

**D**ans l'usine à caoutchouc qu'est l'hévéa, deux mécanismes biologiques principaux règlent la production : la régénération du latex après la saignée et son écoulement. Il est nécessaire de bien connaître ces deux facteurs limitants pour optimiser la production et proposer aux planteurs des méthodes d'exploitation les mieux adaptées.

La teneur de cet article a fait l'objet d'une communication présentée à l'IRRDB 1997 Workshop, qui s'est tenu à Ho Chi Minh-Ville, Viêt Nam, du 14 au 15 octobre 1997.

# Les mécanismes biologiques de la production de caoutchouc par *Hevea brasiliensis*

Jacob J.L.<sup>1</sup>, Prévôt J.C.<sup>1</sup>, Lacote R.<sup>2</sup>, Gohet E.<sup>3</sup>, Clément A.<sup>1</sup>, Gallois R.<sup>1</sup>, Joet T.<sup>1</sup>, Pujade-Renaud V.<sup>2</sup>, d'Auzac J.<sup>4</sup>

<sup>1</sup> CIRAD-CP, BP 5035, 34032 Montpellier Cedex 1, France

<sup>2</sup> CIRAD-CP, Faculty of Science, Biotechnology, Rama VI road, Bangkok 10400, Thaïlande

<sup>3</sup> IDEFOR/DPL-CIRAD-CP, 01 BP 1536 Abidjan 01, Côte d'Ivoire

<sup>4</sup> Laboratoire de biotechnologie et de physiologie végétale appliquées, université Montpellier II, 34095 Montpellier Cedex 5, France

**L**a production de latex par *Hevea brasiliensis* met en jeu des mécanismes complexes. Le tissu laticifère, localisé dans le phloème, est constitué par des « manteaux laticifères » concentriques, différenciés par le cambium d'une manière rythmique. Chacun d'eux se transforme très rapidement en système paracirculatoire (d'Auzac *et al.*, 1989). Lorsque l'écorce est sectionnée par la saignée, la pression de turgescence expulse le latex contenu dans les laticifères. Il en résulte un écoulement plus ou moins long qui est stoppé par la coagulation des particules de caoutchouc. Plus l'écoulement est facile et dure longtemps, plus la production de latex est élevée, et *vice versa*.

L'écoulement est donc un facteur limitant de la production. Corrélativement, pour compenser la perte de matériel cellulaire provoquée par la saignée, la régénéra-

tion du latex *in situ* doit être la plus complète possible, avant la saignée suivante.

La régénération apparaît donc très rapidement comme l'autre facteur limitant majeur de la production.

Les mécanismes physiologiques impliqués dans l'écoulement et la régénération ont donc une très forte influence sur le potentiel de production de l'*Hevea brasiliensis*. Il est nécessaire de les connaître pour optimiser la production et proposer aux planteurs une méthodologie d'exploitation la mieux adaptée aux clones et aux conditions de culture.

## L'écoulement du latex lors de la saignée

La problématique qui traite de l'écoulement du latex prend en compte les mécanismes responsables de cet écoulement, et

ceux qui interviennent dans l'arrêt de l'écoulement par la coagulation.

La dynamique de l'écoulement a été analysée à partir des données obtenues par d'Auzac *et al.*, (1989).

La notion d'aire drainée, d'aire de déplacement, la cinétique de l'écoulement, l'influence des paramètres écophysiologiques, ont conduit à mieux cerner les mécanismes de régulation qui jouent un rôle prépondérant.

### Le moteur de l'écoulement

La pression de turgescence dans le phloème et les tissus laticifères est un facteur essentiel de l'écoulement. Il y a une relation forte entre cette pression et l'écoulement du latex lors de la saignée. Une pression de turgescence élevée est nécessaire pour que l'expulsion du latex soit plus efficace. Ainsi, l'influence de l'heure de la saignée s'explique aisément : la fermeture des stomates à la mi-journée, dans des conditions de très fort ensoleillement, ou de forts déficits hydriques, conduit à une diminution des flux hydriques *in situ* ; il en résulte une décroissance de la pression de turgescence et une diminution consécutive de la production (Buttery et Boatman, 1966). La défoliation, les variations écoclimatiques, la disponibilité en eau dans le sol, sont donc autant de causes qui contrôlent la dynamique de l'écoulement et, éventuellement, la limitent.

Un autre paramètre biologique important intervient dans la cinétique de l'écoulement : le transfert de l'eau de l'apoplaste des tissus phloémiques vers les laticifères. Ce transfert est indispensable à l'écoulement. Au cours de la saignée, ce phénomène extrêmement complexe se traduit par la diminution de l'extrait sec (TSC) (Gooding, 1952), signe d'une dilution du latex, à la suite d'une entrée d'eau au niveau de l'aire drainée. Plus ce transfert hydrique sera aisé, plus l'écoulement sera facile, et *vice versa*. Il est évident que ce mécanisme influe sur la pression osmotique intralaticifère et, de ce fait, sur la pression de turgescence. Il met en jeu de nombreux facteurs encore mal connus. En effet, il est probable que les caractéristiques des plasmalemmes liées aux transferts hydriques varient selon les clones. Par ailleurs, ce transfert fait peut-être intervenir des échanges ioniques par l'intermédiaire de canaux spécifiques (i.e. canaux potassiques), des pompes à protons couplées à des transporteurs de molécules hydrocarbonées, comme le saccharose (Bouteau *et al.*, 1993), dont le fonctionnement est susceptible d'agir sur la

pression osmotique *in situ*, et partant, sur l'appel d'eau qu'elle peut provoquer (figure 1). Le fonctionnement de canaux à eau (aquaporines), de type mécanosensible (Lurin et Maurel, 1996), peut également être envisagé. Il faut enfin souligner que ces transferts hydriques semblent en grande partie liés à la disponibilité en énergie biochimique dans les laticifères (Lacrotte, 1991). A cet égard, la stimulation par l'éthylène, qui a pour effet d'activer le métabolisme cellulaire et, notamment, la synthèse du *pool* adénylique (Amalou *et al.*, 1992) augmente aussi sensiblement la vitesse de pénétration de l'eau tritiée, du phloème vers les tissus laticifères, avant même la saignée (Lacrotte, 1991). Ce phénomène est probablement l'un des effets importants du traitement à l'éthylène sur l'écoulement et donc la stimulation de la production.

### Les mécanismes qui stoppent l'écoulement

Les mécanismes qui stoppent l'écoulement sont essentiellement ceux qui conduisent à la coagulation du latex sur l'encoche. Eux aussi ont une forte composante clonale et influent sur la dynamique de la saignée en modifiant le *plugging index*. Celui-ci est défini par Milford (1969) comme le rapport, exprimé en pourcentage, entre la vitesse d'écoulement initiale exprimée en  $\text{ml}^{-1} \text{mn}^{-1}$ , sur le volume de latex total récolté. De nombreuses études sur la coagulation (Gomez, 1983 ; Southorn, 1969) ont mis en évidence deux types de mécanismes.

L'un implique la neutralisation des charges électro-négatives des membranes des particules de caoutchouc qui maintiennent la stabilité colloïdale du latex *in situ*. C'est le cas de différents cations (Southorn, 1969 ; Subroto *et al.*, 1996) ou de protéines cationiques qui se trouvent en quantité importante dans les lutoïdes tels que certaines chitinases et/ou glucanases (Subroto *et al.*, 1996 ; Breton *et al.*, 1995).

L'autre met en jeu l'hévéine, une agglutinine spécifique de l'hévéa capable, en se fixant aux membranes de ces particules et en les reliant les unes aux autres (Gidrol *et al.*, 1994), de former un réseau particulaire (figure 2).

La majorité des éléments impliqués dans les mécanismes de déstabilisation colloïdale du latex sont localisés au sein du système vacuolysosomal : les lutoïdes. La plupart de ces organites, détruits lors de la saignée par les contraintes mécaniques qu'ils subissent au niveau de l'encoche, libèrent leurs facteurs de coagulation qui ralentissent puis stoppent, plus ou moins vite, l'écoulement.

L'éthylène a notamment pour effet de stabiliser les lutoïdes, donc de retarder leur dégradation et d'augmenter la concentration *in situ* des chitinases qui empêchent les fixations de l'hévéine sur les membranes (Chrestin, comm. pers.). Ces effets expliquent, pour une grande part, le retard de la coagulation et, partant, l'augmentation de la production après traitement à l'Ethrel.

## La régénération

La régénération du latex après la saignée implique une activation du métabolisme laticifère *in situ* pour reconstituer tous les éléments cytoplasmiques perdus lors de la saignée. En premier lieu, il s'agit quantitativement des particules de caoutchouc (90 % du poids sec), mais aussi des autres constituants cellulaires des laticifères. Il faut rappeler que ni les noyaux, ni les mitochondries ne sont expulsés durant l'écoulement (Dickenson, 1965), ce qui conserve au tissu laticifère sa capacité de fonctionnement.

Trois facteurs essentiels contrôlent l'activité métabolique des laticifères : l'alimentation en sucre et sa disponibilité *in situ*, les mécanismes de régulation des chaînes métaboliques majeures et, notamment, celles qui rendent compte de la transformation du saccharose en caoutchouc, enfin, la disponibilité en énergie biochimique du système laticigène, indispensable à toutes les fonctions cellulaires.

Par ailleurs, deux autres aspects doivent être pris en considération : les stress oxydatifs induits par les saignées qui sont susceptibles de provoquer la sénescence cellulaire et la perte de la capacité régénérative du latex, les mécanismes biologiques capables de lutter efficacement *in situ* contre ces réactions de dégradation.

### L'alimentation en sucre et sa disponibilité *in situ* dans les laticifères

La molécule initiale et essentielle du fonctionnement laticigène est le saccharose. Elle fournit le carbone de nombreux composés, et notamment du caoutchouc ( $\text{C}_5\text{H}_8$ ) ; mais aussi de l'énergie biochimique nécessaire à la vie cellulaire. De sa teneur dans les laticifères dépend l'activité métabolique potentielle de la régénération du latex et, par conséquent, de la production. Tupy (1973, 1984), puis bien d'autres (d'Auzac *et al.*, 1989), ont confirmé expérimentalement ce point.

