duquel se développent régulièrement des pousses axillaires tout au long des cycles de culture. Les aptitudes au bourgeonnement et au développement de pousses au cours des cycles de culture ont été comparées entre les explants mixtes issus de microgreffes, les explants nodaux d'individus juvéniles et les explants nodaux des clones matures non traités. Cette comparaison révèle un effet très positif de l'application du microgreffage sur l'aptitude des clones IRCA 18 et PB 235 à la caulogenèse in vitro. En outre, les pousses produites par les explants clonaux issus des microgreffes ont une aptitude à l'enracinement identique à celle des pousses produites par les explants issus d'individus juvéniles.

Mots clés: Rajeunissement, *Hevea brasiliensis*, microgreffage in vitro, micropropagation, microbouturage in vitro

Perrin, Y., Lardet, L., Enjalric, F. and Carron, M. P. 1994. **Rejuvenation of mature clones of *Hevea brasiliensis* (Müll. Arg.) by in vitro micrografting.** Can. J. Plant Sci. **74**: 623–630. In vitro micrografting of apices of two mature genotypes of *Hevea brasiliensis* (Müll. Arg.), IRCA 18 and PB 235, on 3-wk-old seedlings grown in vitro permitted successfull in vitro microcutting of these two genotypes. Microcutting of micrografted material was impossible from nodal explants or shoot tips of scions developed in vitro on rootstocks. Such explants were incapable of caulogenesis activity after their isolation. This problem was resolved using mixed explants, each consisting of a part of the rootstock in contact with the culture medium, and of the clonal scion from which axillary shoots are developed regularly along the subcultures. Budding and shoot elongation abilities along the subcultures have been compared between mixed explants from micrografts, nodal explants from juvenile material and nodal explants from non-micrografted mature genotypes. The results show a very positive effect of micrografting on the in vitro caulogenesis ability in both genotypes. Moreover, shoots produced by mixed explants from micrografts exhibit the same rooting ability as shoots produced by explants collected on juvenile material.

Key words: Rejuvenation, *Hevea brasiliensis*, in vitro micrografting, micropropagation, in vitro microcutting

L'hévéa (*Hevea brasiliensis* Müll. Arg.) est un arbre tropical cultivé principalement en Asie du sud-est et dans une moindre mesure en Afrique intertropicale et en Amérique latine pour sa production de caoutchouc naturel. Le greffage de bourgeons clonaux sur des porte-greffes non sélectionnés est à l'heure actuelle la seule méthode de propagation végétative disponible pour l'établissement de plantations d'hévéas, en raison de la faible aptitude au bouturage des arbres sélectionnés. Cependant, cette pratique conduit à une certaine hétérogénéité intraclonale et à une diminution de la production de caoutchouc par rapport à l'arbre mère. Les techniques de multiplication végétative in vitro représentent donc une alternative très intéressante pour le clonage des génotypes d'hévéa sur leurs propres racines (Carron et al. 1989)

Le processus de développement in vitro des microboutures à partir d'explants nodaux issus d'individus juvéniles a été mis au point depuis plusieurs années (Enjalric 1983; Lardet 1987). Par contre, la production de microboutures à partir d'individus matures sélectionnés se heurte dans la plupart des cas à l'absence de caulogenèse ou d'enracinement in vitro (Lardet 1987; Seneviratne 1991). Bien que des travaux aient mentionné à différentes reprises l'obtention de microboutures de clones matures d'hévéa (Mascarenhas et al. 1982; Sinha R. R. données inédites; Asokan et al. 1988), ces résultats n'ont pas été confirmés par la suite et n'ont pas abouti à la production régulière de microboutures enracinées.

Il est apparu que les génotypes matures d'hévéa devaient être rajeunis avant d'être micropropagés, pour améliorer leur aptitude à la caulogenèse et à la rhizogenèse.

Le rajeunissement des pieds-mères peut faire appel à différentes manipulations dont le microgreffage d'apex matures sur des porte-greffes juvéniles, qui s'est révélé particulièrement efficace, notamment, chez *Sequoia sempervirens* et *Citrus reticulata* (Huang et al. 1992a,b).

Dans le cas de l'hévéa, les tentatives de rajeunissement in vivo des pieds-mères matures ont porté, jusqu'ici, essentiellement

[1]*Pour correspondance.*

Can. J. Plant Sci. Downloaded from cdnsciencepub.com by 31.33.243.125 on 08/04/23

sur l'application de greffages en cascade (Lardet 1987). Cette technique n'a cependant pas toujours permis la réacquisition par le matériel mature du niveau de juvénilité nécessaire à son microbouturage, notamment du point de vue de l'aptitude à l'enracinement. En effet, l'efficacité des greffages en cascade varie en fonction des clones, probablement en liaison avec l'état de maturité du pied-mère.

La culture d'apex n'a pas pu être utilisée du fait de la perte très précoce de leur réactivité in vitro au cours de l'ontogenèse de la plante (Lardet et al. 1990; Haffner et al. 1991). Aussi avons-nous choisi de faire appel à la technique de microgreffage in vitro pour rajeunir les génotypes matures.

La première partie de cet article est consacrée à la définition d'une technique de microgreffage in vitro adaptée à l'*Hevea brasiliensis* et d'une méthode originale de culture du matériel microgreffé. L'influence du microgreffage est ensuite appréciée par la mesure de l'aptitude au microbouturage, en comparant les résultats de caulogenèse et de rhizogenèse in vitro des deux clones matures non traités, des mêmes clones microgreffés et d'individus juvéniles.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel végétal

MATÉRIEL CLONAL MATURE EN SERRE. Ce matériel est représenté par des plants greffés avec deux clones d'intérêt industriel IRCA 18 et PB 235. Les explants nodaux, prélevés sur les rejets de greffe puis introduits in vitro, constituent le matériel témoin mature. Les rejets de greffe constituent aussi la source de bourgeons apicaux pour le microgreffage (Figure 1).

