

**COMMUNAUTE FRANCAISE DE BELGIQUE
ACADEMIE UNIVERSITAIRE WALLONIE-EUROPE
UNIVERSITE DE LIEGE-GEMBLoux : AGRO-BIO TECH**

**Elaboration d'un protocole *in vitro* de contournement des
barrières d'incompatibilité génétique entre *Phaseolus coccineus* L.
et *P. vulgaris* L.**

Barikissou Eugénie

Dissertation originale présentée en vue de l'obtention du grade
de Docteur en Sciences Agronomiques et Ingénierie Biologique

Promoteur : Professeur Jean-Pierre BAUDOIN

2012

Copyright ©: Aux termes de la loi belge du 30 juin 1994, sur le droit d’auteur et les droits voisins, seul l’auteur a le droit de reproduire partiellement ou complémentaiement cet ouvrage de quelque façon et forme que ce soit ou d’en autoriser la reproduction partielle ou complète de quelque manière et sous quelque forme que ce soit. Toute photocopie ou reproduction sous autre forme est donc faite en violation de la dite loi et de ses modifications ultérieure.

Barikissou Eugénie. (2012). Elaboration d'un protocole *in vitro* de contournement des barrières d'incompatibilité génétique entre *Phaseolus coccineus* L. et *P. vulgaris* L. (Thèse de doctorat). Université de Liège Gembloux Agro Bio Tech.

Résumé

L'amélioration du haricot commun *Phaseolus vulgaris* L. par hybridations interspécifiques avec *P. coccineus* L. nécessite l'utilisation de ce dernier comme parent femelle (♀). Mais ce croisement aboutit souvent à des avortements et ce, dès le stade globulaire. L'embryoculture permet d'obtenir, dans certains cas, des hybrides interspécifiques via la culture d'embryons isolés aux stades cordiforme âgé ou cotylédonaire, mais pas au stade globulaire. A ce dernier stade de développement, il a été possible d'obtenir des plantes chez le génotype NI 637 de *P. vulgaris*, via le protocole de culture de gousses. Mais l'absence de formation de racines chez les embryons germés, qui devraient évoluer en plantules, a limité le taux de réussite à un pourcentage de 3% de plantules en croissance. L'objectif de notre travail est d'améliorer ce taux afin de parvenir à sauver efficacement les embryons hybrides *P. coccineus* (♀) x *P. vulgaris*. Nous avons tout d'abord étudié les conditions de régénération *in vitro* des embryons obtenus par autofécondations, pour les appliquer ensuite aux embryons hybrides interspécifiques. Différents essais ont été réalisés sur base du protocole de culture de gousses. Ce protocole consiste à réaliser la culture de jeunes gousses successivement sur trois milieux à osmolarité décroissante et nommés : P₀0 (à 580 mosm), P₀1 (à 450 mosm) et P₀1 (à 350 mosm). Après une semaine de culture les embryons sont isolés des gousses puis transférés successivement sur les milieux G1 de maturation et germination, G6 de déshydratation, G7g d'induction de racines et G7c de développement en plantules. L'évaluation de ce protocole de culture de gousses chez trois génotypes : NI 637, NI 622 et X 484 de *P. vulgaris* et un génotype NI 16 de *P. coccineus*, nous a permis de confirmer les difficultés d'enracinement des embryons germés, comme rapportées auparavant chez NI 637. Toutefois, le retrait de la BAP (0,1 µM) du milieu G1 et la culture, au-dessus du milieu des embryons isolés, ont permis d'obtenir un taux de germination de 91%, c'est-à-dire un taux deux fois plus élevé par rapport au résultats rapportés antérieurement chez NI 637. La culture préalable des embryons en milieu G1 liquide a favorisé, après leur transfert successif sur les milieux gélosés G6, G7g et G7c, l'enracinement et le développement en plantules, en réduisant le brunissement du milieu et la formation de cals. Cela nous a permis d'obtenir un taux de 10% de plantules en croissance, taux trois fois plus élevé par rapport à celui rapporté auparavant en milieu gélosé. Toutes les plantules obtenues, par culture préalable en milieu liquide, ont développé des plantes adultes après un mois d'acclimatation. La culture des embryons en milieu gélosé et l'ajout du charbon actif dans les deux milieux G7g et G7c ont également permis de réduire le brunissement et la formation de cals. Cela a donné un taux de plantules en croissance de 60%, c'est-à-dire un taux 20 fois plus élevé par rapport à celui rapporté auparavant sans charbon actif. Le microbouturage de nœuds cotylédonaire, combiné au protocole de culture de gousses, a permis de régénérer des plantules chez tous les génotypes testés, avec un taux de régénération plus élevé chez NI 16 de *P. coccineus* (90%) par rapport à *P. vulgaris* (50%). Cela représente un taux de régénération trois fois plus élevé par rapport au résultat rapporté auparavant avec la culture de gousses seule chez le génotype NI 637 de *P. vulgaris*. La culture *in vitro* des embryons en cours d'avortement et isolés de l'ovule au stade cordiforme jeune, combinée au microbouturage de nœuds cotylédonaire, nous a permis d'obtenir, pour la première fois, une plantule hybride *P. coccineus* (NI 16) x *P. vulgaris* (NI 637). Notre protocole, qui combine le protocole de culture de gousses et le microbouturage de nœuds cotylédonaire, pourrait être une alternative intéressante pour le sauvetage d'embryons qui avortent au stade globulaire.

Abstract

Common bean *Phaseolus vulgaris* L. improvement by interspecific hybridizations with *P. coccineus* L. requires the use of the latter as the female parent (♀). But, these crosses lead to abortion of immature embryos, usually at the globular stage. It is possible to obtain hybrid plantlets by the *in vitro* culture of embryos at the torpedo or cotyledonary stages, but not at the globular stage. However, at this stage of development, it is possible to rescue them by using the pod culture protocol. But with a very low regeneration rate (3%) due to poor root formation. The objective of our work is to improve this rate in order to increase the regeneration of hybrid embryos *P. coccineus* (♀) x *P. vulgaris*. We started to study the conditions of regeneration with parental genotypes in order to apply them to hybrid embryos. Various tests were conducted on the basis of pods culture protocol. This protocol consists in carrying out pods culture on three successive media with variable osmotic conditions (P₀ 580 mosm, P₀1 450 mosm and P₀1 350 mosm) followed by extraction and culture of isolated embryos successively in three media: G1 for embryos maturation and germination, G6 for dehydration, G7g for roots induction and G7c for plantlets development. The evaluation of the pods culture protocol with three genotypes: NI 637, NI 622 and X 484 of *P. vulgaris* and one genotype NI 16 of *P. coccineus* confirmed difficulties for rooting of germinated embryos as previously reported with NI 637. However, the absence of BAP (0.1 µM) in G1 medium and the culture of isolated embryos up top of the medium led to a germination rate of 91%, two times higher compared to previous results. The culture in the G1 liquid medium promoted rooting and plantlets growing after their transfer to G6, G7g and G7c agar media, by reducing the browning of the medium and the callus induction. This prior culture in liquid medium led to a rate of 10% of plantlets, three times higher compared to that reported previously on agar medium. All plantlets have developed mature plants after one month in acclimatization. The culture on agar medium with the addition of activated charcoal into both media G7g and G7c also has reduced browning and callus and led to a rate of plantlets growing of 60%, 20 times higher compared to the result that reported previously without activated charcoal. The microcutting of cotyledonary nodes combined with pods culture led to regenerated plantlets for all genotypes evaluated with a higher rate of regeneration with NI 16 of *P. coccineus* (90%) compared to genotypes of *P. vulgaris* (50%) evaluated. This represents a regeneration rate three times higher compared to the previous result with the pods culture protocol alone with NI 637. Heart shaped embryos rescue followed by microcutting of cotyledonary nodes allowed for the first time to obtain one hybrid plantlet. Our protocol that combines pods culture and microcutting of cotyledonary nodes could be an interesting alternative for the rescue of embryos aborted at the globular stage.

DEDICACES

**Je dédie ce travail à mes parents, mes sœurs et frères
ainsi qu'à tous ceux qui m'ont soutenue durant sa
réalisation.**

Remerciements

Ce doctorat est réalisé dans le cadre de la formation continue des agents de la fonction publique de l'État gabonais, que je remercie de m'avoir soutenue financièrement pendant toute la durée de mes études.

Mes plus vifs remerciements vont au Professeur J. P. Baudoin qui m'a accueillie à l'Unité de Phytotechnie Tropicale et d'Horticulture de la Faculté des Sciences Agronomiques de Gembloux (Agro bio tech) de l'Université de Liège. Je le remercie surtout de m'avoir encadrée avec rigueur jusqu'aux résultats présents. Merci, Professeur, de m'avoir confié ce sujet si passionnant, et également si complexe, mais qui nous a permis d'apporter du neuf dans le domaine du sauvetage d'embryons immatures de *Phaseolus*.

A mes deux rapporteurs : Inspecteur général P. Druart et Professeur G. Mergeai, merci d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail. Votre disponibilité et vos remarques pertinentes, ainsi que votre rigueur, ont largement contribué à l'aboutissement de ce rapport. Merci infiniment.

Aux autres membres de mon comité : Professeurs P. Du Jardin, A. Toussaint, et H. Magein. Je vous remercie également pour vos remarques, vos critiques et tout le soutien que vous m'avez apporté pour l'aboutissement de ce doctorat.

Aux collègues du labo de Phytotechnie tropicale et d'Horticulture : Docteurs L. Benbouza, R. Blaz, S. Silué, et G. Abid ; ainsi que mesdames C. Luz Villarroel, Nafi, Binta, Maïté, Martine et Isabelle et messieurs C. Byamushana Kagigira, L. Bolyn, D. Dehuvyne et C. Higuët, je vous remercie tous pour la bonne ambiance du labo et toute l'aide que vous m'avez apportée. En particulier, merci Carmen, pour ton aide combien indispensable, ton optimisme dans la culture des tissus et ton sourire à toute épreuve.

En dehors des membres de l'unité, vous êtes nombreux à avoir contribué à ce travail. Je tiens à remercier en particulier le Professeur Ana María Hinostroz). Merci, Professeur, pour vos encouragements et votre soutien. Je reste également très reconnaissante aux Professeurs Clarke, Proux C. et Kritinn B., du Canada, ainsi qu'aux Professeurs L. Lepieniec, O. Monnier et B. Sangwan de France, d'avoir répondu rapidement à mes requêtes. Merci Professeurs C. Ahanhanzoet de Cotonou et D. O. N. Fotso du Cameroun, vos conseils m'ont donné plus de lumières pour faire avancer mon travail. Mes remerciements vont aussi à l'inspecteur général Jacquemin du CRA-w pour ses commentaires et les recommandations faites sur mes gels polyacrylamides afin d'améliorer les résultats de la PCR ; et également à Mesdames S. Richet et Spillebout M.R. du CRA-w pour m'avoir réservé un bon accueil durant la poursuite de mes travaux dans leur laboratoire.

Nadia, tu es inoubliable. Merci infiniment pour ton soutien, ton aide et tes encouragements.

Durant la réalisation de ce travail, les problèmes de santé étaient souvent au rendez-vous, et le Docteur C. Labi était présente pour trouver des solutions. Grand merci, Docteur, pour les traitements si efficaces que vous m'avez prescrits, ainsi que pour votre soutien durant la période que j'ai passée à Gembloux.

Merci infiniment à Madame Decamp, pour son soutien et sa patience durant mes moments difficiles. Madame Michelle Moreau Van Marsenille, c'est grâce à toi que j'ai choisi de venir faire ma thèse à Gembloux. Tu es le symbole d'amour. Merci pour ta gentillesse et également pour tout ce que tu fais pour les épouses et les doctorantes venues d'ailleurs. Je garderai un bon souvenir de toi et de ta famille.

Madame O Medza, et Messieurs B Toirambe, E. Capochichi, F. Souamy et S. Do Ango, vous êtes plus que des amis, je vous remercie pour vos encouragements.

Messieurs Koumba Koumba et M. Mbéga (mes deux anciens directeurs de l'Institut de Recherche Technologique), je vous remercie vivement pour votre confiance et votre coopération. Je n'oublie pas mes collègues de service au Gabon, Madame Ada et Monsieur Eyi H., pour l'attention qu'ils ont portée à l'avancement de mes dossiers administratifs durant mon séjour à Gembloux.

Aux conseillers de l'Ambassade du Gabon à Bruxelles, Mesdames M.E. Tassyla, A. Djouba et Messieurs L. Mouloungui Mbadinga et D. Lebanda, je leur dis merci infiniment pour leur disponibilité et leur contribution à l'impression de ce rapport.

Mesdames J. Bellière, A. Lambion et C. Spineux, et Messieurs A. Gariga et A. KAYUMBA, vos suggestions et vos encouragements ont contribué à finaliser ce travail. Merci beaucoup pour le temps que vous avez consacré à la lecture de celui-ci.

Enfin, vous êtes nombreux à travers le monde entier à m'avoir soutenue et encouragée: Messieurs M. Bakary, R. Saïzounou, B. Mouziengou, D. Goffinet, A. Guissé, A. Alec, A.R. Gado, B. Mounziegou, E. Michel, F. Anguilet, T. Henckaerts et mesdames S. Françoise, S. Bayendit, Alix, Rakyatou, Aida, Abiba, Mariam, L. Redani, C. Moupela, R.N. Poligui, P. Biambas etc. Je dis un grand merci à tous.

ABREVIATIONS

μM : micro mole par litre

2,4D : acide 2,4 dichlorophénoxyacétique

ABA : acide abscissique

ADN : acide désoxyribonucléique

AIA : acide indole acétique

AIB : acide indole butyrique

ANA : acide naphtalène acétique

ANOVA : analyse de variance

B5 : milieu de Gamborg *et al.* (1968)

BA : N6 benzyladénine

BAP : N6-benzylaminopurine

CA : charbon actif

Cdo : culture des demi-ovules

Cg : culture des gousses

CH : hydrolysate de caséine

CIAT : Centre International de l'Agriculture Tropicale

Cov : culture d'ovules

cv : cultivar

DNA : polymérase : Désoxyribonucléase

dNTP : désoxyribonucléotide triphosphate

EDTA : éthylène diamine tétraacétate

GA : acide gibbérellique

JAP : jour après pollinisation

KN : kinétine

MS : Murashige et Skoog (1962)

PCR : Polymerase Chain Reaction (réaction de polymérisation en chaîne)

PVP : polyvinylpyrrolidone

RITA : récipient à immersion temporaire

rpm : rotation par minute

SSH : Suppression Subtractive Hybridization (Hybridation Soustractive et Suppressive)

SSR : simple séquence répétée (les microsatellites)

ZEA : zéatine

LISTE DES ARTICLES ET NOTE DE RECHERCHE EN RAPPORT AVEC LA THESE

Barikissou E. Effet du milieu liquide sur le développement en plantules à partir de la culture d'embryons globulaires chez *P. vulgaris*. Article en préparation.

Barikissou E. et Baudoin J.P. Sauvetage d'embryons chez les légumineuses alimentaires en general et dans le genre *Phaseolus* en particulier. Article accepté dans BASE.

Barikissou E. et Baudoin J. P. (2011). *In vitro* culture technique to rescue globular embryos of Phaseolus by microcutting. *Bean Improvement Cooperative* **54**: 78 – 79.

Barikissou E. et Baudoin J.P. (2011). Refinement of an *in vitro* culture technique for the rescue of globular embryos using microcutting for *P. vulgaris* L. and *P. coccineus* L. *Tropicultura* (**29**): 4. 218-224.

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Représentation schématique de la double fécondation chez les Angiospermes.	15
Figure 2. Principales étapes de l'embryogénèse chez une Dicotylédone.	18
Figure 3. Représentation schématique d'un embryon mature.	18
Figure 4. Représentation du niveau relatif des réserves nutritives et de l'eau durant le développement de l'embryon.	19
Figure 5. Représentation schématique du développement de l'albumen et de l'embryon chez <i>Arabidopsis thaliana</i> L.	21
Figure 6. Principales étapes du développement de l'albumen chez <i>Arabidopsis thaliana</i> L.	21
Figure 7. Représentation schématique des principaux stades du développement <i>in vitro</i> de l'embryon cordiforme jeune chez le génotype NI 637 de <i>P. vulgaris</i>	28
Figure 8. Représentation schématique des différentes étapes du microgreffage <i>in vitro</i> selon le protocole de Gulati <i>et al.</i> (2001).	31
Figure 9. Plantes mères de <i>P. vulgaris</i> et <i>P. coccineus</i> développées en serre tropicale.	51
Figure 10. Disposition sur milieu gélosé des gousses <i>P. vulgaris</i> récoltées 2 JAP.	53
Figure 11. Prélèvement d'ovules à partir d'une jeune gousse précultivée.	55
Figure 12. Prélèvement d'un demi-ovule.	55
Figure 13. Disposition des ovules cultivés sur un milieu de maturation et germination gélosé.	56
Figure 14. Représentation schématique du microbouturage.	64
Figure 15. Taux de maturation et de germination d'embryons cordiformes jeunes <i>P. vulgaris</i> (NI 637) avec ou sans BAP (0,1 μ M) dans le milieu G1.	69
Figure 16. Embryons cordiformes jeunes de <i>P. vulgaris</i> (NI 637) après 1 semaine dans le milieu G1 de maturation et germination avec (A) ou sans (B) BAP.	70
Figure 17. Développement d'un embryon précultivé en milieu G1 de maturation sans BAP après deux semaines sur le milieu G6 de déshydratation.	70
Figure 18. Taux d'explants enracinés et hyperhydriques de <i>P. vulgaris</i> (NI 637) après 2 semaines dans le milieu G7c de développement en plantules en fonction de l'AIA ou l'ANA ajouté au milieu G7g d'induction de racines.	72
Figure 19. Embryon germé de <i>P. vulgaris</i> (NI 637) cultivé sur milieu d'induction G7g avec l'ANA (1,3 μ M) à la place de l'AIA (1 μ M) enraciné après 2 semaines sur G7c.	72
Figure 20. Embryons germés après deux semaines avec radicule en surface (A) ou enfouie (B) dans le milieu G6.	73