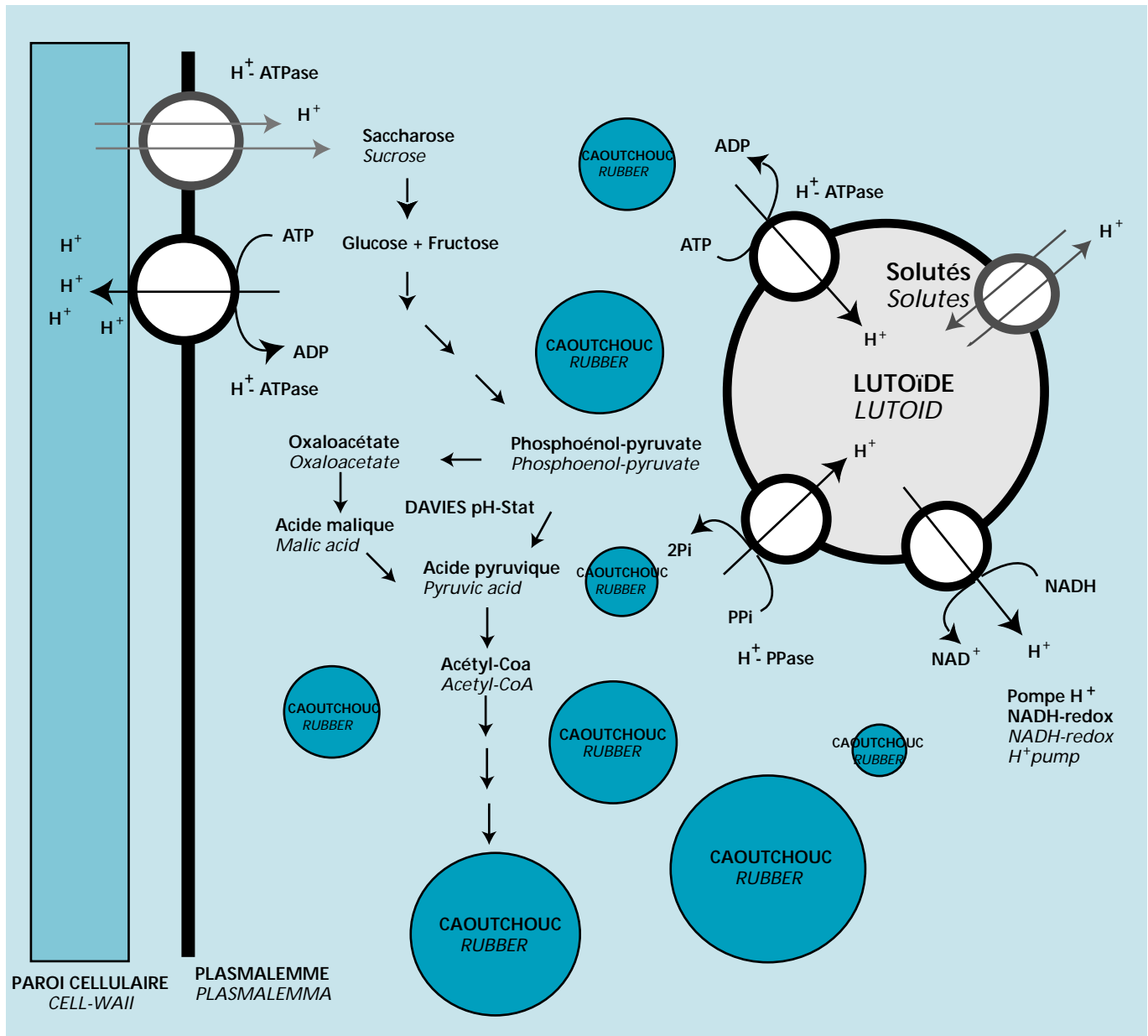


Figure 1. L'homéostasie du pH du latex dans les cellules laticifères. / Homeostasis of latex pH in laticiferous cells.

Les variations de teneur en sucre sont utilisées dans le diagnostic latex pour estimer l'état physiologique de l'hévéa (Jacob *et al*, 1988). Ainsi, la teneur en sucre du latex des arbres surexploités est en quantité insuffisante pour répondre à l'effort de production demandé. Ces variations permettent de déterminer la typologie de fonctionnement des systèmes laticigènes liée à leur origine clonale (Serres *et al*, 1992). Les clones, dont le latex est riche en sucre, possèdent en général un métabolisme lent, qui doit être stimulé pour utiliser efficacement leurs hydrates de carbone dans le cadre de la régénération et *vice versa*.

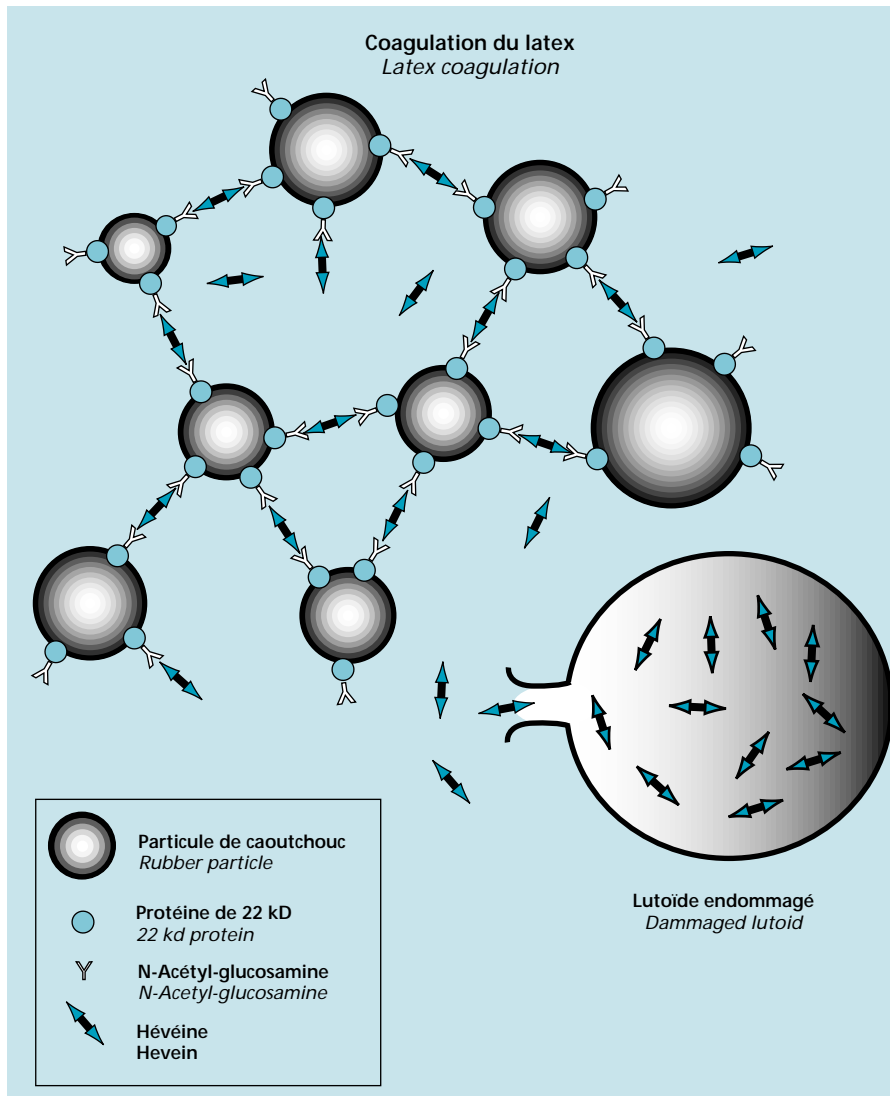
La disponibilité en sucre *in situ* dépend de l'alimentation des laticifères en saccharose et de l'utilisation de celui-ci par le métabolisme laticigène.

#### L'alimentation en sucre des laticifères

Le sucre disponible dans l'apoplaste et susceptible de pénétrer dans le laticifère vient soit du flux hydrocarboné synthétisé par les feuilles et transporté par les tubes criblés, soit des zones de stockage où il s'accumule. Gohet (1996) montre que ces zones de stockage se localisent essentiellement dans le bois jeune ; elles coïncident avec la zone de l'aire drainée par la sai-

gnée. Ce résultat est d'une grande importance puisqu'il permet de penser que la fonction laticigène est un phénomène localisé et n'implique pas les parties du tronc non concernées par la saignée. Cet aspect physiologique, encore peu connu, demande un effort particulier de recherche, notamment dans le cadre de la typologie de fonctionnement des clones, qui est, très probablement, dépendante du statut de ces réserves et des flux hydrocarbonés (figure 1).

La pénétration des sucres dans les laticifères à travers leur plasmalemma est un phénomène complexe qui met en jeu des cotransports couplés H<sup>+</sup>/(saccharose ou



**Figure 2.** L'hypothèse lectine pour la coagulation du latex. / *The lectin hypothesis for latex coagulation.*

Selon l'hypothèse lectine, la coagulation du latex serait contrôlée par au moins quatre protéines, dont deux seraient des facteurs pro-coagulants : l'hévéine, une lectine intralutoïdique et un récepteur d'hévéine glycosylé de 22 Kd localisé sur les particules de caoutchouc.

Les deux autres seraient des facteurs anti-coagulants localisés à l'intérieur des lutoïdes : la chitinase et la N-acétyl-D-glucosaminidase, capables d'éliminer la part glycosylée du récepteur d'hévéine.

*According to the lectin hypothesis, latex coagulation may be under the control of at least four proteins. Two are pro-coagulant factors: hevein, an intra-luteoidic lectin and a 22 kd glycosylated hevein-receptor located on rubber particles. Two are anti-coagulant factors located inside the luteoids: chitinase and N-acetyl-D-glucosaminidase, able to remove the glycosylated moiety of the hevein receptor.*

glucose ou fructose) faisant intervenir des ATPases membranaires et nécessitant de l'énergie biochimique cellulaire (Bouteau *et al.*, 1993 ; Lacrotte, 1991).