MATÉRIEL JUVÉNILE EN SERRE. Ce matériel provient d'arbres issus de semis âgés de 18 mois, entretenus en serre par des recépages réguliers. De la même manière que pour le matériel mature, les explants nodaux sont prélevés et introduits in vitro. Le matériel juvénile est constitué d'une population de demi-frères (GT1 ill.), descendance dite 'illégitime' du clone GT1 dont les parents mâles sont inconnus.

SEMIS IN VITRO. Ce matériel est utilisé comme porte-greffe lors du microgreffage in vitro. Les semis sont développés in vitro à partir d'embryons zygotiques extraits de graines immatures GT1 ill., 14 à 15 semaines après la fécondation.

Technique de microgreffage

PRÉPARATION DES GREFFONS. Des bourgeons apicaux sont prélevés sur du matériel clonal mature (Figure 1) et désinfectés sous hotte à flux laminaire par des bains successifs dans une solution de "désogerme SP" (Laboratoires A.C.I., Lyon, France) (1/200 v/v; 5 min), puis dans une solution d'éthanol (70°; 2 min) et enfin dans une solution d'H_2O_2 110 Vol. (1/3 v/v; 10 min). Après trois rinçages de 10 min dans de l'eau stérile, les apex sont disséqués jusqu'à être constitués du méristème et de quelques ébauches foliaires (1 à 2 mm).

PRÉPARATION DES PORTE-GREFFES. Des embryons zygotiques sont extraits des graines préalablement désinfectées à l'éthanol (70°C; 5 min) puis au "désogerme" (1/200 v/v).

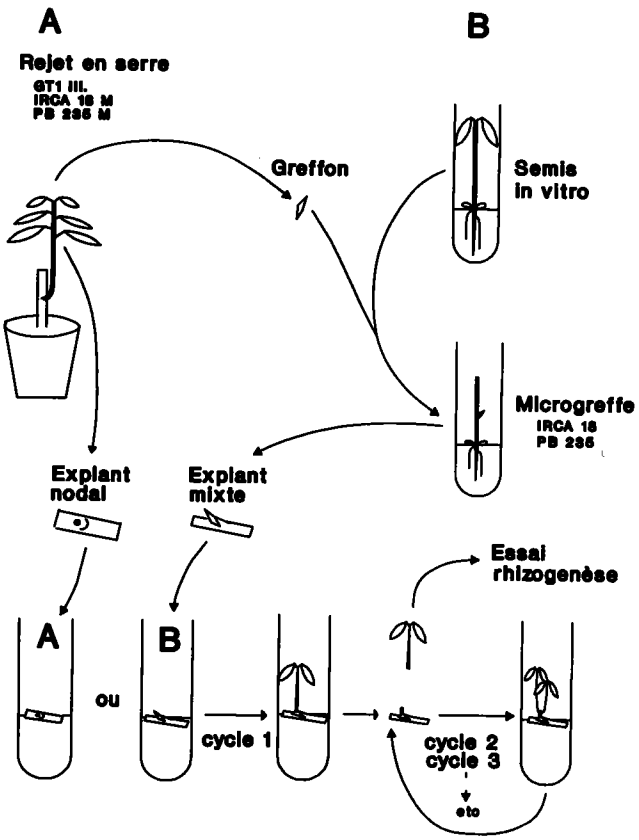


Fig. 1. Schéma expérimental du microbouturage des matériels juvénile et clonal. A: sans prétraitement; B: avec traitement de rajeunissement par microgreffage in vitro. Cycle 1: cycle d'introduction in vitro; cycles 2, 3 ... cycles de multiplication.

Les embryons sont mis à germer individuellement en conditions stériles dans des tubes (30×150 mm). Le milieu de germination est constitué des macroéléments (dilués au tiers), des microéléments (concentrés deux fois) et du Fer-EDTA du milieu modifié de Murashige et Skoog (1962), des vitamines du milieu MH (Carron et Enjalric 1985), de saccharose à 50 g L^{-1} et de gélose (agar DIFCO) à 8 g L^{-1}. Le pH du milieu est ajusté à 5,8 avant autoclavage (30 min. à 120°C). Les plantules se développent en chambre de culture éclairée à 90 μE m^{-2} s^{-1} au niveau des cultures, sous régime photopériodique de 12h, et à 27°C constant. Trois à quatre semaines après l'introduction in vitro des embryons, les germinations sont prêtes à être greffées.

OPÉRATION DE MICROGREFFAGE. Une expérience préalable portant sur la mise au point de la technique de microgreffage nous a conduit à adopter la technique de greffage en fente latérale, plutôt que celles du greffage par dépôt de l'apex sur la section du porte-greffe recépé, ou dans une fente apicale. Le greffage est donc effectué par insertion de l'apex taillé en biseau dans une fente latérale (Figure 2) pratiquée sur l'épicotyle de la plantule à 2,5 cm des attaches cotylédonnaires.

Can. J. Plant Sci. Downloaded from cdnsciencepub.com by 31.33.243.125 on 08/04/23

Le stade de croissance des rameaux (croissance ou repos végétatif, l'hévéa ayant une croissance rythmique) au moment du prélèvement des bourgeons apicaux n'influence pas la réussite du microgreffage, ni le développement ultérieur des greffons. Les bourgeons apicaux sont donc prélevés indifféremment au cours ou à la fin de la formation de l'étage foliaire des plants-mères en serre.