Figure 21. Embryons germés en arrêt de croissance après 2 semaines sur le milieu de développement en plantules G7c.	74
Figure 22. Stades de développement des embryons observés à l'extraction chez <i>P. vulgaris</i> . 75	
Figure 23. Taux moyens de maturation et de germination <i>in ovulo</i> de <i>P. vulgaris</i> (NI 637) en fonction de la solution minérale.	77
Figure 24. Maturation et germination <i>in ovulo</i> à partir d'ovules âgés de 4 JAP chez <i>P. vulgaris</i> (NI 637).	78
Figure 25. Embryon germé <i>in ovulo</i> après 8 semaines et isolés du reste de l'ovule.	78
Figure 26. Ovule de <i>P. vulgaris</i> (X 707) en culture <i>in vitro</i> sur un milieu de maturation G1 depuis trois semaines.	81
Figure 27. Maturation et germination d'embryons globulaires en demi-ovules chez X 484 de <i>P. vulgaris</i>	83
Figure 28. Taux moyens de maturation et de germination <i>in ovulo</i> et en demi-ovules de X 484 de <i>P. vulgaris</i>	84
Figure 29. Taux moyens de maturation, de germination et de développement en plantules, en fonction de la nature physique du substrat du milieu de maturation.	86
Figure 30. Embryons isolés des gousses précultivées après 3 jours de transfert en milieu (G1) de maturation et germination liquide (A) ou gélosé (B).	86
Figure 31. Embryons germés après deux semaines en milieu (G6) de déshydratation à partir des embryons précultivés en milieu G1 liquide (A) ou gélosé (B).	87
Figure 32. Explants (A) et (B) en culture depuis une semaine dans un milieu de développement en plantules.	88
Figure 33. Explant (A) en arrêt de croissance et plantule (B) poursuivant son développement après une semaine d'acclimatation.	88
Figure 34. Observation d'une plante adulte après 30 jours d'acclimatation.	89
Figure 35. Synthèse des résultats obtenus concernant l'influence de la nature physique du milieu de culture sur le développement d'embryons isolés de gousses précultivées chez NI 637 de <i>P. vulgaris</i> jusqu'au stade de « plantules acclimatées ».	91
Figure 36. Taux moyens d'enracinement et de développement en plantules en présence ou en absence du CA (charbon actif).	92
Figure 37. Plantule vigoureuse (A) développée en présence de CA et embryons germés en arrêt de croissance (B) obtenus en absence de CA après 4 semaines en milieu G7.	93

Figure 38. Schéma de synthèse des résultats obtenus dans l'essai portant sur l'influence du CA (charbon actif) sur le développement en plantules des embryons globulaires via la culture de gousses chez NI 637 de <i>P. vulgaris</i>	95
Figure 39. Développement de microboutures de <i>P. coccineus</i> (NI 16) après 4 semaines dans les milieux MS (A) et G7c (B).	97
Figure 40. Acclimatation et développement de plantes adultes de <i>P. coccineus</i>	97
Figure 41. Explants obtenus par microbouturage de nœuds cotylédonaire après 4 semaines de culture dans le milieu MS chez un génotype (X 484) de <i>P. vulgaris</i>	100
Figure 42. Plantule (A) et explant (B) développés après 4 semaines de microbouturage de nœuds cotylédonaire chez <i>P. vulgaris</i> (X 484), respectivement avec ou sans charbon actif.	102
Figure 43. Plantules NI 16 de <i>P. coccineus</i> développées après 4 semaines de microbouturage.	102
Figure 44. Embryons issus d'un hybride interspécifique (A) et de <i>P. coccineus</i> (B) isolés des gousses récoltées 10 JAP.	104
Figure 45. Embryons germés après deux semaines sur le milieu G6 : (A) hybride présumé NI 16 (♀) x NI 637 ; (B) NI 16 de <i>P. coccineus</i>	105
Figure 46. Plantules développées après 4 semaines de microbouturage chez NI 16 de <i>P. coccineus</i> (A) et après 8 semaines chez un présumé hybride (<i>P. coccineus</i> x <i>P. vulgaris</i>) (B).	106
Figure 47. Observation d'une microbouture présumée hybride (<i>P. coccineus</i> x <i>P. vulgaris</i>) avec des cotylédons nécrosés après 4 semaines de microbouturage.	107
Figure 48. Pousse aberrante obtenue après 8 semaines de microbouturage de nœuds cotylédonaire chez un présumé hybride.	107
Figure 49. Profil de migration des fragments amplifiés par BM 141 sur l'ADN extrait des feuilles de plantules présumées hybrides et de génotypes parentaux.	108
Figure 50. Schéma proposé pour le sauvetage <i>in vitro</i> d'embryons hybrides <i>P. coccineus</i> (♀) x <i>P. vulgaris</i>	110
Figure 51. Schéma de synthèse des travaux réalisés.	125

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Statut biologique et origine des géotypes utilisés.	49
Tableau 2. Composition chimique de la solution nutritive*	51
Tableau 3. Composition chimique des 3 milieux utilisés pour la culture de gousses.	54
Tableau 4. Composition chimique des 4 milieux de base pour la culture d'embryons isolés de l'ovule.	57
Tableau 5. Composition chimique des deux solutions minérales évaluées pour la maturation et germination <i>in ovulo</i>	61
Tableau 6. Composition chimique des deux milieux MS et G7c modifiés de microbouturage.	65
Tableau 7. Taux moyens de germination en pourcentage (%) par rapport à l'effectif des embryons isolés mis en culture selon le géotype.	73
Tableau 8. Taux moyens d'extraction et de perte d'embryons (%) chez <i>P. vulgaris</i> (NI 637) selon la technique de culture et leur stade de développement.	76
Tableau 9. Taux moyens de maturation et de germination (%) des embryons globulaires cultivés <i>in ovulo</i> en fonction du géotype.	80
Tableau 10. Taux moyens de plantules régénérées (%) à partir d'embryons globulaires précultivés en gousses en fonction du géotype.	99
Tableau 11. Taux moyens de plantules régénérées (%) à partir d'embryons cordiformes jeunes en fonction du géotype.	99
Tableau 12. Taux moyens d'enracinement et de développement en plantules (%) avec et sans charbon actif chez <i>P. vulgaris</i> (X 484) et <i>P. coccineus</i> (NI 16).	101

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
I. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	2
I. 1. GÉNÉRALITÉS SUR LE GENRE <i>PHASEOLUS</i>	7
I. 1. 1. Taxonomie, origine, domestication et répartition géographique de <i>P. vulgaris</i>	7
I. 1. 2. Intérêt de la culture.....	8
I. 1. 3. Contraintes liées à la culture	9
I. 1. 4. Amélioration génétique de <i>P. vulgaris</i>	12
I. 1. 5. Embryogenèse chez les Angiospermes.....	14
I. 2. HYBRIDATION INTERSPÉCIFIQUE AVEC RECOURS À L'EMBRYOCULTURE CHEZ QUELQUES LÉGUMINEUSES ALIMENTAIRES, Y COMPRIS <i>PHASEOLUS</i>	23
I. 2. 1. Objectif de l'embryoculture	23
I. 2. 2. Hybridations interspécifiques avec recours à l'embryoculture chez <i>Phaseolus</i>	24
I. 2. 3. Embryoculture chez les espèces pures	25
I. 2. 4. Utilisation de l'embryoculture au cours des hybridations interspécifiques chez différentes légumineuses alimentaires	32
I. 3. RÉGÉNÉRATION <i>IN VITRO</i> PAR ORGANOGÉNÈSE DANS LE GENRE <i>PHASEOLUS</i>	38
I. 4. ENRACINEMENT <i>IN VITRO</i> CHEZ DIFFÉRENTES ESPÈCES VÉGÉTALES	40
I. 4. 1. Enracinement <i>in vitro</i> par application d'auxines	40
I. 4. 2. Enracinement <i>in vitro</i> par l'application du charbon actif.....	42
I. 5. CONCLUSION	42
II. EXPERIMENTATIONS	8
II. 1. OBJECTIFS	48
II. 2. MATÉRIEL ET MÉTHODES	49
II. 2. 1. Matériel végétal.....	49
II. 2. 2. Culture des plantes mères.....	49
II. 2. 3. Hybridations interspécifiques.....	52
II. 2. 4. Culture <i>in vitro</i>	52
II. 3. RESULTATS ET DISCUSSIONS.....	69
II. 3. 1. Essais préliminaires	69
II. 3. 2. Influence du génotype sur le sauvetage d'embryons globulaires.....	73

<i>II. 3. 3. Etude comparative de la culture d'ovules et de demi-ovules</i>	<i>75</i>
<i>II. 3. 4. Evaluation de la germination in ovulo</i>	<i>77</i>
<i>II. 3. 5. Amélioration du développement des embryons globulaires en plantules.....</i>	<i>85</i>
<i>II. 3. 6. Sauvetage d'embryons globulaires par microbouturage de nœuds cotylédonaire....</i>	<i>96</i>
<i>II. 3. 7. Sauvetage d'embryons hybrides par microbouturage de nœuds cotylédonaire</i>	<i>104</i>
III. DISCUSSION GENERALE	111
IV. CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES	119
IV. 1. CONCLUSION GÉNÉRALE.....	120
IV. 2. PERSPECTIVES	126
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	129
ANNEXES.....	141

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Le haricot commun (*Phaseolus vulgaris* L.) est une légumineuse alimentaire originaire d'Amérique centrale et du Sud (Chacón *et al.*, 2005). Avec une production mondiale d'environ 20,4 millions de tonnes en 2008, le haricot commun occupe une superficie agricole de 26,47 millions d'hectares dans les régions tempérées et tropicales d'Amérique, d'Europe, d'Afrique et d'Asie (source : <http://faostat.fao.org/site/567/default.asp>). Sa richesse en protéines ($\pm 22\%$ dans ses graines) le place parmi les cultures vivrières les plus importantes pour les populations des différents pays du Sud à dominance de terres d'altitude à faible potentialité d'élevage (Broughton *et al.*, 2003 ; Nyabyenda, 2005 ; Blair *et al.*, 2006). Bien qu'il soit produit pour l'autoconsommation, le haricot commun a fourni, en Tanzanie, par exemple, des excédents de 20% qui ont été commercialisés (Hillocks *et al.*, 2006). Sa production contribue à améliorer la sécurité alimentaire et les revenus des paysans dans certains pays du Sud.

Le rendement moyen en haricots secs par hectare en 2008 était cependant plus bas en Afrique (0,61 tonnes par hectare) qu'en Amérique du Nord et dans l'Union Européenne (respectivement 2 tonnes et 1,7 tonnes par hectare) (source : <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx>).

Parmi les facteurs limitant la production du haricot, on trouve les contraintes abiotiques (le climat, la salinité et l'acidité du sol) et les contraintes biotiques (les maladies et les insectes ravageurs). Ces dernières contraintes, auxquelles le haricot est très sensible, constituent une cause importante des faibles rendements de la légumineuse (Hillocks *et al.*, 2006).

L'exploration du pool génique secondaire révèle chez *P. coccineus* L. et *P. polyanthus* Greenm., deux espèces phylétiquement proches de *P. vulgaris*, une large variabilité de caractères intéressants qui peuvent être utilisés pour l'amélioration du haricot commun, parce qu'ils sont rares ou inexistants au sein de son pool génique primaire (Hillocks *et al.*, 2006 ; Miklas, 2006). Néanmoins les probabilités d'introgession des gènes utiles des deux espèces *P. coccineus* et *P. polyanthus* sont meilleures lorsque ces dernières sont utilisées comme génotypes parentaux femelles. Malheureusement, les croisements réalisés entre ces deux espèces donneuses et *P. vulgaris* (utilisée comme parent mâle) se soldent, dans la majorité des cas ($\pm 60\%$),

par l'avortement des embryons au stade globulaire (Lecomte *et al.*, 1998 ; Geerts *et al.*, 2002 ; Baudoin *et al.*, 2004 ; Silué, 2009 ; Abid, 2011). Des coupes histologiques, réalisées par ces derniers auteurs, ont montré que les avortements des embryons sont attribués, en partie, à des barrières nutritionnelles dues à des anomalies dans le développement du suspenseur et de l'albumen. Le sauvetage *in vitro* permet de lever ces difficultés nutritionnelles. Malheureusement, aucun hybride n'a pu être obtenu en ayant recours à la culture d'embryons globulaires. Les hybrides interspécifiques régénérés proviennent d'embryons isolés de l'ovule aux stades cordiforme âgé ou cotylédonaire, avec des pourcentages de régénération qui oscillent entre 0 et 27% selon le croisement (Lecomte, 1997).

La technique de culture préalable de gousses a permis de produire des plantes à partir d'embryons au stade globulaire chez un génotype cultivé autofécondé (NI 637) de *P. vulgaris*. Le taux de développement des embryons germés en plantules est malheureusement faible (3%) (Geerts *et al.*, 2000 ; Geerts, 2001). D'après Geerts *et al.* (2000 ; Geerts, 2001), cela s'expliquerait soit par le pourcentage faible d'embryons au stade cotylédonaire (9%) extraits des gousses précultivées, soit par la formation de calcs hyperhydriques* au niveau du pôle racinaire des embryons germés qui devraient évoluer en plantules (Lecomte, 1997 ; Mergeai *et al.*, 1997).

Tenant compte de ces deux problématiques, notre travail, qui s'inscrit également dans le cadre général du sauvetage d'embryons hybrides du genre *Phaseolus*, a pour objectif principal d'améliorer le taux de développement des embryons germés en plantules (Geerts *et al.*, 2000 ; 2001).

Ce travail s'articule autour de quatre parties.

La première partie constitue une synthèse bibliographique qui traite des généralités sur *P. vulgaris* et du recours à l'embryoculture dans l'amélioration des plantes chez de nombreuses légumineuses alimentaires, y compris *Phaseolus*. L'absence de racines et l'arrêt de croissance des embryons germés rapportés lors des travaux antérieurs chez *Phaseolus* nous ont incitée à approfondir notre étude bibliographique sur la régénération de plantes par organogenèse dans le même genre, d'une part, et sur l'enracinement *in vitro* chez différentes espèces végétales, d'autre part.

* Apparence vitreuse, transparente ou mouillée et souvent gonflée.

La deuxième partie de notre recherche s'intéresse au volet expérimental dont les quatre premières expérimentations ont été réalisées avec du matériel issu de deux espèces pures : *P. coccineus* et *P. vulgaris*. Le protocole le plus adapté à l'obtention des plantes à partir des embryons globulaires a été appliqué dans la cinquième expérimentation aux embryons hybrides obtenus lors des croisements entre *P. coccineus* (parent femelle) et *P. vulgaris*. Dans ce volet expérimental, nous séparons la méthodologie et le matériel végétal utilisés des résultats obtenus et des discussions, pour chacune des cinq expérimentations.

La troisième partie est consacrée à une discussion générale, qui sera suivie, dans la quatrième partie, des principales conclusions tirées de ce travail, ainsi que des perspectives ouvertes par la présente étude.

I. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. 1. Généralités sur le genre *Phaseolus*

I. 1. 1. Taxonomie, origine, domestication et répartition géographique de *P. vulgaris*

I. 1.1. 1. Taxonomie

Phaseolus vulgaris, de formule chromosomique $2n=22$ (Baudoin *et al.*, 2002 ; Freytag et Debouck, 2002) est une légumineuse vivrière. Elle appartient à la sous-tribu des *Phaseolinae*, tribu des *Phaseoleae*, sous-famille des *Papilionoideae*, famille des *Fabaceae* (*Leguminosae*), et à l'ordre des *Rosales* (CIAT, 1989). La sous-tribu *Phaseolinae* est divisée en deux groupes : le groupe des *Dolichastreae* et celui des *Phaseolastrae*, avec les genres *Phaseolus* et *Vigna* qui regroupent le plus grand nombre d'espèces cultivées. Le genre *Phaseolus* est subdivisé en trois sections (*Alepidocalix*, *Minkeliersia* et *Phaseolus*) dont *Phaseolus* qui regroupe les cinq espèces cultivées : *P. vulgaris* (haricot commun), *P. coccineus* (haricot d'Espagne), *P. lunatus* L. (haricot de Lima), *P. acutifolius* A. Gray (haricot Tépari), et *P. polyanthus* (Fríjol de la vida). Chacune des cinq espèces cultivées possède des « parents » sauvages. On distingue cinq pools géniques primaires correspondant aux cinq espèces cultivées et à leurs formes ancestrales. Les analyses génomiques, botaniques et phytogéographiques, ainsi que l'aptitude à la recombinaison entre divers taxons cultivés et sauvages ont permis d'établir des relations phylogénétiques entre le pool génique primaire *P. vulgaris* et les autres pools géniques (Fofana *et al.*, 1997 ; Maquet *et al.*, 1997 ; Singh, 2001).

Le pool génique primaire de *P. vulgaris* est constitué de variétés cultivées et sauvages. Son pool génique secondaire renferme les espèces *P. coccineus*¹, *P. polyanthus*¹ et *P. costaricensis*² Freytag et Debouck. Son pool génique tertiaire est constitué des espèces *P. acutifolius*¹ et *P. parviflorus*² Freytag. Quant à son quatrième pool génique, il est constitué des espèces *P. lunatus*¹, *P. filiformis*² Piper et *P. angustissimus*² A. Gray (CIAT, 1989).

¹ Taxon domestiqué avec des formes sauvages et cultivées

² Taxon non domestiqué ne renfermant que des formes sauvages

I. 1. 1. 2. Origine, domestication et répartition géographique

Le haricot commun, comme tous les haricots du genre *Phaseolus*, est originaire d'Amérique du Sud et d'Amérique centrale (Chacón *et al.*, 2005). Il a été domestiqué depuis plus de 5000 ans, indépendamment en Amérique centrale (Mexique et Guatemala) et dans les Andes (principalement au Pérou), avant d'être transporté vers d'autres continents à partir du XVI^e siècle (Bernal et Graham, 2001). Il a été introduit en Afrique par les Portugais au XX^e siècle. Le haricot commun est produit de nos jours dans le monde et principalement en Amérique latine et en Afrique. En Amérique latine, il est répandu dans la zone amazonienne du Brésil, dans la Cordillère des Andes et en Amérique centrale. En Afrique, il est surtout produit en Afrique centrale et orientale (Nyabyenda, 2005).

I. 1. 2. Intérêt de la culture

Parmi les cinq espèces cultivées, le haricot commun est économiquement le plus important car il représente plus de 90% de la production mondiale de haricots (Singh, 1992). Il a l'avantage d'être une source de protéines bon marché. Ainsi, il joue un rôle important dans l'équilibre alimentaire des populations de pays comme le Burundi, le Rwanda, l'Ouganda, où les populations dépendent des végétaux pour satisfaire leurs besoins en protéines (Broughton *et al.*, 2003). Le haricot commun, comme d'autres légumineuses, est riche en protéines ($\pm 22\%$ des graines) (CIAT, 1989). Son profil en acides aminés en fait un bon complément alimentaire. Il complète les céréales (riches en méthionine) en leur apportant un ou plusieurs autres acides aminés essentiels dont, notamment, de la lysine. Outre les protéines, la richesse en vitamines et en minéraux (Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, Zn) du haricot commun permet de lutter contre la malnutrition infantile, en particulier dans différents pays du Sud (PABRA, 2007). De plus, le haricot commun représente une source de revenus notable de plus en plus importante en faveur des petits exploitants (PABRA, 2007). Par ailleurs, à la différence des autres plantes cultivées, le haricot commun, comme d'autres légumineuses, peut satisfaire ses propres besoins azotés grâce à la fixation symbiotique. Au sein des nodosités formées sur ses racines, s'établit une symbiose entre la plante et certaines bactéries du sol, fixatrices d'azote atmosphérique, les bactéries du genre *Rhizobium* (Campbell et Reece, 2007).

Cette caractéristique des légumineuses confère un avantage économique et écologique significatif à la rotation des cultures en améliorant le statut azoté des sols.

Malgré les excellentes propriétés du haricot commun, celui-ci occupe cependant une place très modeste dans les systèmes culturels traditionnels des régions tropicales. Sa productivité se trouve gravement entravée par des contraintes biotiques et abiotiques qui entraînent une production faible en dépit de la demande croissante.