### Le métabolisme de régénération du latex et la synthèse polyisoprénique

Le métabolisme laticigène est orienté à 90 % vers la synthèse polyisoprénique. La reconstitution, entre deux saignées, du caoutchouc récolté est une étape limitante de la production. De très nombreux travaux ont été

dié la voie du métabolisme isoprénique (d'Auzac *et al.*, 1989).

Les réactions successives qui partent du saccharose pour arriver à l'élaboration de l'isopentenyl pyrophosphate, monomère des chaînes polyisopréniques, sont maintenant connues. Dans le latex, elles se divisent en deux étapes complémentaires. La première est la glycolyse (figure 3). Elle transforme une molécule de saccharose en pyruvate, qui génère les molécules d'acétate initiatrices de l'anabolisme isoprénique lui-même. La glycolyse produit aussi de l'éner-

gie biochimique sous forme d'adénosine triphosphate (ATP) ou de certains substrats qui, en donnant des acides organiques, sont à l'origine des mécanismes générateurs d'énergie (i.e. cycle de Krebs notamment au sein des mitochondries...) ; elle produit du « pouvoir réducteur » nécessaire à toutes voies de synthèse en régénérant le NAD(P) en NAD(P)H. Il apparaît que le facteur limitant majeur de la glycolyse dans le système laticifère est le fonctionnement de l'invertase, première réaction de cette voie catabolique. Cette enzyme est étroitement contrôlée par le pH du milieu et la teneur en saccharose du latex (Tupy, 1984, 1969 ; Yeang *et al.*, 1986). De l'activité invertasique dépend l'intensité du catabolisme glucidique assurant l'approvisionnement en molécules précurseurs de l'anabolisme isoprénique, mais aussi l'énergie biochimique et le « pouvoir réducteur » nécessaires à la régénération du latex.

La seconde étape correspond à l'anabolisme polyisoprénique qui a été décrit dans son ensemble par Lynen (1969) (figure 4). Il suit la voie mévalonique. La nouvelle voie dite de Röhmer, récemment décrite (Röhmer *et al.*, 1996), s'exprime probablement dans d'autres tissus. Des étapes importantes sont connues qui pourraient jouer, dans certaines conditions, un rôle régulateur. C'est le cas de l'hydroxyméthylglutaryl-CoA réductase (HMG-CoA) (Wittsuwanakul *et al.*, 1988) et peut-être aussi de la farnesyl diphosphate synthase cytosolique qui n'est exprimée *in situ* qu'à partir de l'ouverture des arbres (Adiwilaga et Kush, 1996). Celle-ci élabore le farnesyl diphosphate, de forme *trans*, précurseur initial, avec le geranyl geranyl diphosphate (GGDP), de la longue chaîne en *cis*, construite par un système prennyltransférase associé au *rubber elongation factor* (REF) (Cornish, 1993) ; ce système est localisé dans la membrane des particules de caoutchouc.

Toutefois, dans le tissu laticigène activé par les saignées ou la stimulation éthylénique, la teneur en sucre reste le premier facteur limitant de la production (Jacob *et al.*, 1995) ; il est donc très probable que l'étape invertasique soit le maillon essentiel de l'activité métabolique responsable de la régénération *in situ* et de sa régulation. L'importance du paramètre teneur en saccharose, dans la modélisation de la fonction laticigène, son « poids » dans l'élaboration du diagnostic latex (Jacob *et al.*, 1988) et dans la typologie de fonctionnement des laticifères (Jacob *et al.*, 1995) conforte sinon confirme cette hypothèse.

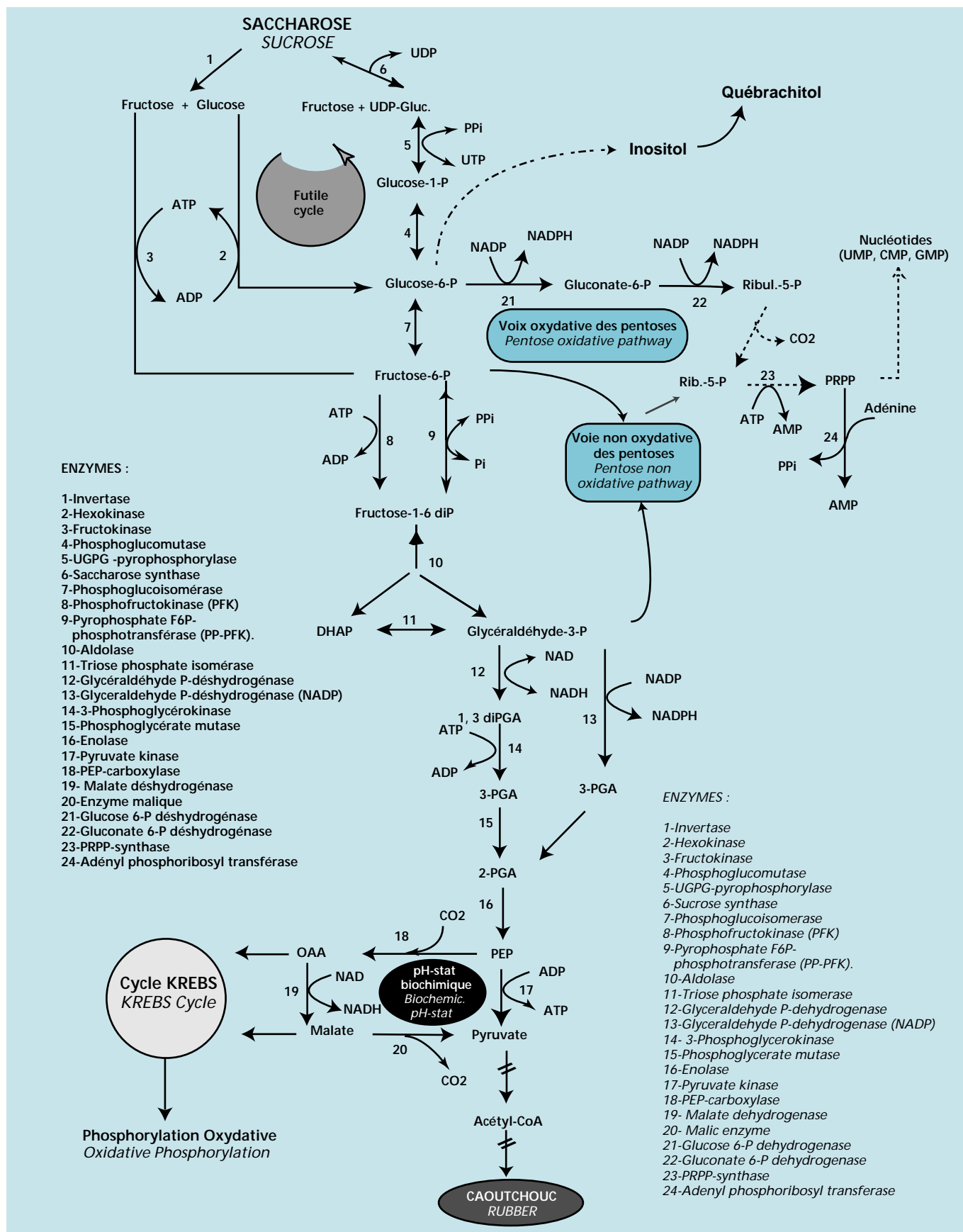


Figure 3. Glycolyse et réactions associées dans le latex d'hévéa./ Glycolysis and related reactions in Hevea latex.

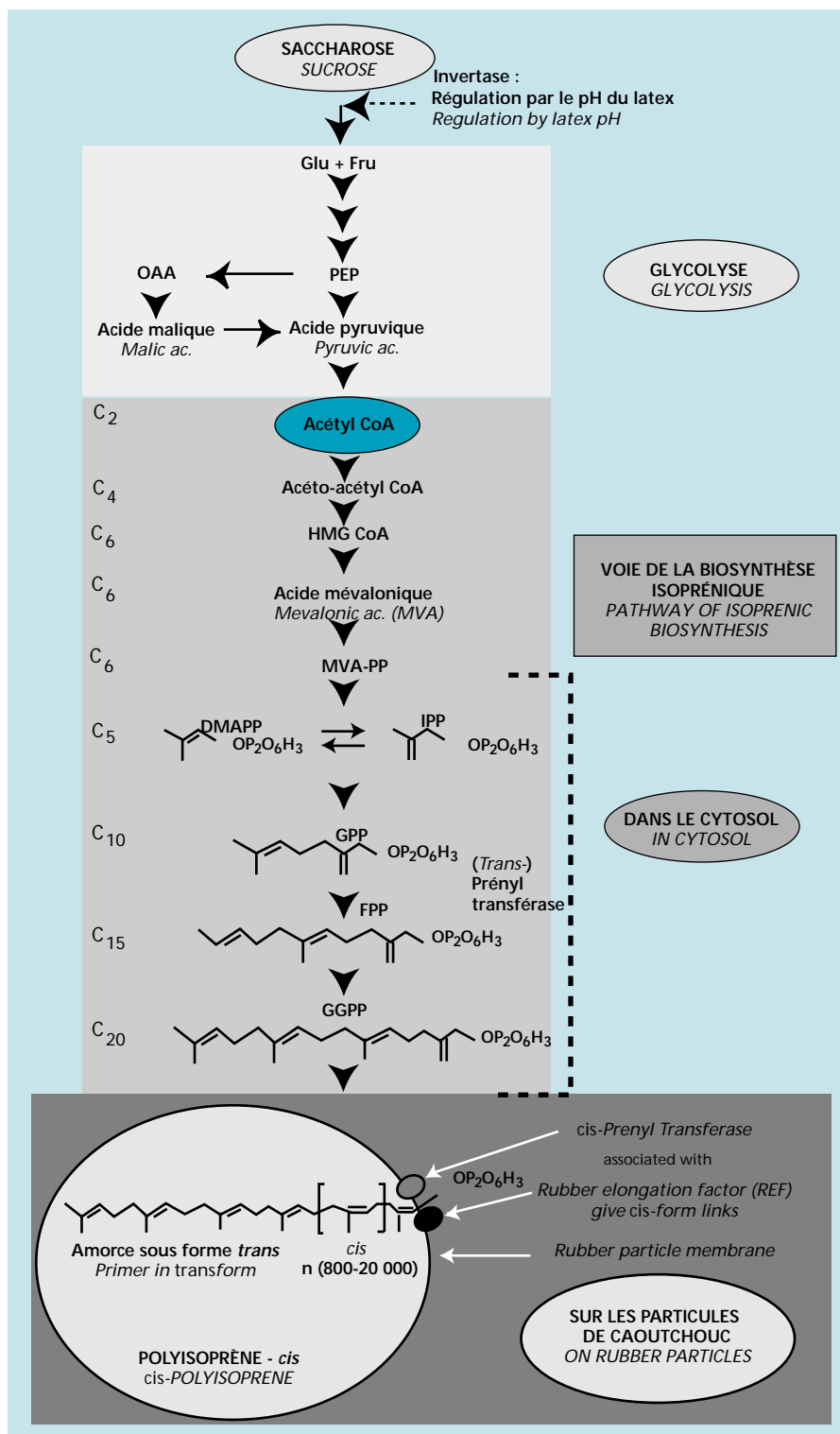


Figure 4. Depuis le saccharose jusqu'au caoutchouc. / From sucrose to rubber.