Une fois le microgreffage effectué, les microgreffes sont repiquées et entretenues dans les mêmes conditions de culture que les germinations in vitro. Les porte-greffes sont ensuite recépés pour lever la dominance apicale et permettre le débourrement du greffon. Le recépage est effectué trois semaines après le greffage car des délais plus courts (une ou deux semaines), même s'ils n'affectent pas les taux de réussite, retardent le débourrement des greffons.

Critères morphogénétiques du rajeunissement

Le rajeunissement du matériel clonal obtenu par la technique du microgreffage est estimé vis-à-vis de son aptitude au microbouturage. Une comparaison de l'aptitude au microbouturage des clones microgreffés, des clones non microgreffés (matures) et d'individus juvéniles est effectuée par la mesure de leurs aptitudes au bourgeonnement axillaire à partir d'explants nodaux, au développement de ces bourgeons en pousse et à l'enracinement in vitro des pousses développées.

Conditions générales de culture

Le protocole de désinfection des matériels juvénile et mature est similaire à celui des apex à la différence que l'H_2O_2 n'est diluée qu'aux deux tiers. Les cycles de culture sont effectués sur le milieu minéral MB (Enjalric et Carron 1982) additionné des vitamines du milieu MH (Carron et Enjalric 1985), de saccharose à 40 g L^{-1}, de gélose (agar DIFCO) à 8 g L^{-1} et de régulateurs de croissance (AIB à 1,23 μM et BAP à 4,44 μM). La concentration en AIB et BAP est réduite au cinquième pour le premier cycle de culture. Le pH du milieu est ajusté à 5,8 avant autoclavage (30 min. à 120°C). Les explants se développent dans les conditions physiques décrites précédemment.

A l'issue de chaque cycle de culture, d'une durée de quatre semaines, les pousses formées sur les explants sont recépées et éventuellement induites en enracinement pour évaluer leur aptitude rhizogène. L'explant de base est repiqué intégralement, y compris la partie porte-greffe pour les motifs microgreffés, afin d'induire la formation de nouvelles pousses par bourgeonnement axillaire à la base de la(des) pousse(s) précédemment recépée(s) (Figure 1).

Pour les essais d'enracinement, les pousses d'une hauteur supérieure à 10 mm sont induites par piqûre de la section de la tige avec une aiguille montée, trempée dans une solution stérilisée d'auxines (ANA et AIB à 26,8 μM et 24,6 μM respectivement). Elles sont repiquées immédiatement sur un milieu d'expression racinaire MER constitué de macroéléments (KNO_3 à 9 μM; NH_4NO_3 à 2,5 μM; $Ca(NO_3)_2$ à 2,5 μM; $MgSO_4$ à 0,7 μM; $CaCl_2$ à 1 μM), des microéléments et des vitamines du milieu MH (Carron et Enjalric 1985), de saccharose à 80 g L^{-1} et de gélose (agar DIFCO) à 9 g L^{-1}. Le pH du milieu est ajusté à 5,8 avant autoclavage (30 min. à 120°C). La phase d'induction racinaire nécessite trois jours d'obscurité à l'issue desquels les pousses sont transférées à la lumière pour le développement des racines.

Mesure des paramètres de réactivité

L'aptitude à la caulogenèse in vitro est jugée grâce à la mesure à chacun des cinq cycles successifs de cultures (1) du taux d'explants produisant au moins un bourgeon axillaire par rapport au nombre total d'explants (en %), (2) du nombre moyen de bourgeons et/ou de pousses développés par explant portant au moins un bourgeon, (3) du taux d'explants produisant au moins une pousse axillaire à partir des bourgeons par rapport au nombre total d'explants (en %) et (4) du nombre moyen de pousses développées par explant produisant au moins une pousse. La qualité, la morphologie des pousses et les taux de brunissement des explants sont aussi considérés.

L'aptitude des pousses à l'enracinement est mesurée sur deux cycles de culture pour les matériels mature et juvénile et trois cycles de culture pour le matériel microgreffé. Elle est exprimée par le taux global de pousses enracinées 30 jours après le traitement d'induction par rapport à la totalité des pousses testées à la fin des deux ou trois cycles de culture (en %).