1. 1. 3. Contraintes liées à la culture

1. 1. 3. 1. Les contraintes biotiques

1. 3. 1. 1. Les maladies

En Afrique, les principales maladies du haricot sont occasionnées par des agents pathogènes d'origines fongique, bactérienne et virale (Allen *et al.*, 1996 ; FUSAGx-Laboratoire de Phytopharmacie, 2004 ; Nyabyenda, 2005).

Les maladies fongiques

La maladie des taches anguleuses des feuilles est la plus importante et la plus répandue des maladies qui affectent la production du haricot en Afrique subsaharienne (Wortmann *et al.*, 2006 ; Nyabyenda, 2005). Elle est causée par *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferraris, cryptogame très répandu dans les régions tropicales et subtropicales d'Amérique centrale et du Sud, et en Afrique de l'Est et du Centre. Cet agent fongique se développe sous une humidité variable et à des températures comprises entre 18 et 25°C. Les lésions peuvent envahir une grande partie de la surface de la feuille, entraînant la chlorose conduisant à la défoliation prématurée.

L'antracnose du haricot, causée par *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn.) Bri. et Cav., sévit dans toutes les aires de culture de *P. vulgaris* (Melotto *et al.*, 2000). La maladie se propage dans des conditions d'humidité relativement élevée et par des températures allant de 14 à 24°C. Les lésions se présentent sur les cotylédons, pétioles, rameaux et tiges ainsi que sur les gousses. Outre les graines, les gousses contaminées propagent la maladie par l'action de la pluie, du vent, ainsi que par un contact physique entre plantes (CIAT, 1987).

Les pertes de rendement attribuées à ces deux maladies fongiques sont évaluées à plus d'un million de tonnes par an en Afrique subsaharienne (Wortmann, 2006).

La maladie des taches anguleuses et l'antracnose sont sensibles à de nombreux fongicides mais il est rare que les petits paysans emploient des produits chimiques pour lutter contre les maladies. Les cultivars ont des réactions variées face à ces maladies.

La rouille brune du haricot, causée par *Uromyces appendiculatus* (Pers.) Unger var. *appendiculatus*, est répandue dans le monde, dans les zones tempérées et tropicales où elle fait son apparition et se développe dans des régions très humides et sous des températures allant de 18 à 25°C. Une infection grave entraîne la défoliation prématurée de la plante. La rouille ne se transmet pas aux graines (CIAT, 1987).

Les maladies bactériennes

La bactériose à halo, causée par *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolica* Burkh. Dows, est une maladie surtout rencontrée dans les zones de haute altitude. Elle est favorisée par des températures basses et des pluies abondantes. La dissémination peut se faire par les gouttes de pluie et par l'homme (CIAT, 1987).

La bactériose commune, ou le flétrissement bactérien, est causée par *Xanthomonas campestris* pv. *Phaseoli* (Smith.) Dye. Elle est largement répandue à travers le monde dans les zones de basse altitude mais on la rencontre également dans les altitudes plus élevées que 1500 mètres. Elle occasionne des symptômes dans des conditions d'humidité relative et de température élevées.

Ces deux maladies d'origine bactérienne sont transmises par les semences infectées. Elles réduisent la production du haricot en Afrique subsaharienne avec des pertes évaluées à plus de 28,57% de la production totale en 2006 (Wortmann, 2006).

Les maladies virales

A peu près une vingtaine de virus ont été répertoriés comme étant des ennemis naturels du haricot (Allen *et al.*, 1996).

La mosaïque commune du haricot (BCMV) et la mosaïque nécrotique commune du haricot (BCMNV également connu sous le nom de « racine noire »), sont transmises par les pucerons et les graines infectées. Elles sont les plus fréquemment observées et les plus néfastes au haricot commun dans le monde entier (Drijfhout, 1978 ; McKern *et al.*, 1992). D'après les estimations, elles seraient responsables de 180 000 tonnes de pertes de rendement par an en Afrique subsaharienne (Wortmann, 2006).

L'utilisation des semences exemptes de maladies peut être utile pour lutter contre les maladies transmises par les graines, mais de telles semences sont rares (Wortmann, 2006).

La mosaïque jaune dorée du haricot (BGYMV) est une maladie transmise par une mouche blanche *Bemisia tabaci* Glennadius.

Ces virus interfèrent avec la production de la chlorophylle ; ils affectent en conséquence la photosynthèse et provoquent un jaunissement intense du feuillage (Blair *et al.*, 1995).

I. 3. 1. 2. Les ravageurs

Les insectes ravageurs détruisent toutes les parties de la plante, des racines aux tiges, ainsi que les gousses et les graines (Hillocks *et al.*, 2006). On distingue des ravageurs du feuillage, des gousses, des fleurs et des graines.

Les mouches mineuses du haricot (*Ophiomyia phaseoli* Tryon et *O. spencerella* Greathead) sont des ravageurs des feuilles et des tiges, dans lesquelles elles causent des dégâts en creusant des galeries. *O. phaseoli* prédomine dans les régions à climat frais, souvent en haute altitude, tandis que *O. spencerella* se développe dans les régions plus chaudes. Ces deux insectes constituent des ravageurs très dommageables pour le haricot en Afrique et en Asie (Hillocks *et al.*, 2006). La lutte se fait, soit par un traitement des semences, soit par pulvérisation des pousses peu après la levée, avec un insecticide systémique, tel que l'imidaclopride ou l'endosulphan (Wortmann, 2006).

La bruche brésilienne (*Zabrotes subfasciatus* Boheman) et la bruche des haricots (*Acanthoscelides obtectus* Say), qui ravagent le haricot stocké, sont toutes deux présentes dans presque toute l'Afrique. La première occasionne des dégâts en zones chaudes de basse altitude ; la seconde en zones froides de moyenne altitude. Les pertes dues aux bruches varient en fonction de la durée de stockage (Allen *et al.*, 1996).

Les thrips (*Frankliniella occidentalis* Pergande, *F. schultzei* Trybom et *Megalurothrips sjostedti* Trybom) sont à l'origine de 80 000 - 90 000 tonnes de pertes de rendement par an (Wortmann, 2006). Selon Wortmann, il est difficile de lutter contre les thrips, en particulier *F. occidentalis*, car ce dernier est résistant à de nombreux pesticides couramment utilisés.

Les charançons du haricot (*Apion godmani* Wagner) et les chenilles foreuses de gousses (*Helicoverpa armigera* Hbn. et *Maruca testulalis* Geyer.), que l'on rencontre dans toutes les régions subsahariennes, entraînent également d'importantes pertes dans la production des graines du haricot.

I. 1. 3. 2. Les contraintes abiotiques

Les facteurs abiotiques tels que les températures élevées, le froid, la sécheresse, la forte salinité du sol (les sols à forte teneur en aluminium et en manganèse) ou encore les sols acides et les sols pauvres en minéraux (azote et phosphore) constituent également un obstacle à la production du haricot, particulièrement dans les pays du Sud (CIAT, 1987 ; Wortmann, 2006). Une insuffisance en phosphore, par exemple, est responsable d'une perte de 60% de production en graines (source : cgiar, <http://www.cgiar.org/impact/research/beans.html>).

La lutte contre les différentes contraintes précitées fait intervenir la mise en œuvre conjointe de plusieurs pratiques, dont la rotation des cultures, les cultures associées, le semis de cultivars résistants, et le recours aux insecticides. Malgré ces alternatives, les paysans du Sud ne parviennent pas à éradiquer définitivement les maladies et les ravageurs du haricot commun.

I. 1. 4. Amélioration génétique de P. vulgaris

Dans le but de mieux répondre à l'évolution des besoins des agriculteurs et des consommateurs, des travaux d'amélioration variétale par des hybridations interspécifiques ont été réalisés afin de transférer au haricot commun des gènes utiles absents ou faiblement exprimés au sein de son pool génique primaire.

Au cours des deux dernières décennies, l'Unité de Phytotechnie Tropicale et d'Horticulture de Gembloux Agro bio Tech de l'Université de Liège a conduit des travaux sur l'amélioration génétique des légumineuses appartenant au genre *Phaseolus*. Ces travaux ont été réalisés en collaboration avec le Centre International d'Agriculture Tropicale (CIAT) et d'autres organismes internationaux et nationaux situés en Afrique (Rwanda, Burundi, Kenya et Ouganda) et en Amérique du Sud (Brésil, Colombie et Pérou). De nombreuses collections ont été constituées et évaluées pour leur réaction à plusieurs contraintes biotiques et abiotiques des régions tropicales de basse et de haute altitude (Schmit et Baudoin, 1987 ; Baudoin, 2001).

Une attention particulière a été accordée aux comportements des plantes vis-à-vis des maladies et des ravageurs. Ces évaluations ont permis d'identifier, chez *P. coccineus* et *P. polyanthus*, toute une série de caractéristiques agronomiques intéressantes et absentes ou faiblement exprimées chez le haricot commun. Il s'agit des gènes de résistance au virus de la mosaïque dorée du haricot, à l'ascochytose, à l'anthracnose et à la mouche du haricot (Baudoin, 2001). Ces caractéristiques confèrent à ces deux espèces pures un intérêt pour la sélection variétale du haricot.

Les croisements réalisés au sein du complexe d'espèces *Phaseolus* : *P. vulgaris*-*P. polyanthus*-*P. coccineus* ont permis de mieux appréhender les problèmes liés à l'introgression de caractères intéressants chez *P. vulgaris*.

Les croisements utilisant *P. vulgaris* comme parent femelle sont relativement faciles à réaliser, mais ils se soldent par une perte progressive des caractères du parent mâle (*P. coccineus* ou *P. polyanthus*). Par contre, dans les croisements réciproques, la transmission des caractères est meilleure, mais un avortement des embryons hybrides se manifeste de manière systématique, plus au moins rapidement selon les génotypes parentaux (Baudoin *et al.*, 1992 ; Lecomte, 1997 ; Lecomte *et al.*, 1998 ; Geerts, 2001 ; Geerts *et al.*, 2002 ; Baudoin *et al.*, 2004 ; Silué, 2009 ; Abid, 2011). Les observations des coupes fines ont montré que ces avortements s'expliqueraient, entre autres, par la différence entre les cellules basales du suspenseur de *P. vulgaris* et celles des espèces *P. polyanthus* (Lecomte, 1997 ; Lecomte *et al.*, 1998) et *P. coccineus* (Abid, 2011). Cette différence entre les suspenseurs de génotypes parentaux pourrait induire des troubles dans la coordination des processus liés à la nutrition des embryons hybrides *P. polyanthus* ou *P. coccineus* (♀) x *P. vulgaris* (Lecomte, 1997 ; Abid, 2011).

Les recherches sur le plan moléculaire ont permis d'identifier des ADNc différemment exprimés dans les graines en voie d'avortement, chez les hybrides *P. coccineus* x *P. vulgaris*, et ce en utilisant la technique de l'Hybridation Soustractive Suppressive (HSS). Ces ADNc interviendraient dans le développement cellulaire et embryonnaire (Silué, 2009 ; Abid, 2011). Il s'agit des ADNc qui codent, d'une part, pour le cytochrome $p450$, la myo-inositol 1-phosphate synthase, la peroxydase cationique, le *voltage-dependent anion channel* et la sucrose synthase (Silué, 2009) et, d'autre part, pour le "storage protein activator" (SPA), le "pentatricopeptide repeat-containing protein" (PPR) et l'acetyl-CoA carboxylase (ACCase) (Abid, 2011).

Toutefois, le recours à l'embryoculture permet d'obtenir un développement complet des hybrides. Le sauvetage d'embryons présumés hybrides, isolés de l'ovule aux stades de développement cordiforme âgé ou cotylédonaire, a permis d'obtenir des pourcentages de 1,4% et 1,2% de réussite, respectivement pour les croisements *P. polyanthus* (♀) x *P. vulgaris* (Camarena, 1988) et *P. coccineus* (♀) x *P. vulgaris* (Nassar, 1978). Par contre, aucune plantule hybride n'a pu être régénérée à partir des embryons au stade globulaire (Lecomte, 1997). A ce stade de développement précoce, on assiste à un grand nombre d'avortements (Lecomte, 1997), d'où l'intérêt de mettre au point un protocole de sauvetage d'embryons globulaires afin d'améliorer le taux de régénération des hybrides *P. polyanthus* ou *P. coccineus* (♀) x *P. vulgaris*.

Nous avons orienté notre analyse bibliographique vers l'étude du développement des embryons *in situ* chez les Angiospermes en général, afin d'identifier les facteurs nutritifs et environnementaux qui interviennent au cours de l'embryogenèse *in situ*. Ces connaissances nous permettraient de concevoir et de mettre en œuvre des techniques et des milieux de culture *in vitro* plus adéquats d'embryons globulaires de *Phaseolus*.

I. 1. 5. Embryogenèse chez les Angiospermes

I. 1. 5 1. Rappel des principales caractéristiques des Angiospermes

Les Angiospermes, plus connues sous le nom de *plantes à fleurs*, sont des plantes vasculaires à graines qui fabriquent des structures reproductrices appelées *fleurs* et *fruits*. Elles se nomment Angiospermes (du grec *angion*, « contenant ») car leurs graines sont contenues dans des fruits, les ovaires matures (Campbell et Reece, 2007).

I. 1. 5. 2. Formation et développement de l'embryon chez les Angiospermes

L'embryogenèse débute par une double fécondation donnant deux zygotes à l'intérieur du sac embryonnaire : le zygote principal diploïde (2n) et le zygote accessoire triploïde (3n). Ces zygotes subissent des divisions cellulaires selon un plan bien organisé menant respectivement à la croissance et à la différenciation de l'embryon et de l'albumen.

I. 1. 5. 2. 1. La double fécondation

La double fécondation (Fig. 1) est un phénomène caractéristique des Angiospermes, qui donne naissance à deux zygotes à l'origine de la graine. Après transfert du pollen sur le stigmate (pollinisation), le grain de pollen absorbe de l'eau présente à sa surface et, une fois hydraté, il peut germer et former un tube pollinique qui s'insinue dans le style jusqu'à l'ovaire (Fig. 1A).

Au niveau de l'ovaire, le tube passe par le micropyle pour atteindre l'ovule (Fig. 1B), où il y dépose deux spermatozoïdes qui interviennent, l'un dans la fécondation de l'oosphère en donnant le zygote principal diploïde ($2n$) devant évoluer en embryon, pendant que l'autre s'unit aux deux noyaux « polaires » de la cellule centrale pour donner un zygote accessoire triploïde ($3n$) qui évoluera rapidement en albumen (Fig. 1C). Ce dernier constitue un tissu nourricier destiné à fournir les éléments nutritifs à l'embryon.

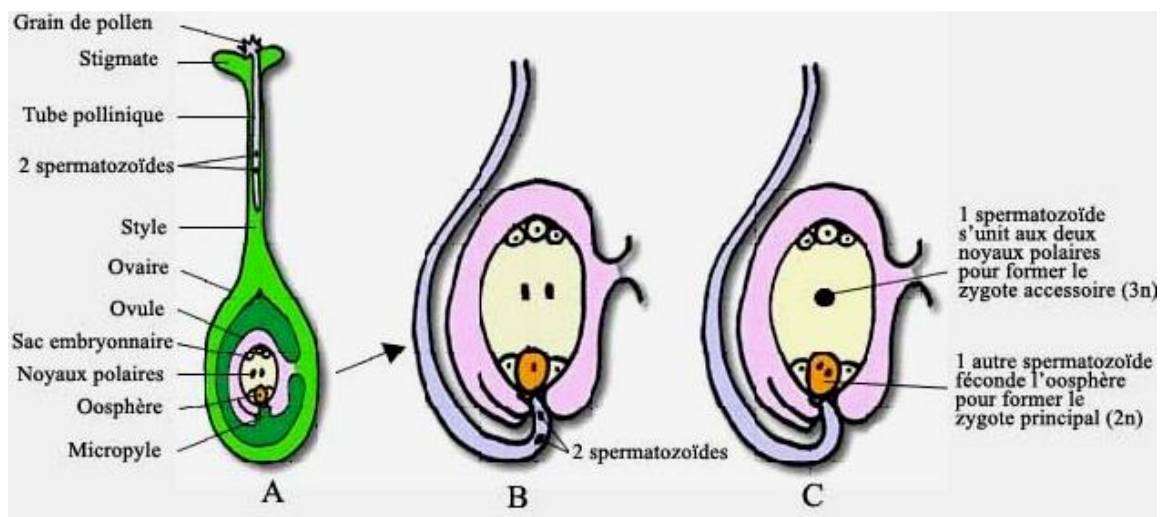


Figure 1. Représentation schématique de la double fécondation chez les Angiospermes.

A, B et C, représentent respectivement la germination du grain de pollen, la libération des deux gamètes mâles au niveau du micropyle et enfin la double fécondation dans le sac embryonnaire.

Source : C. Proulx : <http://www.colvir.net/prof/chantal.proulx>. D'après Campbell et Reece (2007) modifiée.

I. 1. 5. 2. 2. Développement du zygote principal

Les divisions successives du zygote principal, suivant un plan bien déterminé, aboutissent tout d'abord à la mise en place d'un axe apico-basal, nécessaire à l'initiation des organes, et à une organisation des tissus. Un exemple des principaux événements impliqués dans l'embryogenèse d'une plante modèle, *Arabidopsis thaliana* L., est rapporté dans les paragraphes ci-dessous.

Mise en place de la polarité apico-basale et embryogenèse

La mise en place de la polarité constitue une étape-clé de l'embryogenèse. Après la fécondation, on observe un allongement du zygote principal, suivi d'une première division asymétrique et transversale par rapport à l'axe de l'ovule. Celle-ci produit deux cellules filles : une petite cellule apicale au cytoplasme dense, métaboliquement active (Berleth et Chatfield, 2002), et une grande cellule basale allongée (Fig. 2A). Dès ce moment, l'embryon est axé et sa polarité apico-basale est complètement acquise.

Selon de nombreux auteurs (Friml *et al.*, 2003 ; Feraru et Firml, 2008), cette polarité apico-basale résulte d'une distribution asymétrique de l'auxine entre l'embryon propre et la cellule la plus apicale du suspenseur en contact. Cette distribution est réalisée grâce aux transporteurs que sont les protéines PIN3, PIN4 et PIN7.

Après la première division cellulaire, la cellule basale se divise horizontalement et conduit à une structure filamenteuse, le suspenseur, qui attache l'embryon aux tissus maternels qui l'entourent (Fig. 2B). Par contre, la cellule apicale aboutit à une structure globulaire (Fig. 2C) avec la formation des principales structures de la future plante (Fig. 2C'). On rencontre, de la périphérie au centre, une couche de cellules épidermiques, ou protoderme, les cellules du tissu fondamental constituées de la majeure partie de l'intérieur de l'embryon, et les cellules du tissu conducteur, le procambium, au centre de l'embryon.

La transition du « stade globulaire » (Fig. 2C) au stade « cordiforme jeune¹ » (Fig. 2D) s'accompagne de la formation de deux primordia cotylédonaire diamétralement opposés. L'étude de certains mutants d'*Arabidopsis*, comme shoot-meristemless (*stm*), cup-shaped cotyledon1 (*cuc1*) *cuc2* et wuschel (*wus*), a montré que plusieurs gènes interviennent dans le contrôle de cette transition (Laux *et al.*, 1996; Long *et al.*, 1996; Aida *et al.*, 1997; Mayer *et al.*, 1998; Aida *et al.*, 1999, cités par Takada *et al.*, 2001). Ces mutants ne mettent jamais en place le méristème apical caulinaire et présentent un cotylédon unique plus ou moins en forme d'entonnoir (Takada *et al.*, 2001).