### L'énergie biochimique, clef du métabolisme de régénération intralaticifère

Tous les mécanismes de biosynthèse nécessitent de l'énergie biochimique dont l'une des formes les plus utilisées implique les

adénylates : adénosine triphosphate (ATP), adénosine diphosphate (ADP), adénosine monophosphate (AMP). La charge énergétique ( $[ATP+1/2 ADP] / [ATP+ADP+AMP]$ ) reflète le statut de l'activité métabolique cellulaire à un moment donné (Atkinson,

1977). Un autre paramètre majeur est la teneur globale en adénylates dont dépend aussi fortement la disponibilité *in situ* de chacune de ses formes (ATP, ADP et AMP).

La régénération du latex *in situ* et, notamment, la synthèse isoprénique, demande beaucoup d'énergie (Templeton, 1982). Il apparaît que les mécanismes biologiques liés à l'écoulement lors de la saignée nécessitent aussi de l'énergie biochimique ; ce phénomène est clairement observé après stimulation éthylénique de l'écorce (Lacrote, 1991). Chez des hévéas saignés à très basses fréquences l'activité laticifère est faible et l'écoulement du latex difficile et de courte durée (Serres *et al.*, 1992).

Des travaux ont montré que des clones métaboliquement très actifs et hauts producteurs avaient effectivement un *pool* adénylique plus important (Chrestin et Bangratz, 1988). La stimulation éthylénique, qui entraîne une surproduction transitoire, induit, avant même la saignée, une augmentation également transitoire de la teneur globale (ATP+ADP+AMP). La régénération du *pool* adénylique et sa régulation sont donc importants à comprendre dans le cadre du modèle biologique du fonctionnement laticifère.

Cette régénération passe par la synthèse de l'AMP qui est, par l'intermédiaire de la myokinase, à l'origine de l'ADP et, partant, de l'ATP. La figure 5 montre les étapes enzymatiques impliquées.

Des recherches récentes dans ce domaine ont mis en évidence l'adénine phosphoribosyltransférase (APRT) et la phosphoribosyl pyrophosphate synthétase (PRS) et précisé certains facteurs de la régulation de leur activité (Gallois *et al.*, 1996, 1997). Ces recherches continuent et devraient permettre de mieux comprendre le volet majeur du fonctionnement cellulaire que représente la disponibilité en énergie biochimique.

### Les mécanismes de sénescence liés aux stress et les systèmes cellulaires de défense qui les combattent

Par définition, la saignée est un stress de blessure et l'exploitation de l'hévéa une technique essentiellement traumatisante pour l'arbre et plus spécialement son écorce.

Jacob *et al.* (1995) ont émis l'hypothèse que les laticifères étaient, par essence, un système de défense contre ce type d'agression, système dont la fonction initiale a été détournée de plus en plus efficacement vers celle de la production de latex. Des méca-

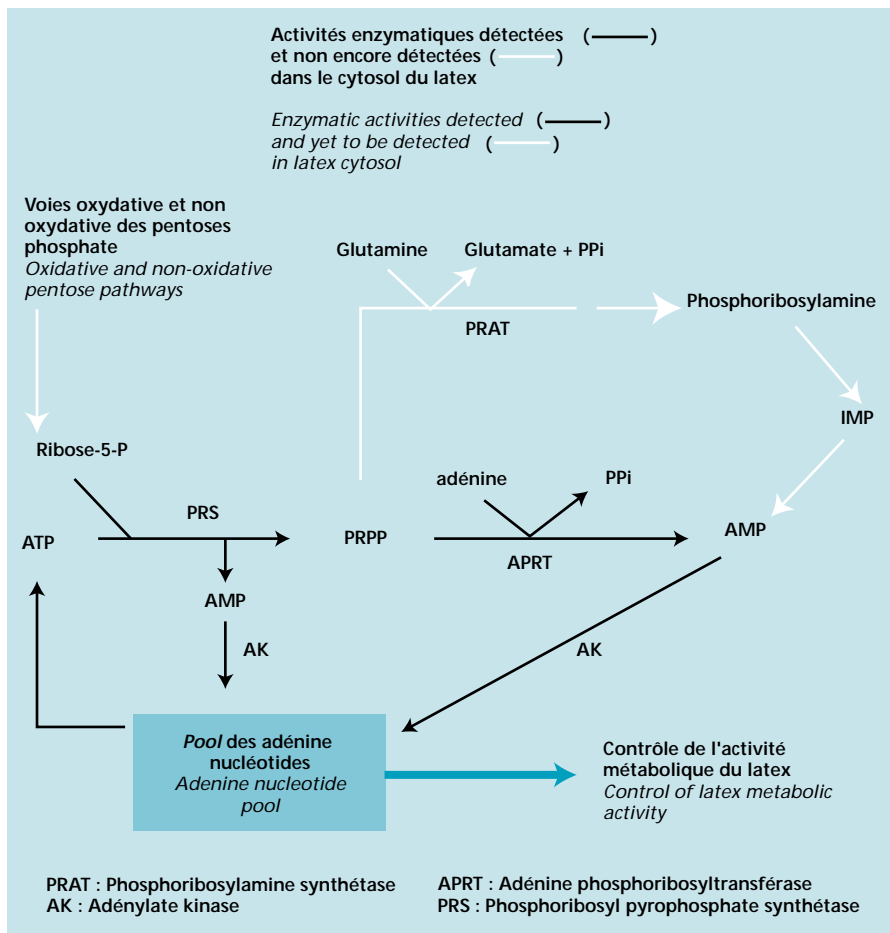


Figure 5. Biosynthèse des adénines nucléotides dans le latex d'hévéa. / Biosynthesis of adenine nucleotides in Hevea latex.

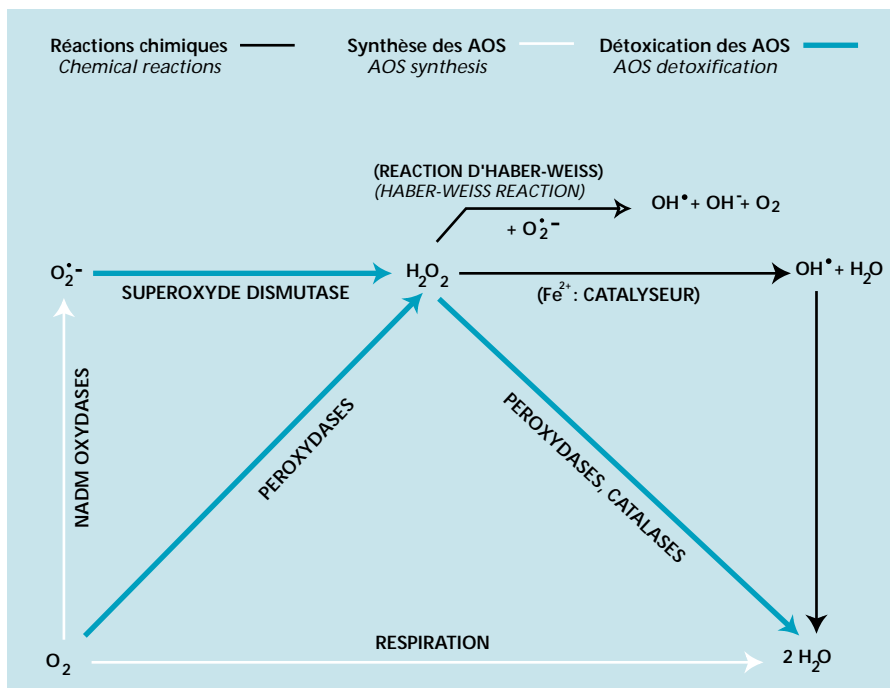


Figure 6. Production et détoxification des active oxygen species (AOS). / Active oxygen species (AOS) production and detoxification.

nismes connus pour être liés au stress sont, avant toute blessure, exprimés dans les laticifères (la chitinase, des peroxydases...). La saignée surexprime l'expression de ces gènes (Prévôt *et al.*, 1996).

Le stress hydrique entraîne également la production de molécules d'active oxygen species (AOS), qui s'avèrent très toxiques par leur effet d'oxydation destructive au niveau des membranes particulières, des protéines et des acides nucléiques. Elles participent généralement à la sénescence cellulaire, animale ou végétale (d'Auzac, 1996).

La figure 6 montre les différents mécanismes aboutissant aux AOS ;  $O_2^-$  est la forme initiale,  $OH^*$  est la moins stable mais la plus agressive et  $H_2O_2$  la plus stable. Il est clair, à ce jour, que ces espèces moléculaires sont impliquées dans la « fatigue » cellulaire d'un arbre surexploité et l'apparition, puis le développement, de l'encoche sèche, signe de la dégénérescence cellulaire des tissus laticifères (Jacob *et al.*, 1994).