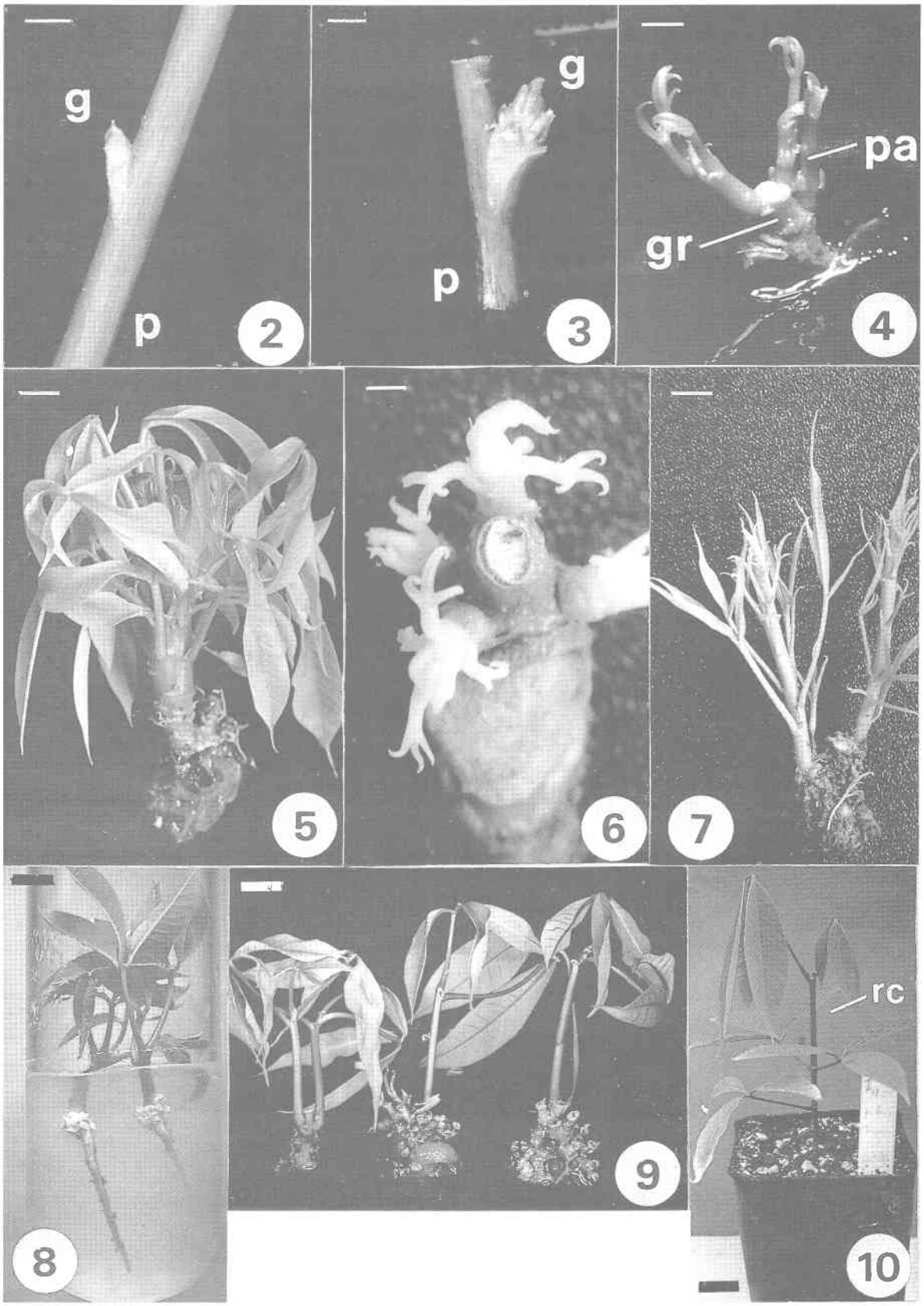
Analyses statistiques

Les effectifs d'explants et de pousses utilisés pour chaque motif sont précisés respectivement dans les tableaux 1 et 2. La loi de Student est utilisée pour le calcul de l'intervalle de confiance des moyennes. Le test du χ^2 est utilisé pour apprécier la validité des différences entre les pourcentages.

RESULTATS

Utilisation originale des microgreffes

Les premiers essais de microbouturage du matériel issu de microgreffes ont été effectués par la culture des greffons développés in vitro sur les plantules porte-greffes. Les greffons étaient isolés des porte-greffes dès la fin du développement du premier étage foliaire, sous forme d'explants nodaux ou d'extrémités de tige. Ces essais n'ont pas abouti du fait de l'absence de reprise de croissance des extrémités de tige ou de l'absence de développement de pousses sur les explants nodaux. Ces fragments de tige mesurent environ 1 mm de diamètre, il est donc possible que l'absence de réactivité provienne de leur faible dimension. Nous avons tenté de résoudre ce problème en utilisant des explants mixtes, constitués d'une portion du porte-greffe portant le greffon en cours de débourrement (Figure 1). Ces fragments, d'une longueur de 1,5 cm et d'un diamètre de 2,5 mm environ, ne comportant aucun bourgeon excepté le greffon, sont alors assimilés à des explants nodaux avec la particularité de comporter une partie issue de la plantule porte-greffe et un bourgeon d'origine clonale (Figure 3). Ils sont cultivés in vitro dans les mêmes conditions que les explants des matériels mature et juvénile. Cette méthode originale de culture du matériel microgreffé permet d'obtenir la formation régulière de pousses à partir des greffons développés au premier cycle de culture.



Can. J. Plant Sci. Downloaded from cdnsciencepub.com by 31.33.243.125 on 08/04/23

Can. J. Plant Sci. Downloaded from cdnsciencepub.com by 31.33.243.125 on 08/04/23

Influence du microgreffage sur les aptitudes au microbouturage

BOURGEONNEMENT AXILLAIRE. Concernant les explants mixtes issus de microgreffe, le bourgeonnement et le développement de pousses a lieu uniquement à partir des greffons (Figure 4). Les pousses sont donc strictement d'origine clonale. Les taux d'explants portant au moins un bourgeon axillaire évoluent différemment selon l'origine des explants au cours des cycles successifs de culture (Figure 11). Pour les explants mixtes issus de microgreffe la valeur de ce paramètre ne varie pas au cours des cycles de culture et pour le matériel juvénile, elle diminue au second cycle mais reste constante aux cycles suivants. Par contre, dans le cas des explants issus des clones matures, elle décroît régulièrement au cours des cycles. Par ailleurs, les explants issus du matériel juvénile et de microgreffe présentent en moyenne un plus grand nombre de bourgeons axillaires et/ou de pousses que les explants issus de matériel mature (Figure 12).