Etapas post embryogenèse

Passé le stade cordiforme, l'apex embryonnaire contenant le méristème apical caulinaire (MAC) devient visible entre les cotylédons. A l'autre extrémité de l'axe embryonnaire, au point de fixation du suspenseur, apparaît également un apex embryonnaire, porteur d'un méristème apical racinaire. Tous les méristèmes et les cotylédons s'allongent ensuite, simultanément et progressivement, pour donner, successivement, un embryon au stade cordiforme âgé ou stade torpille² (Fig. 2E), puis au stade cotylédonnaire (Fig. 2F). Ces deux derniers stades de développement correspondent aux stades de maturation accompagnant l'embryogenèse. L'embryon « mature³ » (Fig. 3) comprend trois régions superposées : apicale (les cotylédons et le méristème apical caulinaire), centrale (hypocotyle) et basale (radicule).

¹ Embryon au stade cordiforme et désigné par « heart shaped stage » dans les ouvrages anglo-saxons.

² Les auteurs anglo-saxons utilisent « torpedo shaped stage » pour désigner le stade torpille ; dans notre travail, nous utilisons l'expression « cordiforme âgé ».

³ Embryons ayant formé un méristème apical caulinaire entre les cotylédons.

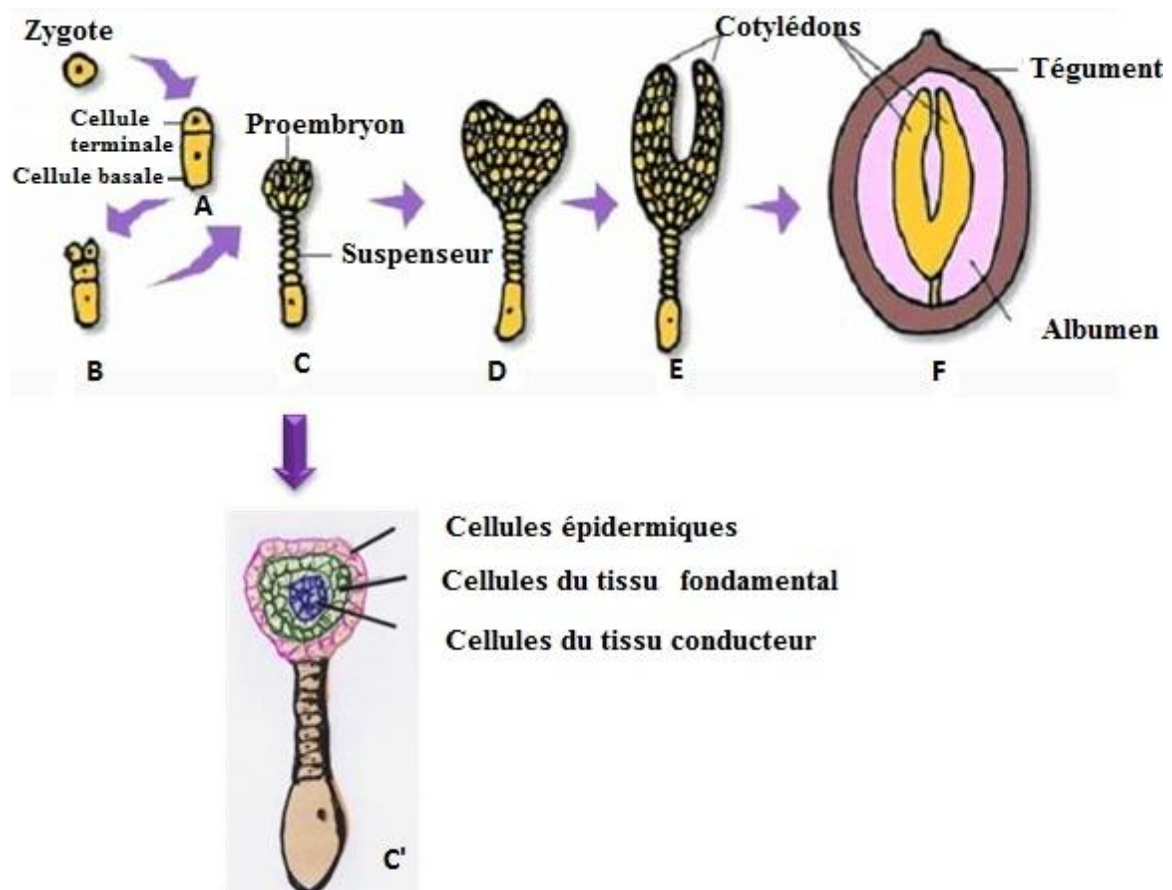


Figure 2. Principales étapes de l'embryogénèse chez une Dicotylédone.

Parmi les principales étapes du développement de l'embryon, on distingue : la première division du zygote et la mise en place de la polarité apico basale (A) ; suivie de la division des deux cellules basale et apicale (B), lesquelles subissent plusieurs divisions successives pour aboutir à un embryon globulaire (C) constitué des trois tissus fondamentaux (C') ; et ensuite à un embryon cordiforme jeune (D). Ce dernier, après maturation, donne, successivement, un embryon cordiforme âgé ou torpille (E) puis un embryon cotylédonaire (F).

Source : Proulx : <http://www.colvir.net/prof/chantal.proulx/images/reproduction/Pteridophyte-cycle.jpg&imgrefurl>, d'après Campbell et Reece (2007) et Raven *et al.* (2007).

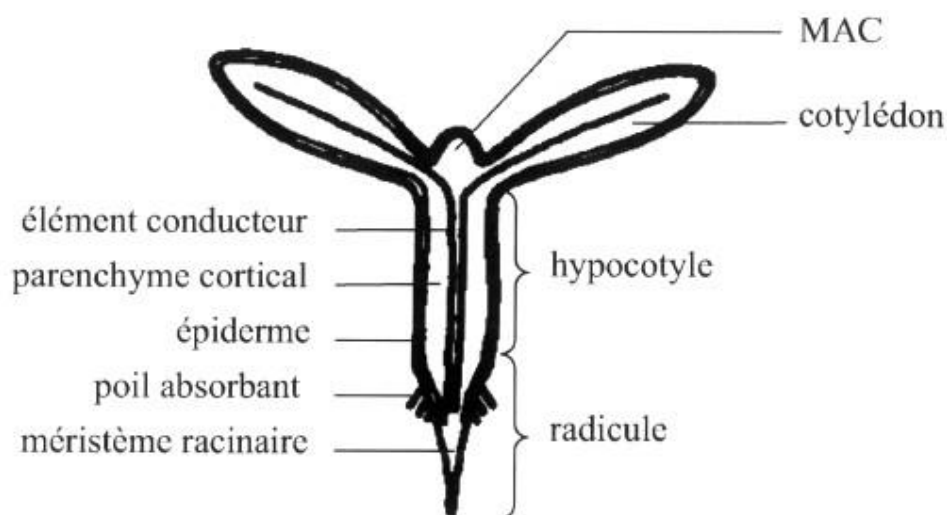


Figure 3. Représentation schématique d'un embryon mature.

MAC : méristème apical caulinaire. D'après Raven *et al.* (2007) modifié.

Ces différentes modifications morphologiques de l'embryon, observées lors de l'embryogenèse, sont souvent accompagnées d'événements biochimiques.

Nous avons signalé dans le paragraphe I. 1. 5. 2. 2. le rôle des protéines PIN3, PIN4 et PIN7 dans la mise en place de la polarité apico-basale de l'embryon. Une étude bibliographique réalisée par Umehara *et al.* (2007) montre que le développement normal de l'embryon est aussi régulé par quatre facteurs de transcription : ABI3 (ABA INSENSITIVE3), LEC1 (LEAFY COTYLEDON 1), LEC2 et FUS3 (FUSCA3). Les trois derniers facteurs sont les seuls impliqués dans l'embryogenèse et dans la phase de maturation (Holdsworth *et al.*, 1999; Harada, 2001, cités par Curaba *et al.*, 2004). Ces derniers auteurs (Curaba *et al.*, 2004) ont montré, d'une part, que LEC2 et FUS3 sont les seuls reconnus actifs durant le développement précoce de l'embryon d'*A. thaliana*, et d'autre part, que leur expression entraîne l'inhibition de la synthèse des gibbérellines (GA_1 et GA_4). Cette observation a ainsi permis de rejeter l'hypothèse selon laquelle les gibbérellines interviennent dans le développement précoce de l'embryon, comme cela avait été rapporté chez *Phaseolus*, *Tropaeolum*, et *Cytisus* (Alpi *et al.* 1975 ; Picciarelli *et al.*, 1984, cités par Umehara *et al.*, 2007).

Pendant la maturation, les divisions cellulaires s'arrêtent, la croissance de l'embryon s'effectue par élongation, et l'embryon synthétise et stocke des réserves nutritives (Fig.4).

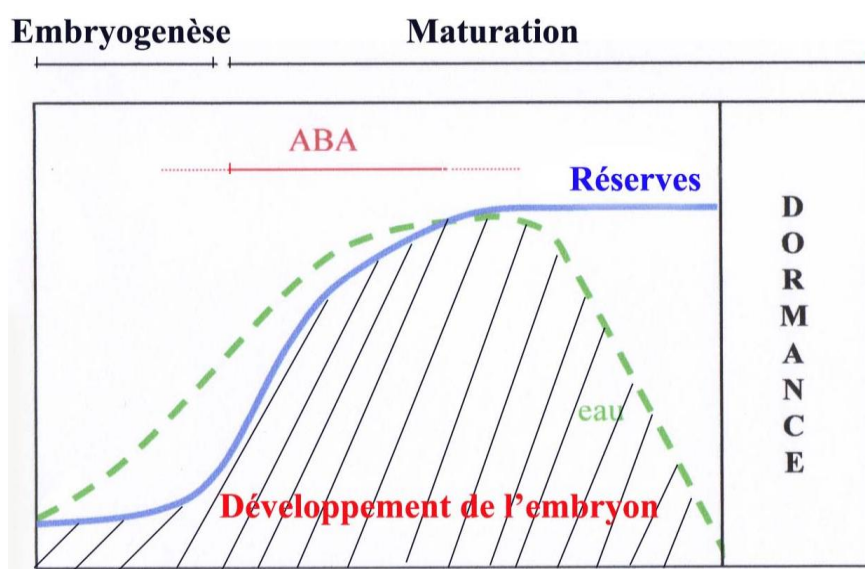


Figure 4. Représentation du niveau relatif des réserves nutritives et de l'eau durant le développement de l'embryon.

D'après Rock et Quatrano (1995, cités par Lecomte, 1997).

Ces réserves sont composées de substances diverses, comme les sucres, les lipides et les protéines (Baud *et al.*, 2002).

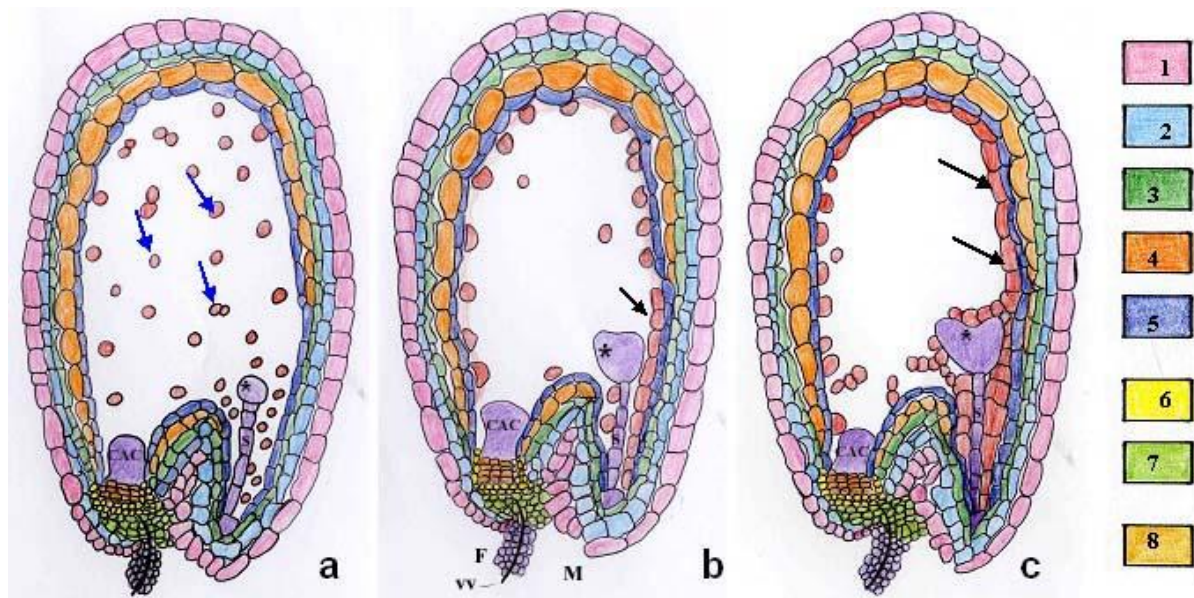
Chez les dicotylédones pourvues de cotylédons épais (ex : haricot), ces réserves nutritives sont progressivement stockées dans les cotylédons. Par contre, chez la plupart des monocotylédones (ex : maïs), ainsi que chez certaines dicotylédones pourvues de cotylédons minces (ex : ricin), des réserves subsistent encore dans l'albumen en fin de maturation de la graine (Raven, *et al.*, 2007). Dans les deux cas, ces réserves serviront à la germination et à la croissance primaire de la plantule avant le déclenchement de la photosynthèse (Berger, 2007 ; Harada et Kwong, 2007). La déshydratation de la graine en fin de maturation lui permet de survivre dans des conditions défavorables (Campbell et Reece, 2007). Cette déshydratation s'effectue sans dommage grâce à l'ABA (Umehara *et al.*, 2007). Cette dernière intervient dans le contrôle de l'expression des gènes qui correspondent à des protéines de réserve des graines et à des protéines LEA (Late Embryogenesis Abundant) qui protègent les structures cellulaires des effets de la déshydratation (Campbell et Reece, 2007).

I. 1. 5. 2. 3. Développement de l'albumen

Le développement de l'albumen chez *Arabidopsis* est illustré aux figures 5 et 6. Les divisions du zygote accessoire ($3n$) aboutissent successivement à l'albumen syncytial (ou nucléaire) puis cellulaire.

La formation du zygote accessoire est suivie rapidement par de nombreuses mitoses, sans cytokinèse, au niveau des pôles micropylaire et chalazien, produisant de nombreux noyaux libres dans un syncytium. Ces noyaux se concentrent autour de l'embryon dans la chambre micropylaire (M) au stade globulaire précoce (Fig. 5a). La cellularisation débute dès l'apparition des cotylédons à partir du pôle micropylaire M (Fig. 5b) et progresse vers la chambre chalazale (Fig. 5c). A ce niveau, l'albumen est toujours sous forme syncytiale jusqu'à un stade tardif de la maturation de la graine.

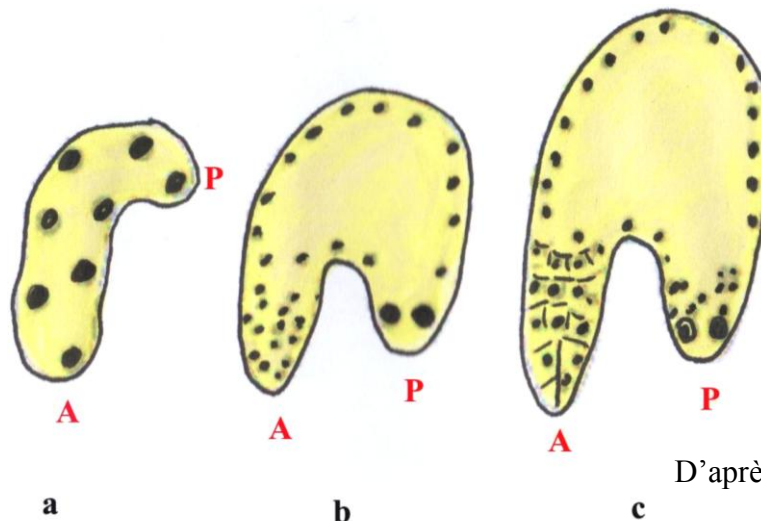
Durant la formation de l'albumen, le sac embryonnaire se recourbe jusqu'à ce que la chalaze (P) se situe en face de la région micropylaire (A) (Fig. 6).



D'après Debeaujon *et al.* (2003) modifié

Figure 5. Représentation schématique du développement de l'albumen et de l'embryon chez *Arabidopsis thaliana* L.

Représentation schématique de la coupe longitudinale d'ovules d'*Arabidopsis* âgés de 1 à 5 jours après pollinisation. Au stade pré globulaire (a), l'albumen syncytial renferme plusieurs noyaux (flèches bleues) libres dans un syncytium et regroupés autour de l'embryon (*); Le stade globulaire (b) coïncide avec la mise en place de l'albumen cellulaire (flèches noires) qui commence à partir du micropyle (M) (b) et progresse vers la chalaze (c). Abréviations : CAC : cyste d'albumen chalazal ; F : funicule ; vv : vaisseaux vasculaires ; M : micropyle ; s : suspenseur ; * position de l'embryon dans l'ovule. Légende : 1 et 2 : téguments externes ; 3, 4 et 5 : téguments internes ; 6 et 7 : chalaze ; 8 : nucelle.



D'après Berger (2007)

Figure 6. Principales étapes du développement de l'albumen chez *Arabidopsis thaliana* L.

Les sites A et P représentent les domaines mitotiques (micropylaire et chalazal, respectivement) dans l'albumen en cours de formation. Les lettres a, b et c indiquent que le sac embryonnaire se recourbe progressivement depuis le stade globulaire jeune (a) jusqu'à ce que le pôle antérieur ou micropylaire (A) et le pôle postérieur ou chalazal (P) se situent face à face aux stades globulaire tardif (b) et cordiforme jeune (c).

I. 1. 5. 3. Formation et développement de l'embryon dans le genre Phaseolus

Des coupes histologiques réalisées dans le temps après la pollinisation, chez les espèces pures *P. vulgaris*, *P. coccineus* et *P. polyanthus*, montrent que le développement de l'embryon et de l'albumen est conforme à celui des Angiospermes (Lecomte, 1997 ; Lecomte *et al.*, 1998 ; Geerts, 2001 ; Geerts *et al.*, 2002 ; Silué, 2009 ; Abid, 2011).