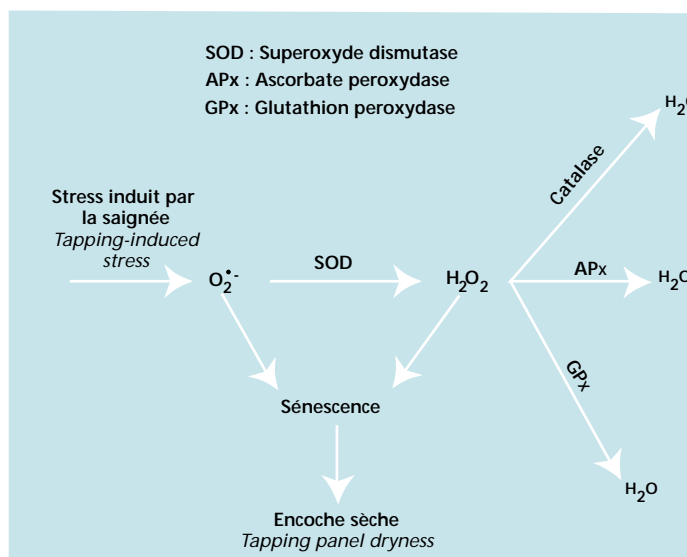
L'examen de ce problème conduit à étudier les deux volets antagonistes qui le composent : les réactions responsables de l'apparition des AOS, les systèmes enzymatiques capables de détoxifier ces molécules et, par conséquent, de lutter contre la sénescence et conserver aux laticifères leur potentialité de fonctionnement. La figure 7 schématise la problématique exposée.

### Production des AOS

La production des AOS met en jeu la génération de  $O_2^-$  (Jacob *et al.*, 1994). Chrestin a mis en évidence que la stimulation éthylénique accélérerait cette production (Chrestin, 1984). Malgré certains travaux sur la NADH *quinone reductase* qui produirait cette molécule toxique et dont la localisation avait été située sur les membranes lutoïdiques (d'Auzac *et al.*, 1986), il reste beaucoup à comprendre et à connaître des mécanismes impliqués dans ce domaine et de leur régulation. Des travaux sont, d'ailleurs, en cours dans ce sens, qui montrent la présence d'activités NADH *quinone acceptors oxydoreductase* dans le sérum lutoïque et le cytosol (Prévôt, comm. pers.).

### Détoxification des AOS

La détoxification des AOS est capitale puisqu'elle aide la cellule à conserver son intégrité compartimentale et, par conséquent, sa potentialité de fonctionnement. Si cette détoxification peut être très partiellement



**Figure 7.** Production des active oxygen species (AOS) et leur détoxification dans le latex d'hévéa. / AOS production and detoxification in Hevea latex.

de type chimique, elle est majoritairement de nature enzymatique (figure 7).

L'analyse des antioxydants impliqués dans cette détoxification montre l'importance de certaines molécules telles que les R-SH. La teneur en R-SH est d'ailleurs un paramètre majeur du diagnostic latex (Jacob *et al.*, 1988) car il reflète, en partie, la capacité des laticifères à se protéger des AOS.

L'étude des R-SH révèle qu'ils sont constitués pour la plus grande part, de glutathion (60 %) et de cystéine (Archer *et al.*, 1969 ; Clément, comm. pers.).

L'ascorbate, dont la teneur cytosolique se situe entre 3 et 10 mM (Archer *et al.*, 1969 ; Prévôt, comm. pers.) participe également à la détoxification des AOS.

D'autres phénols non encore définis *in situ* sont aussi probablement impliqués dans ces mécanismes d'oxydo-réduction complexes mis en jeu.

La transformation de  $O_2^{\cdot-}$ , molécule très agressive, en  $H_2O_2$  encore très toxique mais plus stable, est le fait de la superoxyde dismutase (SOD). Cette enzyme, maintenant bien connue dans le monde animal et végétal, a été mise en évidence dans le latex. Par des techniques de biologie moléculaire, il a été possible de montrer la présence d'un gène SOD à manganèse (Mn-SOD), localisé dans les mitochondries. Ce gène est surexprimé dans le latex sous l'effet de l'éthylène (Miao et Gaynor, 1993).

D'autres travaux portent sur les peroxydases assez spécifiques, qui sont capables de détoxifier  $H_2O_2$ . C'est le cas de l'ascorbate peroxydase (Dubois, 1996), qui apparaît comme une « house keeping enzyme ». Elle est fonctionnelle *in situ* et son affinité pour  $H_2O_2$  est relativement forte : 15  $\mu$ M.

C'est aussi le cas de la glutathion peroxydase, dont l'expression, si elle semble

peu ou pas dépendante de la stimulation éthylénique, s'avère étroitement liée à l'intensité de l'activité métabolique du système laticifère. Son affinité pour  $H_2O_2$  est très élevée : 5  $\mu$ M, et son activité est contrôlée par la disponibilité en glutathion (GSH) du cytosol (Dubois, 1996).

Ces deux enzymes cytosoliques présentent une forte complémentarité dans les mécanismes de détoxification de  $H_2O_2$ .

Le cas de la catalase qui devrait aussi s'avérer un système complémentaire des précédents et encore plus puissant, n'est pas encore clarifié. Sa mise en évidence, rapportée par certains chercheurs (d'Auzac, 1996) n'a pas été confirmée par d'autres travaillant dans des conditions différentes (Prévôt et Jacob, comm. pers.). Ces divergences peuvent, peut-être, trouver leur origine dans la variabilité des clones utilisés, une induction éthylénique préalable nécessaire pour que l'activité catalase s'exprime au sein du latex, ou une très grande labilité de l'enzyme.

## Conclusion

Il apparaît nettement que l'effort de recherche dans ce vaste domaine des mécanismes biologiques de la production de latex par *Hevea brasiliensis* doit se poursuivre, pour mieux cerner l'impact des antagonismes impliqués et définir une stratégie capable de favoriser l'exploitation de l'arbre. Cet itinéraire s'inscrit parfaitement dans l'amélioration du potentiel de production de l'hévéa. ■

## Bibliographie / References

- ADIWILAGA K., KUSH A., 1996. Cloning and characterization of a DNA encoding farnesyl diphosphate synthase from rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *Plant. Mol. Biol.* 30 : 935-946.
- AMALOU Z., BANGRATZ J., CHRESTIN H., 1992. Ethrel (ethylene releaser) induced increases in the adenylate pool and transtonoplast  $\Delta$  pH within *Hevea* latex cells. *Plant Physiol.* 98 : 1270-1276.
- ARCHER B.L., AUDLEY B.G., MC SWEENEY G.P., TAN C.H., 1969. Studies on composition of latex serum and bottom fraction particles. *J. Rubber Res. Inst. Malays.* 21 : 560-569.
- ATKINSON D.E., 1977. Cellular energy metabolism and its regulation. New York, Etats-Unis, Academic Press, 293 p.
- BOUTEAU F., PERINO C., CORNEL D., RONA J.P., 1993. Sugar absorption and potassium channels in protoplasts of *Hevea brasiliensis* vessels. *Bioelectrochem. and Bioenerg.* 31 : 215-228.
- BRETON F., COUPE M., SANIER C., D'AUZAC J., 1995. Demonstration of  $\beta$ -1,3-glucanase activities in laticifers of *Hevea brasiliensis* latex. *J. Nat. Rubber Res.* 10 : 37-45.
- BUTTERY B.R., BOATMAN S.G., 1966. Manometric measurement of turgor pressure in laticiferous phloem tissues. *J. Exp. Bot.* 17 : 283-296.
- CHRESTIN H., 1984. Le compartiment vacuo-lysosomal (les lutoïdes) du latex d'*Hevea brasiliensis*, son rôle dans le maintien de l'homéostasie et dans les processus de sénescence des cellules laticifères. Thèse de doctorat d'Etat, université Montpellier II, France, 575 p.