DÉVELOPPEMENT DES POUSSES. Dans le cas du matériel juvénile et de celui issu de microgreffe, les taux d'explants portant au moins une pousse sont similaires aux pourcentages d'explants portant au moins un bourgeon (Figure 13); ce qui signifie que la presque totalité des explants forme des pousses à partir de leurs bourgeons. Cela n'est pas le cas des explants issus de matériel mature. Les augmentations observées aux troisième et cinquième cycles de culture sont dues à la formation de pousses à partir de bourgeons axillaires non développés aux cycles précédents. Dans le cas du matériel issu de microgreffe, le pourcentage d'explants ayant développé une pousse au premier cycle correspond en fait au pourcentage de réussite du microgreffage. En effet, ce pourcentage est identique au pourcentage de greffons débourrés après le recépage des porte-greffes puisque tous les explants mixtes introduits au premier cycle de culture ont développé une pousse à partir des greffons débourrés. L'infériorité du matériel mature, du point de vue de l'aptitude à développer des pousses, s'observe aussi dans le cas des nombres moyens de pousses développées par explant (Figure 14).

MORPHOLOGIE DES POUSSES. Les pousses présentent un aspect morphologique très différent en fonction de leur origine: les pousses développées sur les explants issus de microgreffe ou du matériel témoin juvénile ont une tige très fine et portent deux à trois feuilles (Figure 9), alors que celles formées par les explants issus du matériel mature ont un diamètre nettement supérieur, un feuillage plus fourni et des entre-noeuds courts (Figure 5).

QUALITÉ DES POUSSES ET BRUNISSEMENT DES EXPLANTS. Les explants microgreffés ne développent que des pousses présentant un aspect normal (Figure 9), alors qu'environ 50% des explants matures développent des bourgeons et/ou des pousses considérés comme anormaux (Tableau 1): les bourgeons sont alors jaunes (Figure 6) et les pousses se caractérisent par leur couleur vert pâle et leurs feuilles très fines (Figure 7). Le matériel juvénile ne présente que 26% de souches développant de telles anomalies.

Par ailleurs, alors qu'environ 90% des explants matures et 60% des explants juvéniles sont le siège de phénomènes d'oxydation conduisant au noircissement complet de la moelle, plus ou moins précocement au cours des cycles de culture, les souches issues du matériel microgreffé ne présentent pas d'oxydation.

ENRACINEMENT. Les résultats présentés (Tableau 2) correspondent à la moyenne de deux essais dans le cas des matériels mature et juvénile et de trois essais dans le cas du matériel issu de microgreffe. Ils révèlent une nette supériorité des microboutures issues des explants juvéniles et des explants de microgreffes dans leur capacité à s'enraciner

Figures 2–10

Fig. 2. Greffon taillé en biseau (g) et inséré dans la fente pratiquée sur l'épicotyle de la plantule porte-greffe (p) (barre = 2,5 mm).

Fig. 3. Explant mixte constitué de la portion du porte-greffe (p) comportant le greffon et du greffon clonal en cours de débourrement (g) (barre = 2,5 mm).

Fig. 4. Développement de pousses axillaires (pa) à partir du greffon recépé (gr) lors du recyclage précédent (barre = 2,5 mm).

Fig. 5. Pousse développée sur un explant issu du matériel mature du clone PB 235; sa tige est épaisse et elle porte un grand nombre de feuilles (barre = 5 mm).

Fig. 6. Explant d'origine mature présentant des bourgeons de type anormal; les bourgeons sont jaunes (barre = 1,5 mm).

Fig. 7. Explant d'origine mature présentant des pousses de type anormal; les pousses sont de couleur vert pâle et leurs feuilles sont très fines et insérées tout le long de la tige (barre = 5 mm).

Fig. 8. Pousses PB 235 issues du matériel microgreffé, enracinées in vitro sur milieu MER, 30 jours après le traitement d'induction (barre = 6 mm).

Fig. 9. Pousses développées sur des explants mixtes issus de microgreffes du clone PB 235; leurs tiges sont fines et elles ne portent que deux à trois feuilles (barre = 5 mm).

Fig. 10. Microbouture IRCA 18 issue du matériel microgreffé, sevrée après enracinement in vitro et développée pendant six mois en serre; rc = reprise de croissance (barre = 1,8 cm).

Tableau 1. Microbouturage d'*Hevea brasiliensis*. Taux moyens d'explants[z] (%) présentant des pousses et/ou des bourgeons anormaux (explants anormaux), au cours des cinq cycles de culture, en fonction de l'origine des explants

Génotype	GT1 ill.	IRCA 18		PB 235	
Origine des explants	Juvénile	Mature	Microgreffé	Mature	Microgreffé
Nombre total d'explants	89	168	22	122	21
Taux d'explants anormaux (%)	26*a*[y]	52*b*	0*a*	55*b*	0*a*

[z]Par rapport au nombre total d'explants introduits in vitro.
[y]Les valeurs suivies de lettres différentes sont significativement différentes à $P < 0.1\%$ (test χ^2).

Tableau 2. Microbouturage d'*Hevea brasiliensis*. Taux d'enracinement[z] in vitro (%) obtenus sur l'ensemble des essais, en fonction de l'origine des pousses

Génotype	GT1 ill.	IRCA 18		PB 235	
Origine des explants	Juvénile	Mature	Microgreffé	Mature	Microgreffé
Nombre de pousses testées	44	45	63	36	73
Taux d'enracinement (%)	68*a*[y]	7*b*	73*a*	3*b*	70*a*

[z]30 jours après transfert sur milieu MER.
[y]Les valeurs suivies de lettres différentes sont significativement différentes à $P < 0.1\%$ (test χ^2).