Les observations des coupes histologiques de l'oosphère fécondée, provenant des gousses récoltées à 1 JAP, révèlent déjà, chez *P. polyanthus*, un zygote polarisé avec un pôle supérieur contenant une petite cellule et un pôle inférieur (micropylaire) contenant une grande cellule (dominée par une grande vacuole) (Geerts, 2001 ; Geerts *et al.*, 2002). A ce stade de développement, les premières divisions de l'albumen sont conformes au type syncytial, mais lorsque l'embryon atteint le stade globulaire tardif, l'albumen syncytial en contact commence à se cloisonner pour former l'albumen cellulaire qui enveloppe l'embryon au stade cordiforme jeune (Lecomte, 1997 ; Geerts, 2001). Ce cloisonnement est plus important chez *P. polyanthus* que chez *P. vulgaris* (Lecomte, 1997). D'après Lecomte (1997), ce contact laisse supposer que l'essentiel des transferts nutritifs vers l'embryon cordiforme au départ de la plante s'effectue via un pont albumen cellulaire-suspenseur. Au stade cotylédonaire, l'albumen cellulaire disparaît progressivement de la zone micropylaire.

Les études comparatives réalisées chez trois espèces pures ont montré que l'embryon se développe plus rapidement chez *P. vulgaris* que chez *P. polyanthus* et *P. coccineus*. Entre 2 et 3 JAP, l'embryon *P. vulgaris* (G21245 et NI 637) est globulaire et comporte 16 à 24 cellules, tandis que *P. polyanthus* (NI 1015) est au stade préglobulaire avec 2 à 3 cellules (Geerts, 2001 ; Geerts *et al.*, 2002) ; à 7 JAP, les embryons atteignent le stade globulaire tardif à cordiforme jeune chez *P. vulgaris*, alors que *P. coccineus* (NI 16) est au stade globulaire précoce (Abid, 2011).

Par ailleurs, les embryons hybrides *P. polyanthus* ou *P. coccineus* (♀) x *P. vulgaris* présentent un retard de développement et des anomalies dans la formation de l'embryon et du suspenseur (Geerts *et al.*, 2002 ; Abid, 2011). Ces anomalies évoluent rapidement avec le développement de l'embryon pour aboutir à un avortement avant la maturation de la graine (Abid, 2011).

Il ressort de cette étude sur la formation et le développement embryonnaire chez les Angiospermes, y compris *Phaseolus*, que l'embryogénèse suit une série très précise d'événements cellulaires et moléculaires qui aboutissent à un embryon mature, le précurseur de la future plante. Le transport polarisé d'auxines entre le suspenseur et l'embryon durant les premiers stades de l'embryogénèse confirme l'importance de la présence d'un suspenseur durant la culture d'embryons globulaires. En conséquence, lorsque l'embryon renferme un suspenseur intact, un apport exogène d'auxines ne devrait pas être nécessaire pour la culture *in vitro*. Malheureusement, l'isolement des embryons précoces se solde souvent par la perte de leur suspenseur.

Dans le but d'augmenter les chances d'obtenir des plantes à partir des embryons globulaires, la culture d'ovules ou de gousses serait incontournable avant de procéder à l'extraction des embryons, comme cela est déjà pratiqué chez *Phaseolus* (Dherte, 1995 ; Geerts *et al.*, 2000 ; Geerts, 2001 ; Schryer *et al.*, 2005) ou chez d'autres légumineuses alimentaires appartenant, par exemple, aux genres *Trifolium* ou *Cicer* (Hałdaś et Przywara, 2002, Clarke *et al.*, 2006, respectivement). Par ailleurs, la déshydratation constitue également une étape importante du développement des graines, dans la mesure où elle aboutit à un embryon capable de germer et de développer une plante, comme rapporté durant les travaux d'embryoculture chez *Phaseolus* (Geerts *et al.*, 1999).

I. 2. Hybridation interspécifique avec recours à l'embryoculture chez quelques légumineuses alimentaires, y compris *Phaseolus*

I. 2. 1. Objectif de l'embryoculture

De nombreux programmes d'amélioration par hybridation interspécifique ont recours à l'embryoculture afin d'obtenir un développement complet d'embryons hybrides.

Ci-dessous, nous présenterons tout d'abord une synthèse des résultats de quelques travaux d'hybridations interspécifiques avec recours à l'embryoculture dans les croisements interspécifiques réalisés dans le complexe *P. vulgaris*-*P. polyanthus*-*P. coccineus*. Ensuite, nous passerons en revue les principaux travaux d'embryoculture réalisés à ce jour chez les espèces pures de *Phaseolus*, ceci afin d'identifier les

problèmes majeurs qui entravent le développement en plantules dans ce genre et notamment les difficultés rencontrées lors de la culture d'embryons au stade globulaire.

Enfin, nous analyserons les résultats des travaux d'embryoculture réalisés lors des hybridations interspécifiques au sein des cinq genres que nous avons jugé les plus pertinents (*Cajanus*, *Cicer*, *Lens*, *Lupinus* et *Trifolium*), afin d'identifier des techniques potentiellement utiles chez *Phaseolus*.

1. 2. 2. Hybridations interspécifiques avec recours à l'embryoculture chez Phaseolus

Lors des travaux d'amélioration génétique du haricot commun, les hybrides interspécifiques sont exploités pour introduire des gènes utiles naturellement absents ou faiblement exprimés au sein du pool génique primaire de *P. vulgaris*. Cette introgression est possible chez la légumineuse si les deux espèces donneuses *P. polyanthus* ou *P. coccineus* sont utilisées en tant que parents femelles. Ce sens de croisement aboutit à un avortement précoce de l'embryon qui intervient dans 60% des cas au stade de développement globulaire (Lecomte, 1997). Malheureusement, aucun hybride n'a pu être obtenu en ayant recours à la culture d'embryons globulaires. Les hybrides interspécifiques régénérés proviennent d'embryons isolés de l'ovule aux stades plus avancés, c'est-à-dire aux stades cordiforme âgé ou cotylédonaire. Les résultats obtenus lors de nombreux travaux d'embryoculture (Nassar, 1978 ; Mok *et al.*, 1978 ; Alvarez *et al.*, 1981; Shii *et al.*, 1982; Prendota, 1984; Camarena *et al.*, 1987 ; etc.) réalisés au cours des hybridations interspécifiques dans le genre *Phaseolus* ont été synthétisés par Lecomte (1997) et Geerts *et al.* (1999). Les pourcentages de régénération relevés dans la littérature oscillent entre 0 et 27% selon les croisements (Lecomte, 1997).

Compte tenu de l'échec de développement d'hybrides à partir d'embryons globulaires, de nombreux travaux d'embryoculture ont été entrepris avec les espèces pures, afin de mettre au point des protocoles appropriés au sauvetage d'embryons aux stades précoces.

I. 2. 3. Embryoculture chez les espèces pures

I. 2. 3. 1. Culture d'embryons isolés au stade cordiforme jeune

La perte du suspenseur, qui intervient souvent lors de l'extraction des embryons globulaires, a permis à de nombreux auteurs (Mergeai *et al.*, 1997 ; Lecomte, 1997 ; Geerts *et al.*, 1999 ; Geerts, 2001) de mettre au point des protocoles de culture d'embryons isolés de l'ovule au stade cordiforme jeune.

Les recherches effectuées à la Faculté de Gembloux Agro-Bio Tech ont conduit à ce jour à la mise au point de différents milieux de culture d'embryons isolés de l'ovule au stade cordiforme jeune (Annexe 1). Selon les étapes de culture, on distingue, successivement, les milieux de maturation et germination G1 (Mergeai *et al.*, 1997) ou P1 (Geerts *et al.*, 1999), le milieu G6 de déshydratation (Hu et Zanettini, 1995) et le milieu G7 de développement en plantules (Mergeai *et al.*, 1997). Ce dernier est, par la suite, modifié en deux milieux G7 : le milieu de développement en plantules désigné G7c par Geerts *et al.* (1999) et le milieu d'induction de racines désigné G7g par Geerts (2001).

Durant l'embryoculture, un embryon cordiforme jeune (Fig. 7A) est en maturation lorsqu'il augmente de volume et développe un méristème apical caulinaire, (Fig. 7B) et en germination lorsqu'il produit des primordia foliaires avec allongement de la radicule (Fig. 7C). Les plantules sont en développement ou en croissance lorsqu'elles ont formé au moins une feuille trifoliolée et plusieurs racines secondaires.

Au début, la culture d'embryons cordiformes jeunes a été réalisée avec succès grâce à la culture successive dans deux milieux mis au point chez *P. vulgaris* et *P. polyanthus* (Mergeai *et al.*, 1997). Le premier milieu G1 de maturation et germination est préparé à partir des sels minéraux B5 de Gamborg *et al.* (1968) enrichi en NH_4NO_3 (400 mg.L^{-1}), en glutamine et en hydrolysate de caséine (HC) (1 g.L^{-1} chacun). Le second milieu G7 de développement d'embryons germés se distingue de G1 par l'absence d'un complément de NH_4NO_3 aux sels B5 et par une concentration 10 fois moindre en glutamine et en hydrolysate de caséine (soit 100 mg.L^{-1} chacun).

Les modifications chimiques de ces deux milieux ont été par la suite recommandées par de nombreux auteurs (Lecomte, 1997 ; Geerts *et al.*, 1999 ; Geerts, 2001). Lecomte (1997) propose l'addition du magnésium et du calcium dans le milieu G1, dans la mesure où ce milieu ainsi modifié favorise la survie et la maturation des embryons isolés de l'ovule au stade globulaire. Tenant compte des modifications proposées par Lecomte (1997), un milieu (P1) est aussi recommandé pour la maturation et germination (Geerts *et al.*, 1999). Ce dernier milieu P1 contient les sels de Phillips *et al* (1982) plus riches en calcium et en magnésium que les sels du milieu G1 de Mergeai *et al.* (1997). Ce nouveau milieu (P1) de maturation et germination assure une croissance équilibrée des cotylédons et une amélioration de la germination des embryons cordiformes jeunes par rapport au milieu G1 (Geerts *et al.*, 1999). L'efficacité de ce milieu P1 a également été rapportée au sein d'un autre laboratoire, lors de la culture des embryons cordiformes jeunes isolés de l'ovule chez un cultivar (ICA Pijao) de *P. vulgaris* et chez deux génotypes (PI535272 et PI535272) de *P. angustissimus* (Schryer *et al.*, 2005). Toutefois, Schryer *et al.* (2005) recommandent l'addition de 1,9 μM d'ABA (acide abscissique) au milieu P1, afin d'empêcher la germination précoce des embryons cordiformes jeunes. Par contre, une concentration 20 fois plus faible (0,095 μM) de cette substance a été recommandée pour la maturation des embryons du génotype « Bico de Ouro » (ou NI 637) de *P. vulgaris* (Lecomte, 1997). Bien que cette hormone soit nécessaire à la maturation des embryons, le développement de ces derniers dépend de la présence d'un suspenseur intact (Geerts *et al.*, 1999). Le suspenseur sert non seulement à fixer l'embryon dans l'ovule, mais il représente en plus un lieu de synthèse et de transport d'hormones, comme les auxines, qui jouent un rôle considérable dans la mise en place de l'axe apico-basal durant les premières étapes de l'embryogenèse (Friml *et al.* 2003 ; Umehara *et al.*, 2007 ; Kawashima *et al.*, 2010).

Néanmoins, l'ABA devrait être retiré du milieu de culture pour que la germination proprement dite ait lieu (Lecomte, 1997). Ainsi, les embryons cordiformes jeunes en maturation transférés dans un milieu sans ABA avaient abouti à la germination chez les génotypes (NI 637 et ICA Pijao) de *P. vulgaris* et les génotypes (PI535272 et PI535272) de *P. angustissimus* (Lecomte, 1997 ; Schryer *et al.*, 2005).

Le retrait de la BAP (N6-benzylaminopurine) dans le milieu G1 de maturation et de germination a été recommandé par Lecomte (1997).

Cet auteur observe des anomalies lors de la maturation des embryons cordiformes jeunes dans le milieu G1 (contenant 0,1 μ M de BAP). Ces observations rejoignent celles de Monnier (1976) qui avait déjà souligné l'avantage du retrait des hormones en général du milieu de culture des embryons immatures de *C. bursa-pastoris*. Bridgen (1994) recommande un apport de régulateurs de croissance (auxines et cytokinines) dans les milieux d'embryoculture pour l'induction de cals. Lecomte (1997) préconise aussi le retrait de la BAP du milieu G7 de Mergeai *et al.* (1997). La présence de cette hormone (BAP) dans G7 a entraîné, dans la majorité des cas, un arrêt du développement en plantules (Lecomte, 1997). La BAP (0,1 μ M) a été cependant recommandée pour le développement *in vitro* des embryons au stade cotylédonaire chez *P. vulgaris* (Rabakoarihanta *et al.*, 1979).

L'introduction d'un milieu G6 de « déshydratation » (Hu et Zanettini, 1995) entre le milieu G1 de maturation et germination et G7 de développement en plantules a également contribué à l'amélioration de la germination des embryons cordiformes jeunes et au développement des embryons germés (Geerts *et al.*, 1999). Ces mêmes auteurs recommandent l'addition de 0,18 μ M de GA (acide gibbérellique) dans le milieu G7 de Mergeai *et al.* (1997). Ce nouveau milieu G7 enrichi en GA, ou milieu G7c, a permis d'améliorer la production des plantules à partir des embryons cordiformes jeunes (Geerts *et al.*, 1999).

L'introduction d'un milieu G7g d'induction de racines entre G6 de « déshydratation » et G7c de développement en plantules a permis de résoudre les difficultés d'enracinement des embryons germés. Ce nouveau milieu G7g se distingue du milieu G7 par l'addition de 1 μ M d'AIA (acide indole 3-acétique) (Geerts, 2001).

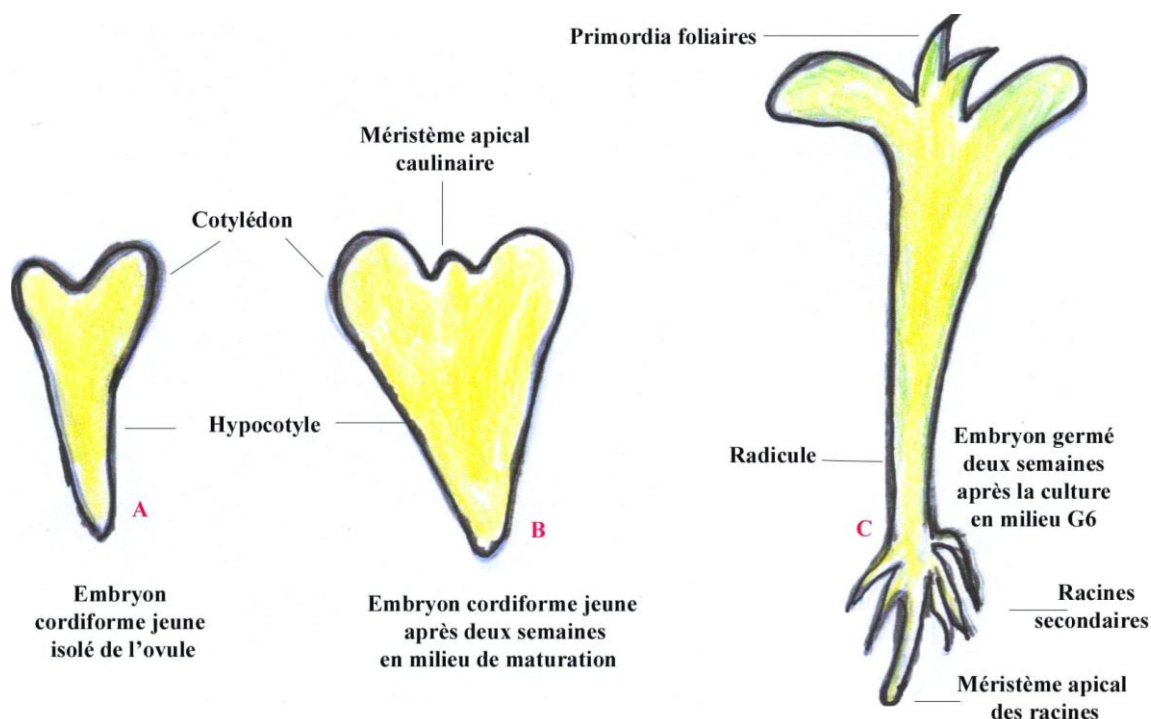


Figure 7. Représentation schématique des principaux stades du développement *in vitro* de l'embryon cordiforme jeune chez le génotype NI 637 de *P. vulgaris*.

Les observations sont effectuées à la loupe binoculaire au grossissement 25 pour les embryons cordiformes jeunes (A) et au grossissement 10 pour les embryons en maturation (B) et les embryons germés (C).

I. 2. 3. 2. Sauvetage d'embryons globulaires

Malgré les échecs rencontrés lors de la culture d'embryons globulaires isolés de l'ovule, des techniques de culture appropriées à leur développement ont été rapportées. On peut distinguer la culture en milieu à composition variable, la culture d'ovules ou la culture de gousses.

Culture en milieu à composition variable

Ce système de culture encore nommé culture en double couche a été mis au point pour la première fois lors de la culture des embryons très précoces (mesurant 50 μm de longueur) chez *Capsella bursa pastoris* Moench (Monnier, 1976). Il consiste à cultiver des embryons globulaires sur un milieu dont la composition varie au cours du temps pour rencontrer en permanence les besoins osmotiques et nutritifs de ces embryons. Ce type de culture est réalisé avec un dispositif dans lequel un ou deux milieux de composition chimique différente sont imbriqués. On assiste ainsi à une diffusion des composants minéraux et/ou organiques du milieu le plus riche vers le milieu le plus pauvre.

Ce mode de culture, réalisé sans transfert d'explants ni manipulations risquées, permet la poursuite du développement des embryons globulaires (Lecomte, 1997). Ce dernier auteur a observé le développement des embryons du stade globulaire jusqu'au stade cotylédonaire chez *P. vulgaris* en appliquant la culture en double couche dans deux milieux de maturation et germination G1 modifiés. Toutefois, un développement embryonnaire satisfaisant n'est obtenu que si la couche supérieure est dépourvue d'hormones (Lecomte, 1997)

Culture d'ovules

Des travaux préliminaires réalisés chez le génotype NI 637 de *P. vulgaris* ont montré que la culture d'embryons globulaires via la culture d'ovules isolés des gousses récoltées 4 JAP aboutit, après environ 40 jours de culture, à la germination *in ovulo* (Dherte, 1995). Selon Dherte (1995), les meilleurs taux de germination *in ovulo* ont été obtenus (8%) lorsque la culture a été réalisée dans un milieu G1 de maturation et germination enrichi en saccharose (6%). Malheureusement, la culture d'embryons isolés des ovules précultivés n'a pas permis d'obtenir de plantules. D'après Dherte (1995), l'échec dans la production des plantules serait lié à l'absence de formation de racines, comme rapporté, dans certains cas, lors de la culture d'embryons cordiformes jeunes isolés de l'ovule (Mergeai *et al.*, 1997 ; Lecomte, 1997).

Chez une plante non légumineuse, *Arabidopsis thaliana* L., Sauer et Friml (2004) ont obtenu une amélioration du développement des embryons globulaires (âgés de 1 à 2 JAP) via la culture d'ovules sur deux milieux à concentrations décroissante en saccharose ; le premier milieu est cinq fois plus riche en saccharose (10%) que le second (2%). Selon ces mêmes auteurs, l'immersion du funicule dans le milieu a été défavorable au développement des ovules et des embryons qu'ils renferment.