- CHRESTIN H., BANGRAZ J., 1988. Adenine nucleotides and energy charge in the latex from *Hevea brasiliensis*: clonal characteristics relations with yield and sensitivity towards bark dryness. Effects of yield stimulation with Ethrel. *In* : Colloque exploitation-physiologie et amélioration de l'hévéa. Paris, France, 2-7 novembre 1988. Montpellier, France, Cirad-Irca, p. 547-562.
- CORNISH K., 1993. The separate roles of plant *cis*- and trans-prenyltransferases in *cis*-1,4-polyisoprene biosynthesis. *Eur. J. Biochem.* 218 : 267-271.
- DICKENSON P.B., 1965. The ultrastructure of vessel of *Hevea brasiliensis*. *In* : Natural Rubber Production Research Association Jubilee Conference, Cambridge, 1964. Londres, Grande-Bretagne, Mc Laren and Sons Ltd, p. 55-56.
- D'AUZAC J., 1989. Tapping systems and area of drained bark. *In* : Physiology of rubber tree latex, J. d'Auzac, J.L. Jacob, H. Chrestin éd., Boca Raton, Etats-Unis, CRC Press, p. 221-232.
- D'AUZAC J., 1996. L'oxygène toxique : une défense contre les pathogènes végétaux. *Plant. Rech. Dév.* 3 (3) : 153-170.
- D'AUZAC J., JACOB J.L., CHRESTIN H., 1989. Physiology of rubber tree latex. Boca Raton, Etats-Unis, CRC Press, 470 p.
- D'AUZAC J., SANIER C., CHRESTIN H., 1986. Study of a NADH quinone reductase producing toxic oxygen from *Hevea* latex. International Rubber Conference, vol. 3. Kuala Lumpur, Malaisie, RRM, p. 102-113.
- DUBOIS V., 1996. Mise en évidence d'une ascorbate peroxydase cytosolique au sein du latex d'*Hevea brasiliensis*. DEA, université Montpellier II, 15 p.
- GALLOIS R., PRÉVOT J.C., CLÉMENT A., JACOB J.L., 1996. Purification and characterization of an adenine phosphoribosyltransferase from rubber tree latex. *Physiological implications.* *Plant Physiol. Biochem.* 34 : 527-537.
- GALLOIS R., PRÉVOT J.C., CLÉMENT A., JACOB J.L., 1997. Purification and characterization of phosphoribosylphosphate synthase from rubber tree latex. *Plant. Physiol.* 115 : 847-852.
- GIDROL X., CHRESTIN H., TAN H.L., KUSH A., 1994. Hevein, a lectin protein from *Hevea brasiliensis* (rubber tree) is involved in the coagulation of latex. *J. Biol. Chem.* 269 : 9278-9283.
- GOHET E., 1996. La production de latex par l'*Hevea brasiliensis*. Relations avec la croissance. Influence de différents facteurs : origine clonale, stimulation hormonale, réserves hydrocarbonées. Thèse, université Montpellier II, France, 343 p.
- GOMEZ J.B., 1983. Physiology of latex (rubber) production. Kuala Lumpur, Malaisie, IRRDB Monography n° 8, 65 p.
- GOODING E.G.B., 1952. Studies in the physiology of latex II. Latex flow in tapping *Hevea brasiliensis* associated changes in trunk diameter and latex concentration. *New Phytol.* 51 : 11-19.
- JACOB J.L., PRÉVOT J.C., CLÉMENT A., GOHET E., GALLOIS R., NICOLAS D., 1995. La production de latex (caoutchouc naturel) par l'*Hevea brasiliensis* : exploitation d'un système de défense chez un arbre, 3ème Congrès international sur l'arbre, Montpellier, 11-16 septembre 1995. *In* : *Naturalia Monspeliensia*, hors série, 19 p. (sous presse).
- JACOB J.L., PRÉVOT J.C., LACROTTE R., 1994. L'encoche sèche chez l'*Hevea brasiliensis*. *Plant. Rech. Dév.* 1 (3) : 15-24.
- JACOB J.L., PRÉVOT J.C., LACROTTE R., CLÉMENT A., SERRES E., GOHET E., 1995. Typologie clonale du fonctionnement des laticifères chez *Hevea brasiliensis*. *Plant. Rech. Dév.* 2 (5) : 43-49.
- JACOB J.L., SERRES E., PRÉVOT J.C., LACROTTE R., CLÉMENT A., ESCHBACH J.M., D'AUZAC J., 1988. Mise au point du diagnostic latex chez l'*Hevea*. *Agritrop* 12 (2) : 97-113.
- LACROTTE R., 1991. Etude des relations entre la teneur en sucre du latex et la production. Approches des mécanismes du changement en saccharose des laticifères d'*Hevea brasiliensis* Muell. Arg. Thèse de doctorat, université Montpellier II, 266 p.
- LURIN C., MAUREL C., 1996. Aquaporines et canaux anioniques : leur rôle dans l'osmorégulation cellulaire. Colloque physiologie végétale, Poitiers, 24 mai 1996. Paris, France, Société française de physiologie végétale, p. 7.
- LYNEN F., 1969. Biochemical problem of rubber biosynthesis. *J. Rubb. Res. Inst. Malaya* 21 : 389-406.
- MIAO Z., GAYNOR J.J., 1993. Molecular cloning characterization and expression of Mn-Superoxide dismutase from the rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *Plant Mol. Biol.* 23 : 267.
- MILFORD G.F., PAARDEKOOPER E.C., YEE H., 1969. Latex vessel plugging, its importance to yield and clonal behaviour. *J. Rubber Res. Inst. Malays.* 21 : 274-282.
- PAKIANATHAN S.W., HARIDAS G., D'AUZAC J., 1989. Water relation and latex flow, *In* : Physiology of rubber tree latex, J. d'Auzac, J.L. Jacob, H. Chrestin éd., Boca Raton, Etats-Unis, CRC Press, p. 233-256.
- PRÉVOT J.C., KADIO L., CLÉMENT A., DUBOIS V., GALLOIS R., JACOB J.L., 1996. Comparison between cytosol and luteoids (vacuoliposomal compartment) peroxidase activities from *Hevea brasiliensis* latex. Influence of an ethylene generator on the cytosol activity. International Symposium on plant peroxidase biochemistry and physiology, Vienne, 6-10 juillet 1996. Vienne, Suisse, université d'agriculture, PB 35.
- RÖHMER M., SEEMANN M., HORBACHS, BRINGER-MEYER S., SAHM H., 1996. Glyceraldehyde 3-phosphate and pyruvate as precursors of isoprenic units in an alternative non mevalonate pathway for terpenoids biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* 118 : 2564-2566.
- SERRES E., LACROTTE R., PRÉVOT J.C., CLÉMENT A., COMMERE J., JACOB J.L., 1992. Metabolic aspects of latex regeneration *in situ* for three *Hevea brasiliensis* clones : PB 235, PB 217 and GT 1. *Indian Rubber J.* 7 : 79-88.
- SOUTHORN W.A., 1969. Physiology of *Hevea* latex flow. *J. Rubber Res. Inst. Malays.* 21 : 494-512.
- SUBROTO T., VAN KONINGWELD A., SCHREUDER A., SOEDJANAATMADIA U.S.M., BENTEIMA J.J., 1996. Chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase in the luteoid body reaction of *Hevea* latex. *Phytochemistry* 43 : 29-37.
- TEMPLETON J.K., 1982. Partition of assimilates. *Plant Physiol.* 36 : 259-263.
- TUPY J., 1973. The level and distribution pattern of latex sucrose along the trunk of *Hevea brasiliensis* as affected the sink region induced by latex tapping. *Physiol. Vég.* 11 : 1-11.
- TUPY J., 1973. The activity of latex invertase and latex production of *Hevea brasiliensis*. *Physiol. Vég.* 11 : 633-641.
- TUPY J., 1984. Translocation, utilization and availability of sucrose for latex production in *Hevea*. *In* : Colloque exploitation-physiologie et amélioration de l'hévéa, Montpellier, France, 9-12 juillet 1984. Paris, France, IRCA-GERDAT, p. 135-153.
- WITTTSUWANNAKUL R., WITTTSUWANNAKUL D., SUKORAT W., CHOTEPHIPHATWORAKUL W., 1988. 3-hydroxy-3-methylglutanyl coenzyme A reductase from latex of *Hevea brasiliensis*. *In* : IRRDB rubber physiology and exploitation meeting, Hainan, Chine, 9-12 décembre 1986. Hainan, Chine, South China Academy of Tropical Crops, p. 47-58.
- YEANG H.Y., JACOB J.L., PRÉVOT J.C., VIDAL A., 1986. Invertase activity in *Hevea* latex serum : interaction between pH and serum concentration. *J. Nat. Rubber Res.* 1 : 16-23.

# The biological mechanisms controlling *Hevea brasiliensis* rubber yield

Jacob J.L.<sup>1</sup>, Prévôt J.C.<sup>1</sup>, Lacote R.<sup>2</sup>, Gohet E.<sup>3</sup>, Clément A.<sup>1</sup>, Gallois R.<sup>1</sup>, Joet T.<sup>1</sup>, Pujade-Renaud V.<sup>2</sup>, D'Auzac J.<sup>4</sup>

<sup>1</sup> CIRAD-CP, BP 5035, 34032 Montpellier Cedex 1, France

<sup>2</sup> CIRAD-CP, Faculty of Science, Biotechnology, Rama VI road, Bangkok 10400, Thailand

<sup>3</sup> IDEFOR/DPL-CIRAD-CP, 01 BP 1536 Abidjan 01, Côte d'Ivoire

<sup>4</sup> Laboratoire de biotechnologie et de physiologie végétale appliquées, Université Montpellier 2, 34095 Montpellier Cedex 5, France

In *Hevea*, a veritable rubber factory, two main biological mechanisms regulate production: latex regeneration after tapping and its flow. It is necessary to have a clear understanding of these two limiting factors in order to optimize yields and propose the most appropriate tapping methods to growers.

Latex production by *Hevea brasiliensis* involves complex mechanisms. The latex-bearing tissue is located in the phloem. It consists of concentric laticifer rings, rhythmically differentiated by the cambium. Each of them very rapidly becomes a paracirculatory system (d'Auzac *et al.*, 1989). When the bark is incised by tapping, turgor pressure expels the latex contained in the laticifers, resulting in flow that lasts for varying lengths of time and is halted by the coagulation of rubber particles. The easier and longer the latex flow, the higher the latex yield, and conversely.

Flow is therefore a basic production limiting factor. Correlatively, *in situ* latex regeneration has to be as complete as possible, in order to compensate for the loss of cell material caused by tapping before the next tapping operation.

Regeneration very rapidly appears as the other major production-limiting factor.

The physiological mechanisms involved in flow and regeneration control therefore have a very strong influence on the production potential of *Hevea brasiliensis*. Knowledge of them is essential for optimizing yields and proposing to growers the most appropriate tapping methods for the clones and cultivation conditions involved.

## Latex flow during tapping

When considering latex flow during tapping, it is necessary to consider both the mechanisms responsible for flow and those that halt flow through coagulation.

Flow dynamics have been analysed using data obtained by d'Auzac *et al.* (1989).

The concepts of a drained area, a displacement area, flow kinetics and the effect of ecophysiological factors have provided a clearer picture of the regulatory mechanisms that play a predominant role.

## The flow motor

The turgor pressure in the phloem and laticifer tissues is an essential factor of flow. There is a direct relation between that pressure and latex flow during tapping. High turgor pressure is needed for latex expulsion to be more efficient. In this context, the effect of the time of day at which tapping takes place is easily explained: stomatal closure at midday, in bright sunlight, or with high water deficits, reduces water flow *in situ*, causing a drop in turgor pressure and a reduction in yield (Buttery and Boatman, 1966). Defoliation, ecoclimatic variations and water availability in the soil are all causes that control, and can limit flow dynamics.