(Figure 8) par rapport aux microboutures issues du matériel mature. Dans le cas du matériel mature, quatre pousses seulement (sur un total de 81 pousses testées) ont pu être enracinées sur l'ensemble des deux génotypes. Des essais de sevrage des microboutures enracinées issues des explants microgreffés conduisent à des taux de reprise de croissance (Figure 10) de 45% et de 51% respectivement pour les clones IRCA 18 et PB 235.

DISCUSSION

L'utilisation de matériel microgreffé pour le microbouturage des deux clones étudiés permet l'amélioration de l'aptitude des explants à la caulogenèse axillaire, dont témoignent la formation de bourgeons et de pousses à chaque cycle de culture ainsi que la bonne qualité de leur développement. Il faut noter que l'hétérogénéité génotypique du matériel témoin juvénile est vraisemblablement à l'origine des résultats moyens concernant les pourcentages d'explants aptes à la caulogenèse par rapport au matériel microgreffé. En effet, indépendamment de la maturité du matériel végétal, le génotype intervient dans ses capacités au microbouturage (Dunstan et al. 1989; Junker et Favre 1989) et certains génotypes d'hévéa, même juvéniles, présentent peu d'aptitudes à la caulogenèse dans nos conditions de culture (résultats non publiés).

L'utilisation de matériel clonal issu de microgreffe permet aussi la récupération de l'aptitude rhizogène in vitro des pousses formées qui, pour les deux clones étudiés, redevient comparable à celle des pousses issues des explants nodaux d'individus juvéniles.

L'amélioration de l'aptitude caulogène in vitro, à la suite du microgreffage, a également été observée chez d'autres espèces ligneuses, telles que *Pseudotsuga menziesii* (De la Goublaye de Nantois 1980), *Thuya plicata* (Misson et Giot-Wirgot 1984), *Persea americana* (Pliego-Alfaro et Murashige 1987), *Sequoia sempervirens* (Huang et al. 1992a) et *Citrus reticulata* (Huang et al. 1992b). La récupération de l'aptitude rhizogène peut, dans certains cas, nécessiter la réitération du microgreffage (De la Goublaye de Nantois 1980; Monteuuis 1986; Huang et al. 1992a,b).

L'action rajeunissante du microgreffage d'apex matures sur des porte-greffes juvéniles pourrait s'expliquer par le retrait des inhibitions de nature corrélative liées à la maturité du pied-mère. En ce sens, le microgreffage in vitro permettrait, en partie, de contourner les difficultés inhérentes à la culture de méristèmes prélevés sur des individus âgés (Dumas et al. 1989). L'influence positive du rapprochement du greffon d'un système racinaire actif est aussi invoquée à travers son action nutritionnelle (Chaperon 1979) et à travers son rôle dans la fourniture en substances de croissances impliquées dans la juvénilité (Greenwood 1987). Huang et al. (1992a) posent aussi l'hypothèse de la transmission d'un signal à partir des tissus juvéniles avoisinant le greffon.

Quelles qu'en soient les modalités, le rajeunissement obtenu chez les deux clones d'hévéa est bien réel, en regard des résultats obtenus in vitro. En outre, il est intéressant de noter qu'un taux d'enracinement de 84% a été obtenu à partir de 12 greffons PB 235, développés in vitro jusqu'au premier étage foliaire sur le porte-greffe entier (expérience non présentée); ce résultat étant donc obtenu en absence de régulateurs de croissance dans le milieu de culture et de cycles répétés de cultures.

L'existence d'une morphologie identique entre les pousses issues du matériel témoin juvénile et les pousses issues d'explants microgreffés est un bon indicateur morphologique du rajeunissement opéré par cette technique. La réduction du diamètre des tiges pourrait refléter une réduction de la taille des méristèmes apicaux, phénomène associé au rajeunissement induit par la culture in vitro chez *Dalhia variabilis* (Watelet-Gonod et Favre 1980).

Dans notre expérimentation, en outre, les bourgeons clonaux ne se révèlent réactifs que si une portion du porte-greffe est maintenue en interface avec le milieu de culture. La présence de tissus juvéniles, aptes à répondre favorablement aux conditions de culture, permettrait alors une bonne alimentation des tissus clonaux qui seraient par conséquent dans un état physiologique favorable au bourgeonnement. En effet, dans les mêmes conditions de culture, Jourdan et al. (1992) ont montré chez l'hévéa l'influence positive du faible nombre

Can. J. Plant Sci. Downloaded from cdnsciencepub.com by 31.33.243.125 on 08/04/23

Can. J. Plant Sci. Downloaded from cdnsciencepub.com by 31.33.243.125 on 08/04/23

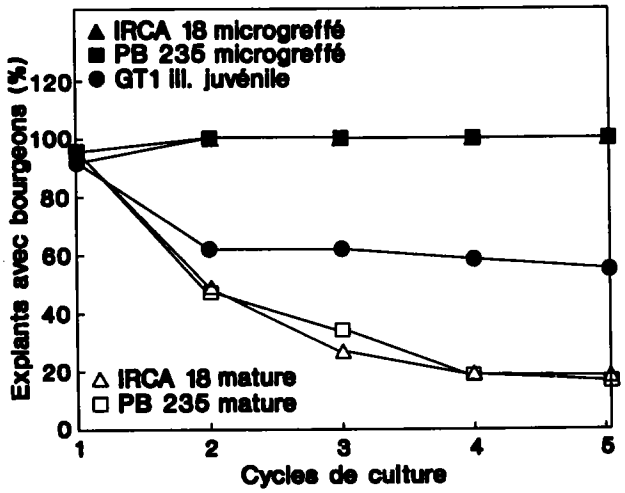


Fig. 11. Taux d'explants (%) produisant au moins un bourgeon axillaire (explants avec bourgeons) au cours des cinq cycles de culture par rapport au nombre total d'explants introduits in vitro (n), en fonction de la nature du matériel végétal (GT1 ill.: n = 89; IRCA 18 mature: n = 168; IRCA 18 microgreffé: n = 22; PB 235 mature: n = 122; PB 235 microgreffé: n = 21).