Culture de gousses

Une réduction progressive de la pression osmotique durant les 10 premiers jours de l'embryogenèse, dans les gousses de *P. vulgaris* et *P. polyanthus*, a permis de mettre au point une technique de culture de gousses pour les embryons globulaires (Geerts *et al.*, 2000 ; Geerts, 2001). Cette technique consiste à réaliser la culture de jeunes gousses pendant une semaine dans trois milieux à osmolarité décroissante et nommés successivement milieu P₀0 à 580 mosm, milieu P₀1 à 450 mosm et

milieu P₀1 à 350 mosm. Leur composition chimique est reprise dans le tableau 3 du paragraphe II. 2. 4. 2. 1. de la partie expérimentale. Ce procédé permet le développement, à l'intérieur des gousses, des proembryons ou embryons globulaires jusqu'au stade cotylédonaire (Geerts *et al.*, 2000 ; Geerts, 2001). D'après ces derniers auteurs, le pourcentage d'embryons en croissance est plus élevé lorsque la culture de gousses est réalisée successivement dans les trois milieux à pression osmotique décroissante comparativement à la culture dans un milieu à composition unique P₀1 à 350 mosm. Ce dernier mode de culture de gousses en milieu unique P₀1 à 350 mosm est néanmoins recommandé au sein d'un autre laboratoire par Schryer *et al.* (2005). Ces derniers ont observé à l'extraction des embryons nécrosés lorsque la culture est réalisée dans les trois milieux à pression osmotique décroissante chez un cultivar (ICA Pijao) de *P. vulgaris* et deux génotypes (PI535272 et PI535272) de *P. angustissimus*. En revanche, le milieu unique (P₀1) à 350 mosm a favorisé le développement des proembryons jusqu'au stade cordiforme jeune.

Après la culture de gousses, la culture d'embryons isolés de l'ovule, successivement dans les milieux G1 (ou P1), G6, G7g et G7c (Annexe 1), a permis pour la première fois d'obtenir des plantules à partir de la culture d'embryons globulaires chez un génotype (NI 637) de *P. vulgaris*.

Malheureusement, l'absence de formation des racines et l'arrêt du développement des embryons germés ont limité à un pourcentage de 3% le taux de plantules régénérées (Geerts *et al.*, 2000; Geerts, 2001). Toutefois, Schryer *et al.* (2005) ont obtenu un taux de développement en plantules 4 fois plus élevé par rapport à Geerts *et al.* (2000) et Geerts (2001), lorsque la culture d'embryons globulaires (via la culture préalable de gousses) est combinée au microgreffage *in vitro* (Gulati *et al.* 2001), comme nous l'avons illustré dans la figure 8.

Par ailleurs, le milieu liquide a favorisé la croissance de jeunes gousses (récoltées à 4 JAP) et celle des ovules qu'elles renferment, et par conséquent des embryons extraits, par rapport au milieu gélosé, chez *P. vulgaris*, mais c'était l'inverse chez *P. polyanthus* (Toussaint *et al.*, 2002). Selon de nombreux auteurs (Raghavan, 1977 ; Etienne et Berthouly, 2002), les performances du milieu liquide s'expliqueraient par le fait que ce milieu facilite les échanges avec l'embryon.

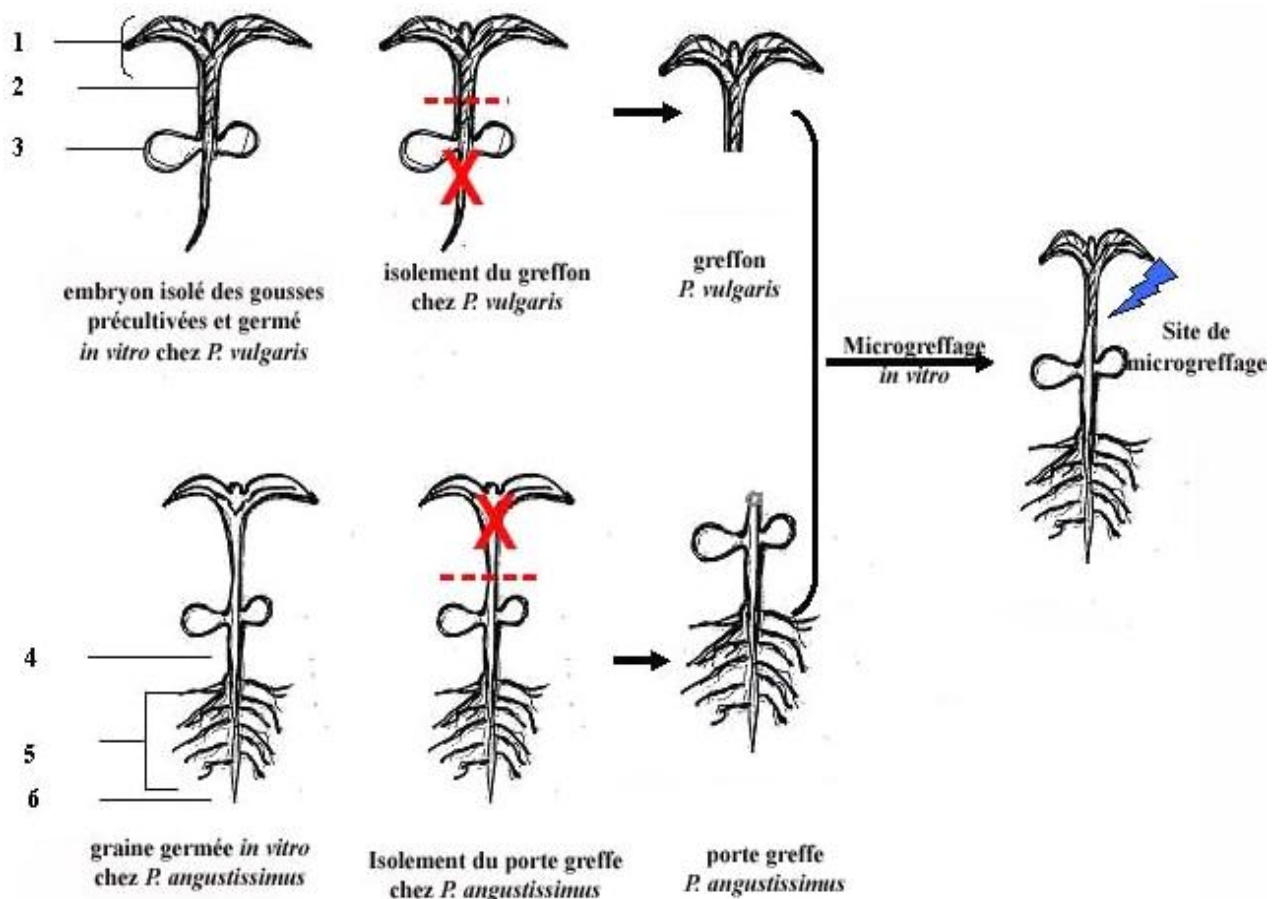


Figure 8. Représentation schématique des différentes étapes du microgreffage *in vitro* selon le protocole de Gulati *et al.* (2001).

Les légendes de 1 à 6 correspondent respectivement à l'apex des tiges, l'épicotyle, le cotylédon, l'hypocotyle, les racines et l'apex racinaire. X indique la suppression d'un organe. Schéma Barikissou

Les travaux de Schryer *et al.* (2005) confirment les difficultés d'enracinement *in vitro* dans le genre *Phaseolus*. Une analyse des résultats des travaux d'embryoculture, réalisés durant les croisements interspécifiques chez d'autres légumineuses alimentaires appartenant aux genres *Lens*, *Cicer*, *Lupinus*, *Cajanus* et *Trifolium*, nous permettrait d'identifier des techniques potentiellement utiles pour un développement harmonieux des plantules *in vitro* chez *Phaseolus*.

I. 2. 4. Utilisation de l'embryoculture au cours des hybridations interspécifiques chez différentes légumineuses alimentaires

Les milieux utilisés pour la culture *in vitro* des embryons sont généralement mis au point à partir des solutions minérales des milieux de références, comme les milieux MS de Murashige et Skoog (1962), B5 de Gamborg *et al.* (1968), ML-6 de Kumar *et al.* (1988) et P de Phillips *et al.* (1982). Leur composition minérale est rapportée en annexe 2.

I. 2. 4. 1. Hybridations interspécifiques dans le genre Lens

Cohen *et al.* (1984) furent les premiers à obtenir des plantes hybrides avec l'aide de l'embryoculture, lors de croisements interspécifiques entre la lentille cultivée, *Lens culinaris* L. (♀), et les lentilles sauvages, comme *L. nigricans* ssp. *ervoides* (Brign.) Lad. ou *L. nigricans* (M. Bieb.) ssp. *nigricans* Godr. La technique de sauvetage des embryons hybrides a consisté à réaliser la culture d'ovules, suivie de la culture d'embryons isolés de l'ovule sur deux milieux à teneur décroissante en saccharose. Les ovules âgés de 14 JAP (renfermant des embryons au stade cordiforme jeune) sont cultivés dans un premier milieu MS enrichi en saccharose (10%) jusqu'à la germination *in ovulo*. Ensuite, les embryons germés sont transférés dans un second milieu MS à teneur réduite en saccharose (3%) jusqu'à leur développement en plantules.

Avec les embryons au stade plus avancé, stade cotylédonaire, Fratini *et al.* (2006) recommandent un milieu unique et à faible teneur en saccharose (1%) aussi bien pour la culture d'ovules que pour la culture d'embryons extraits de l'ovule précultivé. Ces auteurs observent l'apparition de cals hyperhydriques au niveau de la zone racinaire des plantules régénérées, lorsque la culture est réalisée selon le protocole de Cohen *et al.* (1984) qui se caractérise par 3% de saccharose dans le milieu de culture d'embryons germés isolés de l'ovule. Ces troubles n'apparaissent pas avec 1% de saccharose. Cette étude révèle l'importance d'une réduction de la teneur en saccharose dans le milieu d'enracinement ou de développement en plantules (Franklin *et al.*, 1991).

Par ailleurs, des travaux réalisés chez différents cultivars de l'espèce cultivée *L. culinaris* ont montré que les méristèmes axillaires du nœud cotylédonaire des embryons germés sont actifs dans la régénération adventive *in vitro* (Polanco et Ruiz, 2001). Ces embryons germés sont obtenus à partir de la culture d'ovules renfermant des embryons au stade cordiforme jeune. La régénération adventive a été réalisée avec le milieu MS renfermant différentes combinaisons hormonales selon le cultivar. Les pousses régénérées ont été enracinées dans un milieu MS relativement enrichi en auxines (AIA), notamment chez le cultivar Verdina dont des pousses avaient été préalablement induites dans un milieu MS renfermant l'ANA. Ce contact préalable avec l'ANA aurait favorisé l'enracinement.

*I. 2. 4. 2. Hybridations interspécifiques dans le genre *Cajanus**

Des hybrides interspécifiques ont été obtenus grâce à l'embryoculture dans les croisements entre le pois cajan (*C. cajan* (L.) Millspaugh utilisé comme parent mâle (♂)) et une espèce sauvage appartenant à son pool génique secondaire *C. acutifolius* (F. Muell) van der Maesen. (Mallikarjuna *et al.*, 2002) ou à son pool génique tertiaire *C. platycarpus* (Benth.) Maesen. (Mallikarjuna *et al.*, 2006). Le sauvetage des embryons hybrides a été réalisé via la culture d'embryons au stade cotylédonaire et suivant les protocoles de Mallikarjuna *et al.* (1995 ; 1998). Ces deux protocoles ont la particularité d'intégrer une étape d'induction ou de multiplication de pousses, afin d'augmenter la probabilité de régénérer des hybrides interspécifiques et de compenser le faible effectif d'embryons hybrides pouvant atteindre les stades cordiforme âgé ou cotylédonaire. Les pousses adventives hybrides *C. cajan* x *C. acutifolius* sont enracinées séparément après leur transfert dans un milieu MS contenant un mélange d'auxines (ANA et AIB) (Mallikarjuna *et al.* 1998 ; 2002). Par contre, l'enracinement des pousses adventives hybrides *C. cajan* x *C. platycarpus* est obtenu après leur transfert dans le même milieu d'enracinement MS mais dix fois moins concentré en sels minéraux et en auxines (Mallikarjuna *et al.*, 1995 ; Mallikarjuna *et al.*, 2006).

I. 2. 4. 3. Hybridations interspécifiques dans le genre Trifolium

Les hybrides interspécifiques sont obtenus à partir de la culture d'embryons cordiformes jeunes et grâce à une étape d'induction ou de multiplication de pousses similaire à celle réalisée dans le genre *Cajanus*. Dans ce cas, l'enracinement des plantules hybrides adventives est obtenu après leur transfert dans un milieu à la fois moins riche en sels minéraux et en saccharose (Roy *et al.*, 2004).

Les travaux d'embryoculture réalisés chez l'espèce autofécondée *Trifolium repens* L. ont montré que la culture en double couche de Monnier (1976) et la culture d'ovules favorisent le développement des proembryons jusqu'au stade cotylédonaire (Hałdaś et Przywara, 2002), comme rapporté chez *Phaseolus* (Lecomte, 1997).

I. 2. 4. 4. Hybridations interspécifiques dans le genre Lupinus

La production d'hybrides interspécifiques est difficile à réaliser (Vuillaume et Hoff, 1986a ; Wilson *et al.*, 2008). Néanmoins, quelques résultats intéressants obtenus chez 5 espèces (*L. albus* L., *L. mutabilis* Sweet, *L. luteus* L., *L. angustifolius* L., et *L. polyphyllus* Lindl.) autofécondées méritent d'être soulignés.

Chez l'espèce autofécondée *L. albus*, Vuillaume et Hoff (1986b) ont réalisé la culture d'ovules ou de demi-ovules afin d'obtenir, à l'extraction, des embryons plus âgés plus aptes à la culture *in vitro*. Seuls les ovules contenant des embryons au stade cordiforme jeune ont poursuivi leur croissance *in vitro*. Les ovules ont été cultivés sur un support papier filtre formant un pont au-dessus d'un milieu MS liquide en présence d'un mélange des deux hormones : l'ANA et la BAP. Par contre, les demi-ovules ont été noyés dans le même milieu MS gélifié en absence d'hormones et à faible teneur en agar-Difco (5 g.L⁻¹). Chez une espèce non légumineuse : *Alstroemeria* L., une germination maximale des proembryons hybrides a été obtenue pour des demi-ovules cultivés en milieu liquide (Buitendijk *et al.*, 1995). Par ailleurs, l'absence d'hormones s'est aussi révélée favorable, non seulement à la germination, mais aussi au développement en plantules des embryons isolés de l'ovule aux stades cordiforme âgé ou cotylédonaire, chez deux espèces autofécondées (*L. albus* et *L. mutabilis*). Toutefois, la survie des plantules obtenues durant les travaux réalisés dans le genre *Lupinus* dépend du génotype. Chez *L. mutabilis*, les plantules se développent normalement, tandis que chez *L. albus* les plantules jaunissent rapidement et meurent.

D'après Vuillaume et Hoff (1986b), ce jaunissement est attribué à la teneur en calcium du milieu MS. La culture des 5 espèces (précitées) de *Lupinus* dans le milieu liquide moins riche en calcium par rapport au milieu MS, c'est-à-dire le milieu B5 de Gamborg *et al.* (1968) concentré 1,5 fois (Kasten et Kunert, 1991), favorise le développement à terme des embryons cordiformes jeunes chez ces 5 espèces. Ces derniers travaux révèlent l'existence d'une interaction entre le génotype et le milieu de culture.

La culture en milieu liquide de Kasten et Kunert (1991) consiste à fixer les embryons sur un support solide (milieu B5 solidifié avec 7 g.L⁻¹ d'agar-Difco) au-dessus duquel est déposée une fine couche de milieu liquide. Cette fixation sur milieu gélosé faciliterait le repérage des embryons cultivés en milieu liquide.

L'addition de l'ABA (utilisé à faible concentration) dans le milieu de Kasten et Kunert (1991) a contribué au développement des embryons cordiformes jeunes en inhibant la germination précoce, rencontrée en milieu liquide. Des effets identiques à l'ABA dans la réduction de la germination précoce ont été rapportés avec le même milieu de Kasten et Kunert (1991) sans ABA, mais enrichi en saccharose (90 g.L⁻¹) chez l'espèce autofécondée *L. angustifolius* (Wilson *et al.*, 2008). Cela rejoint l'hypothèse selon laquelle le saccharose intervient dans l'inhibition de la germination précoce par augmentation de la pression osmotique du milieu de culture (Smith, 1971, cité par Lecomte, 1997). Ces deux derniers travaux, indépendamment l'un de l'autre, confirment l'action de la pression osmotique et de l'ABA dans les mécanismes de la maturation (Xu et Bewley, 1995, cités par Lecomte, 1997).

L'échec dans la création d'hybrides interspécifiques au sein du complexe *L. albus* - *L. mutabilis* - *L. luteus* - *L. angustifolius* - *L. polyphyllus* (Vuillaume et Hoff, 1986a ; Wilson *et al.*, 2008) s'explique par l'absence de fécondation. Cette barrière pré zygotique serait liée à la différence des formules chromosomiques (2n = 40 pour *L. angustifolius*, 2n = 52 pour *L. luteus* ; 2n = 50 pour *L. albus* et 2n = 48 pour *L. mutabilis* et *L. polyphyllus*) et à la distance phylogénétique entre les différentes espèces parentales (Crouch *et al.*, 2005, cités par Wilson *et al.*, 2008).

I. 2. 4. 5. Hybridations interspécifiques dans le genre *Cicer*

Les croisements entre certains génotypes de l'espèce cultivée *C. arietinum* L. (♀) et deux génotypes (ICCW 37 et 38) d'une espèce sauvage *C. pinnatifidum* Jaub. et Spach. appartenant à son pool génique tertiaire ont été réussis grâce au recours à l'embryoculture selon le protocole de Mallikarjuna (1999). Pour atteindre le stade cotylédonaire des embryons, Mallikarjuna (1999) applique *in situ* une solution qui contient un mélange de régulateurs de croissance (ANA KN* et GA₃) sur le pédoncule des fleurs du parent femelle *C. arietinum*. La culture d'ovules (contenant des embryons au stade cotylédonaire), suivie de la culture d'embryons isolés de l'ovule, a été réalisée avec succès en milieu liquide sur un support papier filtre formant un pont au-dessus du milieu liquide. Le milieu utilisé *in vitro* est le milieu ML-6 de Kumar *et al.* (1988) en présence d'un mélange des deux hormones : AIA et ZEA (zéatine). Le retrait des deux composés a été indispensable au développement en plantules à partir des embryons isolés de l'ovule, comme cela avait été rapporté chez *Phaseolus* et *Lupinus* (Lecomte, 1997 ; Vuillaume et Hoff, 1986b, respectivement). Cependant, dans le genre *Cicer*, la production des hybrides interspécifiques *C. arietinum* (♀) x *C. pinnatifidum* dépend de l'enracinement *in vitro* des plantules à acclimater.