Another major biological factor is involved in flow kinetics: water transfer from the apoplast of phloem tissues to the laticifers. Such transfer is essential to flow. This extremely complex phenomenon results in a drop in dry extract (TSC) during tapping (Gooding, 1952), indicating dilution of the latex, following an intake of water in the drained area. The easier the water transfer, the easier the latex flow, and conversely. It is clear that this mechanism affects osmotic pressure within the laticifers, hence turgor pressure. It brings into play numerous factors about which little is known. Indeed, the plasmalemma characteristics linked to water transfers probably vary depending on the clones. It may also involve ionic exchanges via specific channels (i.e. potassium channels), proton pumps coupled to carbohydrate molecule transporters, such as sucrose (Bouteau *et al.*, 1993), whose functioning is likely to act on *in situ* osmotic pressure, starting with the water intake it can cause (figure 1). Mechano-sensitive type water channels, (aquaporines) (Lurin and Maurel, 1996), may also be involved. Lastly, it needs to be pointed out that these water transfers seem to be largely linked to biochemical energy availability in the laticifers (Lacrotte, 1991). In this respect, ethylene stimulation, which activates cell metabolism, particularly adenylic pool synthesis (Amalou *et*

*al.*, 1992), also substantially increases the penetration speed of tritiated water from the phloem to the laticifer tissues, even before tapping (Lacrotte, 1991). This is probably one of the major effects of ethylene treatment on flow, hence on yield stimulation.

## Mechanisms that halt flow

The mechanisms that halt flow are primarily those that cause latex coagulation on the tapping panel. These too vary very much according to the clones and affect tapping dynamics by modifying the plugging index, defined by Milford *et al.* (1969) as being the ratio, expressed as a percentage, of the initial flow rate, expressed in  $\text{ml}^{-1} \text{min}^{-1}$ , to the total volume of latex collected. Numerous studies on coagulation mechanisms (Gomez, 1983; Southorn, 1969) have revealed two types of mechanisms.

One involves neutralization of the electronegative charges of rubber particle membranes, which maintain colloidal stability in the latex *in situ*. This is the case of different cations (Southorn, 1969; Subroto *et al.*, 1990) or cationic proteins which are found in large quantities in lutoids such as certain chitinases and/or glucanases (Subroto *et al.*, 1996; Breton *et al.*, 1995).

The other involves a *Hevea*-specific agglutinin, hevein, which is capable of forming a special network by fixing itself to the membranes of these particles and linking them to each other (Gidrol *et al.*, 1994) (figure 2).

Most of the elements involved in latex colloidal destabilization mechanisms are located within the vacuolysosomal system: the lutoids. Most of these organelles, which are destroyed during tapping by the physical stress they undergo at cut level, release their coagulation factors that eventually halt flow.

Ethylene primarily stabilizes the lutoids and delays their degradation, increases the *in situ* concentration of chitinases, which prevent hevein fixation on the membranes (Chrestin, pers. comm.). These effects largely explain the

The content of this article was covered in a paper presented at the IRRDB 1997 Workshop, held in Ho Chi Minh-City, Viet Nam, from 14th to 15th October 1997.

delayed coagulation and therefore the increase in yield after Ethrel treatment.

### Regeneration

Latex regeneration after tapping involves activation of the *in situ* laticifer metabolism for renewal of all the cytoplasmic elements lost during tapping. Firstly, this quantitatively means the rubber particles (90% of dry weight), but also the other cell constituents of the laticifers. It should be remembered that neither nuclei nor mitochondria are expelled during flow (Dickenson, 1965), meaning that laticifer tissue retains its ability to function.

Three essential factors control the metabolic activity of laticifers: sugar supply and *in situ* availability, mechanisms regulating major metabolic chains, particularly those concerning sucrose conversion into rubber, and lastly biochemical energy availability within the latex-bearing system, which are essential for all cell functions.

Another aspect must be taken into consideration: on the one hand, the oxidative stress processes induced by tapping which are likely to lead to cellular senescence and loss of latex regeneration capacity; on the other hand, the biological mechanisms capable of effectively controlling these degradative reactions *in situ*.

### Sugar supply and *in situ* availability in laticifers

The essential initial molecule for latex generation functioning is sucrose. It provides the carbon of numerous compounds, notably rubber (C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>), and also the biochemical energy required for cell life. Potential metabolic activity linked to latex regeneration, hence yield, depends on laticifer sucrose content. Tupy (1973, 1984), then many others (d'Auzac *et al.*, 1989) confirmed this point experimentally.

Variations in sugar content are used in latex diagnosis to estimate the physiological condition of rubber trees (Jacob *et al.*, 1988). For instance, the latex sugar content of over-tapped trees is too small to meet the production effort required. These variations also indicate the functioning typology of latex-bearing systems according to their clonal origin (Serres *et al.*, 1992). The metabolism of clones with sugar-rich latex is usually slow and requires stimulation to ensure effective use of its carbohydrates for regeneration, and *vice versa*.

*In situ* sugar availability depends on sucrose supplies to the laticifers and on sucrose utilization by the latex generating metabolism.

### Sugar supply to the laticifers

Sugar that is available in the apoplast and that is likely to penetrate the laticifers is derived either from the flow of carbohydrate synthesized by the

leaves and conveyed via the sieve tubes, or from storage zones where it accumulates. Gohet (1996) showed that the storage zones are mostly located in young wood, corresponding to the area drained during tapping. This is a very important finding, since it suggests that the latex generating function is a localized phenomenon and does not concern parts of the trunk not directly involved in tapping. This, as yet, little understood physiological aspect requires a special research effort, particularly as regards the functioning typology of different clones, which is very probably closely linked to the status of these reserves and carbohydrate flow.

The influx of carbohydrates into the laticifers through their plasmalemma is a complex phenomenon which involves H<sup>+</sup> (sucrose or glucose or fructose) coupled cotransports, bringing into play membrane ATPases requiring cellular biochemical energy (Bouteau *et al.*, 1993; Lacrotte, 1991).

### Latex regeneration metabolism and polyisoprene synthesis

Ninety percent of the latex generation metabolism is geared towards polyisoprene synthesis. Renewal of the rubber lost during tapping before the next tapping operation is a yield limiting factor. The isoprene metabolism pathway has been the subject of a great number of studies (d'Auzac *et al.*, 1989).

The successive reactions that begin with sucrose and end with the elaboration of isopentenyl pyrophosphate, the monomer of the polyisoprene chains, are now known. In latex, they can be divided into two complementary stages. The first is glycolysis (figure 3). It converts sucrose molecules into pyruvate, enabling the generation of acetate molecules, which initiate actual isoprene anabolism. Glycolysis also provides biochemical energy in the form of adenosine triphosphate (ATP) or certain substrates, which are the basis of energy generating mechanisms (i.e. the Krebs cycle notably within the mitochondria, etc.), and the reducing "power" necessary for all synthesis pathways by NAD(P) regeneration into NAD(P)H. It would seem that the main factor limiting glycolysis in the laticifer system is invertase functioning, the initial reaction of this catabolic pathway. The enzyme is closely controlled by the pH of the medium and the latex sugar content (Tupy, 1984, 1969; Yeang *et al.*, 1986). Carbohydrate catabolism intensity, hence the supply of molecules that are precursors of isoprene anabolism, and also the biochemical energy and the resulting reducing "power", which are necessary for latex regeneration, depend on invertase activity.

The second stage, polyisoprene anabolism, has been described in its entirety by Lynen (1969)

(figure 4). It follows the mevalonic pathway. The new so-called Röhmer pathway, described recently (Röhmer *et al.*, 1986) is probably expressed in other tissues. Major stages are known which could play a regulatory role under certain conditions. This is the case with hydroxymethylglutaryl-CoA reductase (HMG-CoA) (Wititsuwannakul *et al.*, 1988), and maybe also cytosolic farnesyl diphosphate synthase, which is expressed in the laticifers only after the rubber tree opening (Adiwilaga and Kush, 1996). This enzyme elaborates farnesyl diphosphate, in *trans* form, which is an initial precursor, along with geranyl geranyl diphosphate (GGPD), of the long *cis* chain constructed by a prenyltransferase system associated with rubber elongation factor (REF) (Cornish, 1993); this system is located in the membrane of rubber particles.

Be that as it may, in latex generating tissues activated by tapping or ethylene stimulation, the sugar content remains the main factor that limits yield (Jacob *et al.*, 1995); the invertase stage is therefore probably the essential link in the metabolic activity responsible for *in situ* regeneration and its regulation. The importance of the sucrose factor for modelling the latex generation function, its influence in latex diagnosis (Jacob *et al.*, 1988) and in the typology of laticifer functioning (Jacob *et al.*, 1995) back up, if not confirm, this hypothesis.

### Biochemical energy, the key to the metabolism of latex regeneration in laticifers

All biological synthesis mechanisms require biochemical energy, one of the most used forms of which involves adenylates: adenosine triphosphate (ATP), adenosine diphosphate (ADP) and adenosine monophosphate (AMP). The energy charge ( $[ATP+1/2 ADP]/[ATP+ADP+AMP]$ ) reflects the status of cellular metabolic activity at any given moment (Atkinson, 1977). Another major parameter is the overall adenylate content, on which its *in situ* availability in each of its forms (ATP, ADP and AMP) also strongly depends.

*In situ* latex renewal, especially isoprene synthesis, requires a great deal of energy (Templeton, 1982). It seems that the biological mechanisms linked to flow during tapping also require biochemical energy; this situation is clearly seen after ethylene stimulation of *Hevea* bark (Lacrotte, 1991). In rubber trees tapped at very low frequencies, the latex generating activity is low and latex flow difficult and short-lived (Serres *et al.*, 1992).

Various authors have shown that metabolically highly active and high-yielding clones effectively have a larger adenylate pool (Chrestin and Bangratz, 1988). Ethylene stimulation, which leads to temporary over-production, also temporarily increases the

overall content (ATP+ADP+AMP) even before tapping. It is therefore important to understand adenylic pool regeneration and its regulation when modelling the latex generation function.

Such regeneration involves the synthesis of AMP, from which the ADP and consequently the ATP produced are derived, via myokinase. Figure 5 shows the enzymatic stages involved.

Research in this field has recently revealed the presence of adenine phosphoribosyltransferase (APRT) and phosphoribosyl pyrophosphate synthetase (PRS) in *Hevea* latex cytosol and determined certain factors involved in their regulation (Gallois *et al.*, 1996, 1997). The research is continuing and should provide a clearer understanding of the major aspect of cell functioning represented by biochemical energy availability.