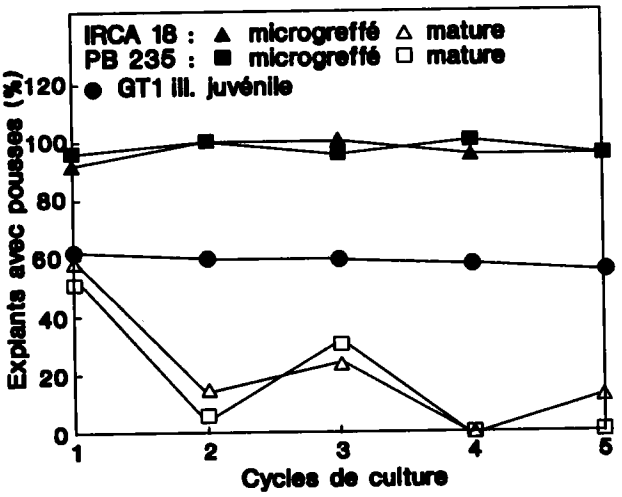


Fig. 13. Taux d'explants (%) produisant au moins une pousse axillaire (explants avec pousses), au cours des cinq cycles de culture, par rapport au nombre total d'explants introduits in vitro (n) en fonction de la nature du matériel végétal (GT1 ill.: n = 89; IRCA 18 mature: n = 168; IRCA 18 mirogreffé: n = 22; PB 235 mature: n = 122; PB 235 microgreffé: n = 21).

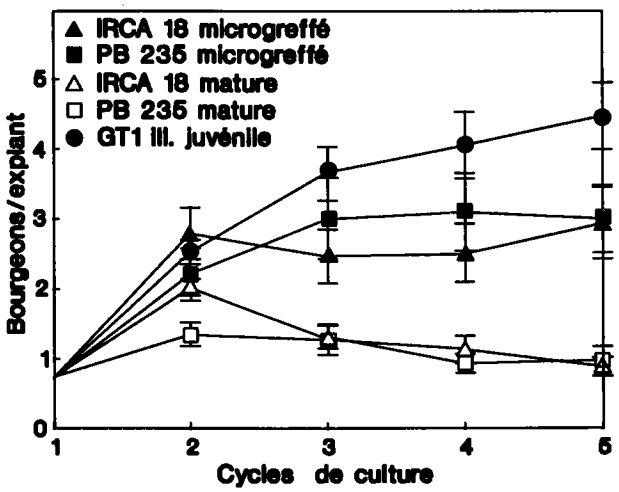


Fig. 12. Nombres de bourgeons et/ou de pousses axillaires développés par explant portant au moins un bourgeon, au cours des cinq cycles de culture, en fonction de la nature du matériel végétal; valeurs moyennes et intervalles de confiance (test t).

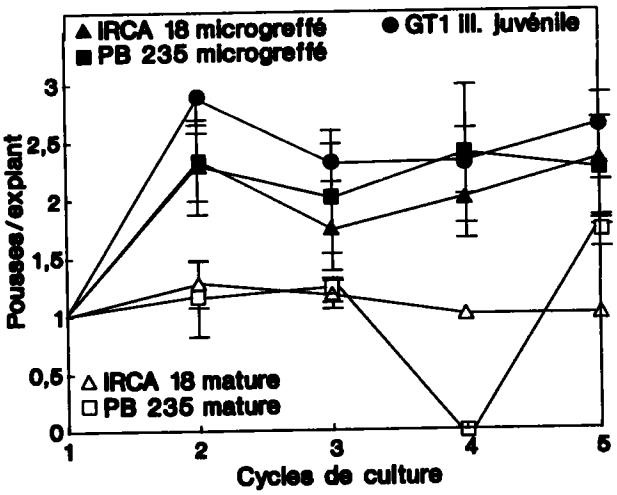


Fig. 14. Nombres de pousses axillaires développées par explant portant au moins une pousse, au cours des cinq cycles de culture, en fonction de la nature du matériel végétal; valeurs moyennes et intervalles de confiance (test t).

d'assises cellulaires phénolisées, de la richesse en vaisseaux xylémiens, de l'absence de cire épicuticulaire et enfin d'un gradient de potentiel hydrique fortement décroissant de la zone de contact des souches avec le milieu de culture vers les parties caulogènes, sur les flux d'eau et de solutés dans les explants de matériel juvénile. Or, des travaux ultérieurs ont montré dans le cas des explants issus de matériel mature, que ces caractéristiques sont moins favorables à l'alimentation des parties caulogènes (Jourdan, résultats non publiés). Notons que dans notre cas, les explants microgreffés ne présentent aucun phénomène de brunissement au cours des cycles de culture.

Par l'application d'un seul microgreffage in vitro, nous avons donc obtenu une nette amélioration des aptitudes caulogène et rhizogène in vitro de deux génotypes matures. D'un point de vue pratique, ces résultats permettent d'envisager l'extension de cette technique de rajeunissement à d'autres génotypes matures d'hévéa et leur multiplication végétative par la méthode du microbouturage in vitro efficace sur du matériel juvénile.

Asokan, M. P., Sobhana, P., Sushamakumari, S. et Sethuraj, M. R. 1988. Tissue culture propagation of rubber (*Hevea brasiliensis*) (Willd. ex Adr. de Juss. Müll. Arg.) clone GT (Gondang Tapen)1. Indian J. Nat. Rubb. Res. **1**:(2): 10–12.