Dans le but d'améliorer le taux de réussite des hybrides, Mallikarjuna *et al.* (2007; 2008) ont eu recours à des étapes d'enracinement supplémentaires par rapport au protocole de Mallikarjuna (1999). Dans les croisements entre *C. arietinum* et l'espèce sauvage *C. bijugum* K.H.Rech., les pousses régénérées et peu enracinées ont été transférées pendant une courte durée (5 jours) dans un milieu ML-6 enrichi en AIB (acide indole butyrique) avant d'être cultivées dans un milieu ML-6 d'enracinement sans hormone (Mallikarjuna *et al.*, 2007). Pour les croisements entre *C. arietinum* et *C. pinnatifidum*, des plantules avec un système racinaire important sont obtenues après microgreffage *in situ* (Mallikarjuna *et al.*, 2008). Ce dernier système d'enracinement des pousses *in situ* est similaire au microgreffage *in vitro* (Gulati *et al.*, 2001) illustré à la figure 8. Le microgreffage *in situ* consiste à transférer le greffon issu de la pousse hybride régénérée *in vitro* sur l'épicotyle du porte-greffe (ou pousse enracinée) obtenu par germination *in situ* des graines de l'espèce cultivée *C. arietinum*.

* KN : kinétine

Il ressort de l'analyse des résultats des travaux d'embryoculture chez les cinq genres *Lens*, *Cajanus*, *Trifolium*, *Lupinus* et *Cicer*, que la technique de culture d'ovules constitue la principale voie pour aboutir à la production des hybrides interspécifiques, à condition que les embryons qu'ils renferment aient atteint les stades cordiforme ou cotylédonaire. Ce dernier stade de développement embryonnaire peut être atteint *in situ* par l'application de régulateurs de croissance à la pollinisation afin de retarder l'avortement précoce des embryons. Ce traitement hormonal *in situ* permet, dans certains cas, d'augmenter les chances de régénérer des hybrides interspécifiques en améliorant l'effectif des embryons hybrides pouvant atteindre le stade cotylédonaire requis pour le sauvetage *in vitro*. Dans d'autres cas, les probabilités d'obtenir les hybrides interspécifiques ont été améliorées par une étape supplémentaire d'embryoculture, la régénération adventive des pousses. Cette dernière étape est réalisée afin de compenser le faible effectif d'embryons pouvant atteindre naturellement le stade cotylédonaire. Les pousses sont généralement induites à partir des méristèmes axillaires du nœud cotylédonaire.

Concernant l'enracinement, il a lieu, dans certains cas, après le transfert des pousses adventives dans un milieu pauvre, soit en saccharose ou en sels minéraux, soit pour les deux composantes à la fois. Dans d'autres cas, l'enracinement a lieu après un bref contact des explants avec des auxines plus stables que l'AIA (ANA ou AIB), avant de les transférer dans un milieu d'enracinement avec ou sans hormones. Les plantules enracinées sont également obtenues par microgreffage *in vitro* ou *in situ*.

I. 3. Régénération *in vitro* par organogénèse dans le genre *Phaseolus*

Tenant compte des difficultés d'enracinement rapportées antérieurement lors de la culture d'embryons globulaires de *P. vulgaris* (NI 637) (Geerts *et al.*, 2000 ; 2001), nous avons orienté notre étude bibliographique sur la régénération des plantes à partir d'explants autres que l'embryon. La littérature révèle de nombreux travaux de régénération de plantes à partir d'explants isolés des graines, comme l'apex des tiges, l'axe embryonnaire, les cotylédons ou les bourgeons axillaires du nœud cotylédonaire. Une analyse des résultats de quelques travaux réalisés dans ce domaine est rapportée ci-après.

Allavena et Rossetti (1983) ont obtenu, avec succès, des plantules adventives par microbouturage de nœuds cotylédonaire (NC), issu des graines germées *in vitro*, dans un milieu MS, chez deux cultivars (Bico de Ouro provenant du Brésil et Lodino provenant d'Italie) de *P. vulgaris*. Toutefois, cette régénération adventive dépend du génotype et de la teneur en sels du milieu. Le milieu MS normal s'est révélé plus efficace que le même milieu mais dont les sels azotés sont réduits d'un quart. La régénération a été plus efficace chez le cultivar Bico de Ouro que chez Lodino de *P. vulgaris*.

Chez deux espèces différentes, *P. coccineus* et *P. vulgaris*, la régénération à partir du nœud cotylédonaire a été plus efficace chez *P. coccineus* (Santalla *et al.*, 1998). L'absence de régénération chez certains cultivars de *P. vulgaris* est attribuée à la formation de cals à la base des pousses induites (Allavena et Rossetti, 1983 ; Santalla *et al.*, 1998). Le potentiel morphogénétique du nœud cotylédonaire chez *P. coccineus* a été confirmé lors des travaux de régénération réalisés avec le cultivar Judi3n de la Granja (d'Espagne) de *P. coccineus* (Vaquero *et al.*, 1993). Ces derniers auteurs ont directement régénéré des plantules à partir du microbouturage de nœuds cotylédonaire dans un milieu MS d3pourvu d'hormones. Cependant, les hormones (auxines et cytokinines) ont été n3cessaires à l'induction et à la multiplication des pousses adventives.

Delgado-S3nchez *et al.* (2006) ont aussi observ3 un effet g3notype lors de la r3g3n3ration des pousses à partir de l'axe embryonnaire chez *P. vulgaris*. Les plantules ont 3t3 r3g3n3r3es *in vitro* dans un milieu MS chez le cultivar Flor de Junio Marcela (FJM) mais pas chez Flor de Mayo Anita (FMA). Cependant, la r3g3n3ration a 3t3 possible chez ce dernier et chez d'autres cultivars (Apetito G13637, ICA Palmar G4523 et Pinto Saltillo) de *P. vulgaris*, en remplaçant les sels du milieu MS par les sels du

milieu B5 de Gamborg (Quintero-Jiménez *et al.*, 2010).

Outre l'influence de la composition minérale du milieu rapportée par ces derniers auteurs, les travaux réalisés par Delgado-Sánchez *et al.* (2006) et Quintero-Jiménez *et al.* (2010) révèlent aussi une interaction entre le génotype et la composition minérale du milieu de culture.

Tenant compte des difficultés d'enracinement *in vitro* souvent rapportées chez *P. vulgaris*, de nombreux auteurs (Zambre *et al.*, 1998 ; Arellano *et al.*, 2009 ; Kwapata *et al.*, 2010) ont eu recours à différentes voies d'enracinement.

Dans l'expérimentation de Zambre *et al.* (1998), les plantules du génotype de *P. acutifolius* ont montré un meilleur développement racinaire, comparé aux plantules du génotype de *P. vulgaris*. Ces dernières ont produit des racines après microgreffage *in vitro* du greffon du génotype *P. vulgaris* sur un porte-greffe du génotype de *P. acutifolius*.

Dans l'expérimentation d'Arellano *et al.* (2009), les pousses régénérées par organogénèse indirecte à partir du microbouturage de nœuds cotylédonaire chez plusieurs cultivars de *P. vulgaris* ont formé des racines directement après leur transfert dans un milieu (MS) à teneur relativement faible en ANA (0,054 μ M). Toutefois, la réussite de leurs travaux s'explique par la présence d'un fragment de cal à la base racinaire des pousses à enraciner, d'une part, et par l'ajout d'un absorbant (PVP-360 ou Polyvinylpyrrolidone de poids moléculaire 360) dans les milieux précédant l'enracinement (le milieu de germination des graines et celui d'induction et de croissance des pousses adventives), d'autre part. La formation du cal est un préalable à l'enracinement *in vitro*, comme cela a été montré par Ozyigit (2008) chez le cotonnier (*G. hirsutum*). Chez *Phaseolus*, le PVP-360 a été indispensable à l'enracinement en réduisant le brunissement du milieu de culture. Des effets analogues au PVP-360 sont également observés avec le charbon actif (CA) chez d'autres cultivars de *P. vulgaris* (Kwapata *et al.*, 2010).

Le brunissement *in vitro* résulte de l'action des enzymes oxydases, telles que les polyphénols oxydases, du fait des blessures occasionnées, par exemple, lors du prélèvement des explants (Lerch, 1981, cité par El Yacoubi *et al.*, 2010). Dans les conditions naturelles, les produits de dégradation des polyphénols, responsables du brunissement de la blessure, sont lessivés par la pluie. Malheureusement, en culture *in*

vitro, les explants émettent ces substances toxiques dans un milieu fermé, avec pour conséquence la toxicité des explants (Maier et Metzlier, 1965 ; Loomis et Battaile, 1966, cités par El Yacoubi *et al.*, 2010).

Le charbon ou le PVP-360 agiraient en culture *in vitro* par absorption de ces substances toxiques. C'est par exemple le cas chez *P. vulgaris* (Arellanao *et al.*, 2009 ; Kwapata *et al.*, 2010) ou chez d'autres légumineuses, comme *Acacia mearnsii* De Wild. (Quoirin *et al.*, 2001) ou *Vicia faba* L. (Abdelwahd *et al.*, 2008).

Notre étude bibliographique sur la régénération des plantes par microbouturage d'explants isolés des graines montre que le nœud cotylédonaire, l'axe embryonnaire ou l'apex permettent de régénérer efficacement des plantes chez *Phaseolus*. La régénération dépend de la solution minérale du milieu utilisé et de l'espèce et/ou du génotype en présence. Elle est plus efficace chez *P. coccineus* que chez *P. vulgaris*. Chez cette seconde espèce, la formation de cals bruns constitue un obstacle à l'enracinement ou à la régénération *in vitro*, comme rapporté lors de l'embryoculture. Ces cals bruns sont réduits en présence des substances absorbantes (PVP-360 ou CA). Ces dernières favorisent ainsi la croissance des pousses induites.

I. 4. Enracinement *in vitro* chez différentes espèces végétales

Compte tenu de l'importance des racines pour la régénération des plantes chez *Phaseolus*, nous avons analysé, chez d'autres espèces, les travaux portant sur les voies d'enracinement *in vitro*.

I. 4. 1. Enracinement *in vitro* par application d'auxines

En général, l'application d'auxines (AIA, ANA, IBA) favorise l'induction des racines adventives, mais cela dépend de la nature de l'auxine. Chez *Vigna*, Kouadio (2007) a obtenu 100% de plantules enracinées dans le milieu (G7c) de développement des embryons germés en plantules, mis au point par Geerts *et al.* (1999), après un contact préalable des embryons germés dans le milieu (G7g) d'induction de racines, développé par Geerts (2001) : ce milieu contient de l'ANA à la place de l'AIA. Aucun enracinement n'a été obtenu avec ce même milieu d'induction contenant l'AIA.

Les effets positifs d'un traitement préalable à l'ANA ont également été signalés avec les pousses adventives provenant des embryons cordiformes jeunes chez *Lens culinaris* Mill. (Polanco et Ruiz, 2001) comme nous l'avons déjà rapportés au préalable

(paragraphe I.2.4.1.). Seules les pousses induites au préalable dans un milieu qui contient de l'ANA parviennent à former des racines après leur transfert dans un milieu d'enracinement contenant 11 μ M d'AIA.

Les résultats peu encourageants obtenus avec l'AIA par rapport à l'ANA lors de l'enracinement *in vitro* seraient notamment liés à sa dégradation à la lumière (De Klerk, 2002). De Klerk (2002) utilisant le pommier (*Malus pumila* Mill.) dans des essais de régénération *in vitro*, recommande de placer dans l'obscurité, pendant quelques jours avant leur transfert à la lumière, les explants en culture dans un milieu contenant de l'AIA. Néanmoins, lorsque la culture est réalisée à la lumière, l'AIA devrait être remplacé par des auxines plus stables (moins dégradables à la lumière), comme l'AIB ou l'ANA. Malheureusement, une culture prolongée en présence de l'AIB pourrait inhiber la croissance des primordia racinaires (De Klerk, 2002). Ces auteurs ont pu obtenir des plantules enracinées dans un milieu d'enracinement sans auxine à partir des microboutures préalablement en contact avec un milieu d'induction des racines contenant l'AIB pendant 5 jours.

Chez *C. arietinum*, les pousses sont enracinées dans un milieu gélosé dépourvu de régulateurs de croissance après leur contact préalable pendant 5 minutes en milieu liquide contenant l'AIB (Srivastava *et al.*, 2001).

Chez *Vigna angularis* L. (antérieurement désigné par *Phaseolus angularis* L.), le traitement préalable des pousses pendant 10 minutes dans un milieu liquide contenant de l'AIB, suivi de leur transfert en milieu gélosé sans hormone, améliore l'enracinement, comparé à la culture continue en milieu gélosé contenant de l'AIB (Mohamed *et al.*, 2006).

Chez *Thapsia garganica* L., le délai de contact dans le milieu d'induction de racines liquide contenant l'AIB est de 3 jours avant leur transfert dans un milieu d'enracinement gélosé sans hormone (Makunga *et al.*, 2006).

Les difficultés de l'enracinement *in vitro* s'expliqueraient par un dégagement d'éthylène par les explants dans les récipients de culture. Chez la fève (*V. faba*), Khalafalla et Hattori (2000) ont observé une inhibition de la formation des racines dans un milieu d'enracinement contenant un précurseur d'éthylène : 1-aminocyclopropane-1-acide carboxylique (ACC). En revanche trois inhibiteurs d'éthylène, le nitrate d'argent (AgNO_3), l'acide acétylsalicylique (AAS) et le chlorure de cobalt (CoCl_2), favorisent

l'enracinement *in vitro* (Khalafalla et Hattori, 2000). Les effets de ces trois composés seraient également obtenus par l'action de substances absorbantes, comme le charbon actif.

I. 4.2. Enracinement in vitro par l'application du charbon actif

Les analyses des résultats de différents travaux portant sur l'effet du charbon actif en culture *in vitro* chez diverses espèces végétales, rapportés par Pan et van Staden (1998) et Thomas (2008), ont montré que les avantages du CA dans les milieux d'enracinement *in vitro* s'expliqueraient par sa capacité :

- à absorber ou « piéger » les métabolites (gazeux ou non) diffusant dans le milieu et pouvant inhiber l'enracinement des plantules ;
- à prévenir la formation de cals indésirables à la place des racines ;
- à créer un environnement obscur comparable à celui du sol.

Malgré ces avantages, la capacité d'absorption du CA peut s'étendre aux substances utiles à la croissance et au développement des tissus en culture. Chez *V. radiata* L., l'usage de 0,5% de CA empêche la régénération des plantules (Tivarekar et Eapen, 2001). Selon ces auteurs, cette inhibition est la conséquence d'une forte absorption des composés hormonaux utiles initialement présents dans le milieu. Par exemple, le CA (0,25%), dans un milieu (MS liquide) contenant 10 à 500 μ M d'AIA ou d'AIB, absorbe la totalité des auxines. Cependant, cette absorption est plus importante avec l'AIB qu'avec l'AIA (Nissen et Sutter, 1990).

Tenant compte des troubles engendrés par le CA, certains auteurs recommandent un équilibre entre le CA et les éléments utiles du milieu de culture (Nissen et Sutter, 1990 ; Thomas, 2008 ; Georges *et al.*, 2008).

I. 5. Conclusion

Les croisements interspécifiques entre *Phaseolus vulgaris* L. et *P. coccineus* L. (♀) se soldent presque systématiquement par des avortements d'embryons au stade globulaire. Aucun hybride n'a été obtenu par la culture *in vitro* de ces embryons. Le sauvetage de ceux-ci a été possible chez un génotype NI 637 de *P. vulgaris* par la culture de gousses, mais l'absence de formation des racines a limité le rendement de développement en plantules à un taux très faible (3%). Cette difficulté d'enracinement *in vitro* de plantules obtenues par l'embryoculture a également été rapportée lors de la

régénération des plantes par microbouturage des explants provenant des graines dans le genre *Phaseolus* et, notamment, chez *P. vulgaris*. Chez cette espèce, l'absence de formation de racines serait liée à la formation de cals bruns ou au brunissement du milieu de culture. Ces troubles sont atténués avec des absorbants, le charbon actif ou le PVP-360, dans les milieux de culture qui précèdent l'enracinement. Concernant l'enracinement, on distingue différents protocoles. Dans certains cas, les primordia racinaires sont formés par contact des explants dans un milieu enrichi en auxines stables (ANA, AIB) ; la croissance des racines induites est ensuite assurée dans un milieu avec ou sans l'AIA. Dans d'autres cas, les plantules enracinées sont obtenues par microgreffage *in vitro* ou *in situ*. Ce processus de microgreffage consiste à transférer le greffon (portion de tige feuillée) prélevé du cultivar peu enraciné, sur un porte-greffe (portion de tige munie des racines) du cultivar ayant formé de nombreuses racines. La bibliographie ne fait pas état du sauvetage d'embryons hybrides au stade globulaire tant chez *Phaseolus* que chez les autres légumineuses alimentaires appartenant aux genres *Lens*, *Cajanus*, *Trifolium*, *Lupinus* et *Cicer*. En général, la culture d'ovules (renfermant les embryons cordiformes ou cotylédonaire), suivie de la culture d'embryons isolés de l'ovule, permet d'obtenir des hybrides. Les ovules sont cultivés soit en milieu liquide sur papier filtre formant un pont dans le milieu, soit en milieu gélosé. La teneur en sels minéraux et en sucre du milieu de culture varie selon le stade de développement des embryons. Les milieux de maturation et germination sont généralement plus riches en sels minéraux et en saccharose, par rapport au milieu d'enracinement qui nécessite une teneur réduite en ces deux composés. Le sauvetage d'embryons cordiforme âgé ou cotylédonaire, complété par la régénération adventive, permet d'améliorer le taux de réussite des hybrides interspécifiques. Les plantules adventives sont généralement induites à partir des bourgeons axillaires du nœud cotylédonaire des embryons germés.

II. EXPERIMENTATIONS

II. 1. Objectifs

L'objectif principal de notre travail est de rechercher les conditions de culture d'embryons au stade globulaire qui permettent le développement du plus grand nombre d'entre eux en plantules viables. Ce stade est crucial pour vaincre les avortements qui affectent les croisements interspécifiques entre *P. polyanthus* ou *P. coccineus* (♀) et *P. vulgaris* (Lecomte, 1997 ; Geerts *et al.*, 2000 ; Geerts, 2001 ; Silué, 2009 ; Abid, 2011).

La culture d'embryons globulaires via la culture préalable de gousses, récoltées à 2 JAP, a déjà permis d'obtenir des plantules *in vitro* chez un génotype pur (NI 637) de *P. vulgaris* (Geerts *et al.*, 2000 ; Geerts, 2001). Le taux de réussite est cependant trop faible : seulement 3% des embryons forment des plantules viables. Ce faible taux de sauvetage d'embryons globulaires s'expliquerait par l'absence d'enracinement et l'arrêt de croissance des embryons germés, comme observé chez les embryons cordiformes jeunes isolés (Mergeai *et al.*, 1997 ; Lecomte, 1997 ; Geerts *et al.*, 1999). Le problème de développement en plantules peut également résulter du nombre insuffisant (9 %) d'embryons atteignant le stade cotylédonaire à l'extraction des gousses précultivées (Geerts *et al.*, 2000 ; Geerts, 2001).

Face à ces deux problématiques, nos travaux visent à étudier les conditions de culture qui pourraient conduire à l'amélioration du taux de développement des embryons globulaires en plantules.