### Senescence mechanisms linked to stress and cell defence mechanisms that fight them

By definition, tapping is a form of stress caused by wounding and *Hevea* exploitation is an essentially traumatic technique for the tree, particularly the bark.

Jacob *et al.* (1995) put forward the hypothesis that laticifers were, by their very essence, a defence system against that type of aggression, a system whose initial function has been increasingly effectively turned towards latex production. Mechanisms known to be linked to stress are expressed in laticifers (i.e. chitinase, peroxidases, etc.) before any wounding. Tapping exaggerates the expression of these genes (Prévôt *et al.*, 1996).

Water stress also triggers the production of active oxygen species (AOS) molecules, which prove to be highly toxic through their destructive oxidation in particular membranes, proteins and nucleic acids. They are very widely involved in animal or plant cell senescence (d'Auzac, 1996).

Figure 6 shows the different mechanisms leading to AOS;  $O_2^{\cdot-}$  is the initial form,  $OH^{\cdot}$  is the least stable but the most aggressive, and  $H_2O_2$  is the most stable. It is now clear that these molecular species are involved in cellular *fatigue* in an over-tapped tree and the appearance, then development, of tapping panel dryness, a sign of the cellular degeneration of latex-bearing tissues (Jacob *et al.*, 1994).

An examination of this problem involves studying its two antagonistic aspects: the reactions responsible for the appearance of AOS, and the enzyme systems capable of detoxifying these molecules and consequently controlling senescence and maintaining the functioning potential of the laticifers. Figure 7 gives a diagrammatic representation of the problems evoked.

### AOS production

AOS production involves  $O_2^{\cdot-}$  generation (Jacob *et al.*, 1994). Chrestin discovered that ethylene stimulation accelerated their production (Chrestin, 1984). Despite a certain amount of work on NADH quinone reductase which would appear to produce this toxic molecule, and was found to be located on lutoid membranes (d'Auzac *et al.*, 1986), there remains much to learn and understand about the mechanisms involved in this field, and their regulation. Moreover, the work already under way shows that NADH quinone acceptors oxydoreductases are present in the cytosol and the lutoidic serum (Prévôt, pers. comm.).

### AOS detoxification

AOS detoxification is paramount, since it enables cells to maintain their compartmental integrity, hence their functioning potential. Whilst AOS detoxification can be very partially chemical, it is mostly enzymatic (figure 7).

An analysis of the antioxidants involved in such detoxification revealed the importance of certain molecules such as R-SH. Moreover, R-SH content is a major parameter in latex diagnosis (Jacob *et al.*, 1988) since it partly reflects the ability of laticifers to protect themselves from AOS.

A study of R-SH showed that they mostly consist of glutathion (60%) and cysteine (Archer *et al.*, 1969; Clément, pers. comm.).

Ascorbate, whose cytosolic content is between 3 and 10 mM (Archer *et al.*, 1969; Prévôt, pers. comm.), also takes part in AOS detoxification.

Other phenols yet to be defined *in situ* are also probably involved in the complex oxido-reduction mechanisms brought into play.

Conversion of  $O_2^{\cdot-}$ , a very aggressive molecule, into  $H_2O_2$ , which is still very toxic but more stable, is caused by superoxydodismutase (SOD). This enzyme, which is now well-known in the

animal and plant kingdoms, has been found in latex. Molecular biology techniques show that a manganese SOD gene (Mn-SOD), located in the mitochondria, is overexpressed in the latex after ethylene stimulation (Miao and Gaynor, 1993).

Other work is being carried out on quite specific peroxidases capable of detoxifying  $H_2O_2$ , such as ascorbate peroxidase (Dubois, 1996), which appears to be a housekeeping enzyme. It functions *in situ* and its affinity for  $H_2O_2$  is relatively strong: 15  $\mu$ M.

This is also the case with glutathion peroxidase, whose expression, though it does not seem to be particularly dependent upon ethylene stimulation, if at all, proves to be closely linked to the metabolic activity of the laticifer system. Its affinity for  $H_2O_2$  is very strong: 5  $\mu$ M, and its activity is controlled by glutathion (GSH) availability in the cytosol (Dubois, 1996).

These two cytosolic enzymes are highly complementary in  $H_2O_2$  detoxification mechanisms.

The case of catalase, which also ought to prove complementary to the previous enzymes and even more powerful, has yet to be clarified. Its discovery, reported by some researchers (d'Auzac, 1996) has not been confirmed by others working under different conditions (Prévôt and Jacob, pers. comm.). The reason for these differences may lie in the variability of the clones used and prior ethylene stimulation required for catalase activity to be expressed in latex, or substantial enzyme lability.

### Conclusion

It seems clear that the research effort in this vast field of the biological mechanisms involved in *Hevea brasiliensis* latex production needs to be continued, in order to acquire a clearer picture of the impact of the antagonisms involved and to define a strategy capable of favouring tree exploitation. This approach fits in perfectly with the improvement of *Hevea* yield potential. ■

## Résumé

La production de latex par le système laticifère d'*Hevea brasiliensis* est gouvernée par deux principaux facteurs limitants : l'écoulement du latex lors de la saignée et la régénération du latex entre deux saignées. Le fonctionnement de ces deux facteurs limitants est contrôlé par des mécanismes physiologiques.

L'écoulement du latex relève de plusieurs paramètres : la pression de turgescence, les caractéristiques des transferts hydriques des tissus du phloème vers les laticifères lors de la saignée, et les processus intervenant lors de la coagulation. Ces derniers sont antagonistes : certains l'induisent (hévéine, glucanase,...), d'autres la ralentissent ( $\alpha$ -glucosaminidase, chitinase, ...).

La régénération du latex dépend de quatre mécanismes essentiels.

L'alimentation des laticifères en saccharose est effectivement l'élément de base du métabolisme cellulaire et particulièrement du métabolisme isoprénique. Il dépend de la disponibilité en hydrates de carbone de la sève élaborée et de l'écorce, mais aussi de sa pénétration dans les laticifères à travers leur plasmalemma.

La régulation des activités enzymatiques limitantes des voies métaboliques laticifères qui intervient dans la régénération du latex (par ex. l'invertase).

Le troisième mécanisme est lié à la disponibilité en énergie biochimique et à sa régénération *in situ*. La quantité et le renouvellement du *pool* adénylique jouent, en effet, un rôle important dans l'écoulement et la régénération du latex, donc dans la production.

Le quatrième mécanisme comporte deux aspects : d'une part des réactions induisent des phénomènes de sénescence, qui génèrent des molécules d'oxygène actif (AOS :  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH^\cdot$ ), responsables de la fatigue laticifère et de l'encoche sèche ; d'autre part, des processus biochimiques antioxydants luttent contre ces AOS, entraînant la détoxification des tissus laticifères et la conservation de leur capacité laticigène.

## Abstract

The production of rubber by the *Hevea brasiliensis* laticiferous system depends on two major limiting factors: latex flow after tapping and latex regeneration between two tappings. Physiological mechanisms are able to control the functioning of these two limiting factors.

Latex flow depends on several parameters: turgor pressure, the characteristics of water transfers from phloem tissues to laticifers after tapping, and processes involved in latex coagulation. These processes are antagonistic: some induce coagulation (hevein, glucanase, etc.) others slow it down ( $\alpha$ -glucosaminidase, chitinase, etc.).

Latex regeneration is controlled by four essential mechanisms. The first concerns sucrose loading of the laticifers. Sucrose is effectively the fundamental element of cellular metabolism in general, and more specifically of isoprene metabolism. It depends on the carbohydrate availability of elaborated sap flow and bark reserves, but also of its plasmalemma transfer inside the laticiferous syncytium.

The second mechanism concerns the regulation of limiting enzymatic activities in the laticiferous metabolic pathways involved in latex regeneration (i.e.: the invertase step).

The third mechanism is linked to the availability of biochemical energy and its regeneration *in situ*. The quantity and the turnover of the adenylic pool play a major role in latex flow and latex regeneration, consequently in rubber yield.

The fourth mechanism concerns two aspects: on the one hand, reactions inducing senescence phenomena, which generate toxic molecules of active oxygen species (AOS :  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH^\cdot$ ), are responsible for laticifer fatigue and dry bark, whereas biochemical processes involving antioxidant reactions fight against AOS and detoxify the laticiferous tissues, preserving their latex production capacity.

## Resumen

La producción de latex por el sistema laticífero de *Hevea brasiliensis* se halla gobernado por dos principales factores limitantes: el derrame del látex cuando la pica, y la regeneración del latex entre dos picas. El funcionamiento de estos dos factores está controlado por mecanismos fisiológicos.

El derrame del latex depende de varios parámetros: la presión de turgescencia, las características de las transferencias hídricas de los tejidos del floema hacia los vasos laticíferos en la pica, y los procesos que intervienen en la coagulación. Estos últimos son antagonistas: algunos la inducen (heveina, glucanasa,...), otros la aminoran ( $\alpha$ -glucosaminidasa, quitinasa, ...).

La regeneración depende de cuatro mecanismos esenciales.

La alimentación de los vasos laticíferos en sacarosa. Esta es efectivamente el elemento básico del metabolismo celular y en particular del metabolismo isoprenico. Depende de la disponibilidad en hidratos de carbono de la savia elaborada y de la corteza, pero también de su penetración en los vasos laticíferos a través de su plasmalema.

La regulación de las actividades enzimáticas limitantes de las vías metabólicas laticíferas que intervienen en la regeneración del latex (por ex. la invertasa).

El tercer mecanismo se halla enlazado con la disponibilidad en energía bioquímica y con su regeneración *in situ*. La cantidad y la renovación del «pool» adenilico desempeñan, en efecto, un papel importante en el derrame y la regeneración del latex, por lo tanto, en la producción.

El cuarto mecanismo incluye dos aspectos: por un lado, reacciones inducen fenómenos de senescencia, que generan moléculas de oxígeno activo (AOS:  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH^\cdot$ ), responsables del cansancio laticífero y de la entalladura seca; por otro lado, procesos bioquímicos antioxidantes luchan contra estos AOS, acarreado la destoxificación de los tejidos laticíferos y la conservación de su capacidad laticigena.