Carron, M. P. et Enjalric, F. 1985. Embryogenèse somatique à partir du tégument interne de la graine d'*Hevea brasiliensis* (Kunth Müll. Arg.). C. R. Acad. Sci. Ser. III Sci. Vie **300**: 653–658.

Carron, M. P., Enjalric, F., Lardet L. et Deschamps, A. 1989. Rubber (*Hevea brasiliensis* Müll. Arg.). Pages 222–245 *dans* Y. P. S. Bajaj. ed. Biotechnology in agriculture and forestry. Vol. 5. Trees II. Springer Verlag, Berlin, Alle.

Chaperon, H. 1979. Maturation et bouturage des arbres forestiers. Ann. AFOCEL. **12**: 19–31.

De la Goublaye De Nantois, T. 1980. Rajeunissement chez le Douglas en vue de sa propagation végétative. Etudes sur la plagiotropie des parties aériennes et racinaires. Mémoire de DEA. Université Paris VI, France. 41 p.

Dumas, E., Franclet, A. et Monteuuis, O. 1989. Microgreffage de méristèmes primaires caulinaires de pins maritimes (*Pinus pinaster* Ait.) âgés sur de jeunes semis cultivés in vitro. C. R. Acad. Sci. Ser. III Sci. Vie **309**: 723–728.

Dustan, D. I., Bethune, T., Kikcio, S. et Lapp, M. S. 1989. In vitro shoot formation among 17-year-old douglas-fir provenance. Can. J. For. Res. **19**: 1299–1302.

Enjalric, F. et Carron M. P. 1982. Microbouturage in vitro de jeunes plants d'*Hevea brasiliensis* (Kunth., Müll. Arg.). C. R. Acad. Sci. Ser. III Sci. Vie **295**: 259–264.

Enjalric, F. 1983. Etude sur le mirobouturage in vitro de l'*Hevea brasiliensis* (Müll. Arg.). Thèse de troisième cycle de l'Université Paris sud, France. 161 p.

Greenwood, M. S. 1987. Rejuvenation of forest trees. Plant Growth Regul. **6**: 1–12.

Haffner, V., Maldiney, R. et Lardet, L. 1991. Réactivité des apex d'*Hevea brasiliensis* (Müll. Arg.) in vitro: relation avec les teneurs en auxines, acide abscissique et cytokinines. C. R. Acad. Sci. Ser. III Sci. Vie **312**: 171–176.

Huang, L. C., Lius, S., Huang, B. L., Murashige, T., Madhi, F. M. et Van Gundy, R. 1992a. Rejuvenation of *Sequoia sempervirens* by repeated grafting of shoot tips onto juvenile rootstocks in vitro. Plant physiol. (Bethesda) **98**: 166–173.

Huang, L. C., Hsiao, C. K., Lee, S. H., Huang, B. L. et Murashige, T. 1992b. Restoration of vigor and rooting competence in stem tissues of mature *Citrus* by repeated grafting of their shoot apices onto freshly germinated seedlings in vitro. In vitro Cell Dev. Biol. **28**: 30–32.

Jourdan, C., Enjalric, F., Lardet, L., Michaux-Ferrière, N., Berger, A. et Carron, M. P. 1992. Caractéristiques hydriques et histologiques de vitroplants d'*Hevea brasiliensis* (Müll.-Arg.) en cours de micropropagation. C. R. Acad. Sci. Ser. III Sci. Vie **315**: 395–401.

Junker, B. et Favre, J. M. 1989. Clonal effect in propagating oak trees via in vitro culture. Plant Cell Tissue Organ Cult. **19**: 267–276.

Lardet, L. 1987. Amélioration des conditions du microbouturage de l'*Hevea brasiliensis* (Müll. Arg.). Thèse de doctorat de l'Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier II, France, 242 p.

Lardet, L., Enjalric, F. et Carron, M. P. 1990. Culture d'apex d'*Hevea brasiliensis* (Müll. Arg.). Influence du stade morphogénétique et de l'âge des explants. C. R. Acad. Sci. Ser. III Sci. Vie **310**: 195–202.

Mascarenhas, A. F., Hazara, S., Potdar, U., Kulkarni, D. K. et Gupta, P. K. 1982. Rapid clonal multiplication of mature forest trees through tissue culture. Vth Int. Congress of Plant Tissue and Cell Cult., 11–16 July, Tokyo, Japan.

Misson, J. P. et Giot-Wirgot, P. 1984. Rajeunissement d'un clone de Thuya en vue de sa multiplication in vitro. Ann. AFOCEL **1984**: 188–197.

Monteuuis, O. 1986. Microgreffage du séquoia géant. Ann. AFOCEL **1986**: 40–61.

Murashige, T. et Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth on bioassays with tabacco tissue cultures. Physiol. plant. **15**: 473–497.

Pliego-Alfaro, F. et Murashige, T. 1987. Possible rejuvenation of adult avocado by graftage onto juvenile rootstocks in vitro. Hortscience **22(6)**: 1321–1324.

Seneviratne, P. 1991. Micropropagation of juvenile and mature *Hevea brasiliensis*. Ph.D., University of Bath, Bath, U.K. 278 p.

Watelet-Gonod, M. C. et Favre, J. M. 1980. Miniaturisation et rajeunissement chez *Dalhia variabilis* (variété Télévision) cultivé in vitro. Ann. Sci. Nat. Bot. Ser. 13 Biol. Veg. **2–3**: 51–67.

Can. J. Plant Sci. Downloaded from cdnsciencepub.com by 31.33.243.125 on 08/04/23