Nos travaux ont débuté dès l'année académique 2003-2004 et se sont étendus jusqu'en 2008. Dans cette partie expérimentale, nous séparons les méthodologies utilisées des résultats obtenus suivis de leurs conclusions partielles. Au total, en dehors des essais préliminaires, six expérimentations ont été réalisées. Durant ces essais préliminaires nous avons vérifié, d'une part, l'effet du retrait de la BAP du milieu de maturation et germination de Mergeai *et al.* (1997), et, d'autre part, l'effet de l'ANA du milieu d'induction de racines de Geerts (2001).

1. Dans la première expérimentation, nous avons appliqué le protocole de culture de gousses (Geerts, 2001) à 3 génotypes de *P. vulgaris* et à 1 génotype de *P. coccineus*.
2. Dans la deuxième expérimentation, nous avons cherché à mettre au point une technique de culture qui favoriserait l'obtention d'embryons cotylédonaire.

A cet effet, deux systèmes de culture ont été comparés chez un génotype de *P. vulgaris*. Il s'agit de la culture de gousses (Geerts, 2001), suivie de la culture d'ovules ou de demi-ovules.

3. Dans la troisième expérimentation, nous avons testé la germination *in ovulo*, telle que décrite par Dherte (1995) chez quatre génotypes de *P. vulgaris* et ce afin d'éviter les pertes engendrées par l'extraction des embryons cotylédonaire. Comme les taux de germination *in ovulo* se sont avérés relativement faibles, quel que soit le génotype, nous avons testé la culture de demi-ovules, chez l'un des quatre génotypes de *P. vulgaris*, pour surmonter la barrière à la germination que constituerait la paroi de l'ovule.
4. Dans la quatrième expérimentation, nous avons cherché à améliorer, sur base du protocole de culture de gousses, le pourcentage de plantules obtenues à partir de la culture d'embryons globulaires. Dans ce contexte, nous avons évalué, d'une part, les effets du milieu de maturation et germination liquide et, d'autre part, ceux du charbon actif apporté aux milieux d'induction de racines (formation des primordia racinaires) et de développement en plantules, (formation d'une plantule en croissance).
5. Dans la cinquième expérimentation, nous avons testé, comme technique de régénération, le microbouturage de nœuds cotylédonaire provenant d'embryons germés. Le protocole mis au point chez un génotype de *P. coccineus* a été appliqué à trois génotypes de *P. vulgaris*.
6. Dans la sixième expérimentation, nous avons évalué l'application du protocole mis au point à l'expérimentation 5 sur des embryons hybrides *P. coccineus* (♀) x *P. vulgaris*. Le statut hybride des plantules obtenues a été vérifié à l'aide du couple d'amorces BM 141.

II. 2. Matériel et méthodes

II. 2. 1. Matériel végétal

Quatre génotypes (NI 622, NI 637, X 707, et X 484) de *P. vulgaris* et un génotype (NI 16) de *P. coccineus*, désignés par leur numéro d'identification (NI) ou par un numéro provisoire (X), sont fournis par la banque de *Phaseolineae* du Jardin Botanique National de Meise (tableau 1). Leur statut biologique ainsi que leur origine sont présentés au tableau 1. Leur choix est basé sur l'abondance de la floraison et leur comportement en embryoculture (Mergeai *et al.*, 1997 ; Lecomte, 1997).

Tableau 1. Statut biologique et origine des génotypes utilisés.

Espèce	Numéro d'identification provisoire	Statut biologique	Origine
<i>P. vulgaris</i>	NI 637	cultivé	Brésil
	NI 622	sauvage	Pérou
	X 484	cultivé	Equateur
	NI 707	cultivé	Colombie
<i>P. coccineus</i>	NI 16	cultivé	Rwanda

NI : numéro d'identification de la collection du Jardin Botanique National de Belgique (BE-1860 Meise)
X : numéro provisoire.

II. 2. 2. Culture des plantes mères

Les gousses sont prélevées sur des plantes mères issues des semis réalisés en serres tropicales ou bien dans des cellules ou des grandes chambres de culture. Pour permettre une germination rapide, les semences sont d'abord scarifiées et mises en prégermination dans des boîtes de Pétri standard (Ø 9 cm à raison de 4 à 6 graines par boîte). Ces boîtes sont placées dans l'obscurité, dans une étuve dont la température est réglée à $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Lorsque la germination est effective, environ 4 jours plus tard, les graines germées sont transférées dans des pots d'un litre contenant un mélange de 80% de terreau, 15% de tourbe et 5% de sable du Rhin, et additionné de 5 à 6 g d'engrais organiques (NPK)¹. Ces pots sont placés dans des cellules conditionnées afin de faciliter le développement des pousses.

¹ Engrais organique NPK 6-3-12 + 2 MgO.

Dès l'apparition des premières feuilles trifoliolées, les jeunes plantes sont transférées dans de grands sachets en polyéthylène (3 L) contenant le même substrat que celui des pots. Pour les essais basés sur la culture de gousses et d'ovules, les plantes mères se développent dans une grande chambre de culture. Quant aux essais relatifs à la culture d'embryons isolés de l'ovule, les plantes mères se développent soit en chambre de culture, soit en serre tropicale.

En grande chambre, les conditions climatiques sont les suivantes :

- une température jour/nuit de 24/20°C ;
- une humidité relative d'environ 75% ;
- une photopériode de 12h ;
- une intensité lumineuse d'environ 170 $\mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

La mesure d'intensité lumineuse est effectuée à 60 cm de la vitre séparant les plantes des lampes de 400 Watts.

En serre, nos expérimentations ont été menées entre octobre et mai des années 2006 à 2008 dans des conditions d'éclairage identiques aux grandes chambres, avec des températures jour/nuit plus basses (21/17°C) et une humidité relative de 70 à 80%.

Les plantes sont arrosées deux fois par semaine à l'eau de ville. Une solution nutritive (tableau 2), mise au point par Otoul et Le Marchand (1974) et Traoré (1980), est apportée mensuellement lorsque les plantes atteignent le stade de floraison (Fig. 9), soit, à ± 30 jours de culture pour *P. vulgaris* et à ± 45 jours pour *P. coccineus*.

Dès l'apparition des fleurs, les gousses de génotypes parentaux sont obtenues après autofécondation, naturelle pour *P. vulgaris*, manuelle pour *P. coccineus*. Les gousses hybrides résultent de croisements interspécifiques entre *P. coccineus* (♀) et *P. vulgaris* selon la méthode de Buishand (1956), modifiée par Silué (2009), que nous rapportons au paragraphe II. 2. 3.



Figure 9. Plantes mères de *P. vulgaris* et *P. coccineus* développées en serre tropicale.

Les plantes mères atteignent le stade adulte capable de produire des gousses à ± 30 jours de culture pour *P. vulgaris* (P.v) et à ± 45 jours pour *P. coccineus* (P. c.).

Tableau 2. Composition chimique de la solution nutritive*

Macroéléments (10 L)	
Ca (NO ₃) ₂ .4H ₂ O	89,9 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	59,0 g
K ₂ SO ₄	18,3 g
KNO ₃	39,4 g
KH ₂ PO ₄	19,9 g
K ₂ HPO ₄	1,2 g
Microéléments (100 mL)	
MnCl ₂ .4H ₂ O	15 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	10 g
H ₃ BO ₃	10 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	2 g
Fer (100 mL)	
FeSO ₄ .7H ₂ O	35 g

Source : Otoul et Le Marchand (1974) et Traoré (1980). * : la solution nutritive est préparée avec le mélange des trois solutions mères (macroéléments, microéléments et fer) dans un volume final de 100 litres.

II. 2. 3. Hybridations interspécifiques

Les fleurs des plantes du génotype NI 16 de *P. coccineus* (parent femelle) sont sélectionnées et castrées à l'aide d'une pince un jour avant l'anthèse. La castration consiste d'abord à retirer la carène qui entoure le stigmate et les étamines. Après élimination des étamines, la surface du stigmate est nettoyée à l'aide d'un pinceau. La pollinisation s'effectue le même jour ou le lendemain avec les fleurs du parent mâle prélevées le jour de l'anthèse. La pollinisation consiste à prélever la carène de la fleur du parent mâle dont le style est retiré. La poche contenant les anthères déhiscentes est alors utilisée pour recouvrir le stigmate de la fleur castrée. Cette technique permet de s'assurer de la présence du pollen du parent mâle et surtout du maintien de l'humidité pendant les premiers jours après la pollinisation. Avant et après chaque opération de castration, la pince et la brosse sont plongées dans une solution d'éthanol afin d'éviter les fécondations avec du pollen non désiré.

Après hybridation, les gousses sont suivies pendant leur croissance et celles en arrêt de croissance (en début d'avortement) sont récoltées pour le sauvetage *in vitro* suivant le protocole décrit pour la sixième expérimentation.

II. 2. 4. Culture in vitro

Cette culture est réalisée dans des conditions stériles sous une hotte à flux laminaire. Les outils de prélèvement et de culture (scalpel et pince) sont stérilisés à l'alcool puis à chaud dans un stérilisateur à billes. Le matériel végétal est désinfecté comme décrit ci-dessous.

II. 2. 4. 1. Désinfection des gousses

Les gousses fraîchement récoltées sont désinfectées par immersion dans l'alcool à 70° pendant 30 secondes, puis par trempage dans une solution d'hypochlorite de calcium à 1,5 % pendant 1 minute chez *P. vulgaris* et 3 minutes chez *P. coccineus*. Les gousses désinfectées sont rincées 3 fois à l'eau distillée stérile. La portion du pédoncule blanchie par contact avec le produit est sectionnée sur une longueur de 2 à 4 mm selon la progression du désinfectant vers la gousse. Cette section est réalisée uniquement pour les gousses destinées à être cultivées, car cela permet d'éviter le contact de l'hypochlorite de calcium avec les embryons à l'intérieur des gousses durant la culture.

II. 2. 4. 2. Méthodes et conditions de culture

II. 2. 4. 2. 1. Culture de gousses

Les gousses sont récoltées 2 JAP pour *P. vulgaris* et 5 JAP pour *P. coccineus*. Chez les deux espèces, ces délais de récolte correspondent aux embryons au stade globulaire précoce (Geerts, 2001 ; Geerts *et al.*, 2002 ; Abid, 2011). La culture est réalisée suivant le protocole de Geerts (2001), que nous résumons ci-après.

Les gousses sont déposées dans des boîtes de Pétri standard (à raison de 8 par boîte) contenant 25 ml de milieu gélosé (Fig. 10).



Figure 10. Disposition sur milieu gélosé des gousses *P. vulgaris* récoltées 2 JAP.

Les boîtes fermées et scellées par 4 tours de film polyéthylène (Reynolon) sont placées dans un luminincube réglé à une température de $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$, à une photopériode de 12 heures pour une intensité lumineuse de $60 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

La culture est réalisée par transfert successif d'explants sur trois milieux gélosés à pression osmotique décroissante (tableau 3) (Geerts, 2001). Au début, les gousses sont cultivées sur un premier milieu (P_0 à 580 mosm) pendant 1 jour, puis sur un second milieu (P_1 à 450 mosm) pendant 2 jours et, enfin, sur un troisième milieu (P_2 à 350 mosm) pendant 4 jours. Le milieu P_0 diffère des deux autres non seulement par sa teneur en saccharose, mais aussi, par sa teneur en sels minéraux, en acides aminés et en hormones. P_0 est, en effet, moins riche en sels minéraux et renferme de l'ABA ($0,095 \mu\text{M}$) ainsi qu'une quantité importante de saccharose (143 g.L^{-1}). Par contre, les deux autres milieux, P_1 (450 mosm) et P_2 (350 mosm), sont identiques, hormis leur concentration en saccharose qui est différente (102 et 80 g.L^{-1} , respectivement).

Tableau 3. Composition chimique des 3 milieux utilisés pour la culture de gousses.

Composant du milieu	Nom du milieu		
	P ₀ 0 (580 mosm)	P ₀ 1 (450 mosm)	P ₀ 1 (350 mosm)
Macroéléments (mg.L⁻¹)			
CaCl ₂ .2H ₂ O	300	600	600
MgSO ₄ .7H ₂ O	220	435	435
KNO ₃	1050	2100	2100
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	42	85	85
KH ₂ PO ₄	162	325	325
NH ₄ NO ₃	500	1000	1000
Microéléments (mg.L⁻¹)			
MnSO ₄ .4H ₂ O	7,50	15	15
ZnSO ₄ .7H ₂ O	2,50	5	5
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,05	0,10	0,10
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,05	0,10	0,10
KI	0,50	1	1
H ₃ BO ₃	3,70	5	5
NiCl ₂ .6H ₂ O	0,02	0,04	0,04
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,20	0,40	0,40
Fe			
FeSO ₄ .7H ₂ O	12,50	25	25
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	18,62	37,25	37,25
Vitamines (mg.L⁻¹)			
Thiamine	0,25	1	1
Acide nicotinique	1,25	5	5
Pyridoxine	0,13	0,50	0,50
Myo-Inositol	25	100	100
Acides aminés (mg.L⁻¹)			
L glutamine	250	1000	1000
Hydrolysate de caséine	250	1000	1000
Tryptophane	1,12	-	-
Hormones (μM)			
NAA	0,1	0,1	0,1
BAP		0,1	0,1
ABA	0,095	-	-
Sucre (g.L⁻¹)			
Saccharose	143	102	80
Divers			
Adénine (μM)	-	10	10
Agar-Difco (g.L ⁻¹)	5	5	5
pH	± 5,4	±5,4	±5,4

Les milieux P₀0 (580 mosm), P₀1 (450 mosm) et P₀1 (350 mosm) correspondent aux trois milieux utilisés pour la culture de gousses (Geerts, 2001). Les valeurs entre parenthèses correspondent à leur osmolarité. « - » signifie absence de composé.

II. 2. 4. 2. 2. Culture d'ovules et de demi-ovules

Les ovules mesurant entre 2,3 mm et 2,5 mm de longueur sont aseptiquement isolés des gousses précultivées ou des gousses fraîchement récoltées en fonction des essais réalisés.

Le prélèvement a lieu sous binoculaire (grossissement x10), à l'aide d'une pince et d'un scalpel, après la section du funicule (Fig.11).

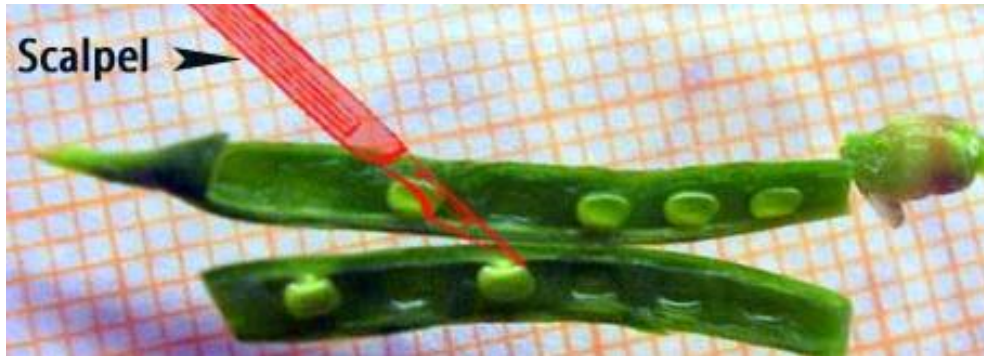


Figure 11. Prélèvement d'ovules à partir d'une jeune gousse précultivée.

Les ovules sont prélevés de la gousse sous binoculaire à l'aide d'une pince et d'un scalpel.

Les demi-ovules sont obtenus par coupure transversale au milieu de l'ovule à l'aide d'un scalpel (Fig. 12A). L'extrémité micropylaire de forme plus arrondie qui renferme l'embryon est séparée du reste de l'ovule (Fig. 12B).

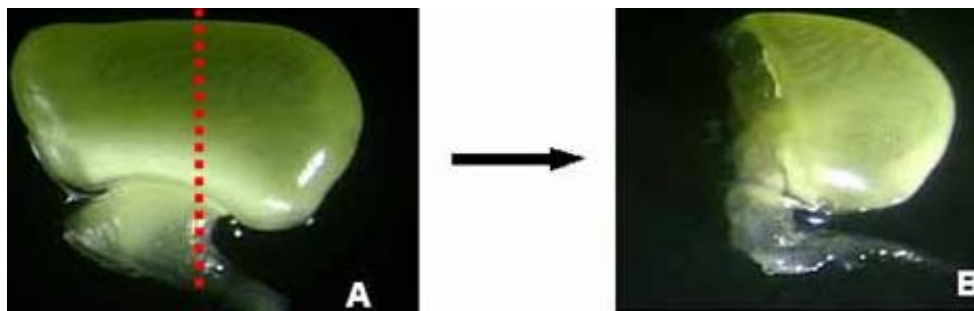


Figure 12. Prélèvement d'un demi-ovule.

Photo A : Section transversale d'un ovule issu d'une gousse récoltée 4 JAP (en pointillé).
Photo B : demi-ovule renfermant l'embryon.

Les explants (ovules ou demi-ovules) sont cultivés à plat en boîtes de Pétri standard (à raison de 60 explants par boîte) (Fig.13). Deux milieux de maturation et germination, soit G1 de Mergeai *et al.* (1997) ou P1 de Geerts *et al.* (1999) et Geerts (2001) (Annexe 1), sont utilisés selon l'essai réalisé.

Les boîtes scellées sont placées dans l'obscurité dans un luminincube réglé aux conditions climatiques identiques à celles des gousses.



Figure 13. Disposition des ovules cultivés sur un milieu de maturation et germination gélosé.

II. 2. 4. 2. 3. Culture d'embryons isolés de l'ovule

Les embryons sont extraits des ovules (mesurant au moins 2 mm de longueur) sous binoculaire (grossissement x 25). L'extraction est réalisée sur base de la technique proposée par Schmit *et al.* (1991, cités par Lecomte, 1997). Dans notre cas, nous avons utilisé une pince pour stabiliser l'ovule et une lame de scalpel pour réaliser à la fois la section transversale, l'expulsion et le prélèvement de l'embryon.

La culture est généralement réalisée en plusieurs étapes. Les embryons isolés de l'ovule sont prélevés dans une goutte de milieu de transfert puis aussitôt placés dans la boîte de Pétri standard contenant le milieu de maturation et germination. Ce milieu peut être gélosé ou liquide selon l'essai. L'effectif des embryons cultivés varie entre 16 et 60 par boîte selon l'essai. Au début, la culture est réalisée dans l'obscurité pendant une semaine sur un milieu G1 de maturation et germination, puis pendant deux semaines sur le milieu G6 de déshydratation ; les embryons germés sont ensuite cultivés à la lumière pendant une semaine sur le milieu G7g d'induction de racines et une à deux semaines sur le milieu G7c de développement des embryons germés. La culture a lieu en tubes de culture (15 cm de hauteur, contenant 10 ml de milieu) sur ces deux derniers milieux de culture. Par contre, sur les milieux G1 et G6, elle a lieu en boîtes de Pétri standard.

La composition chimique des quatre milieux, G1, G6, G7g et G7c résumée au tableau 4, est détaillée en Annexe 1. Les conditions climatiques à la lumière ou dans l'obscurité sont identiques à celles décrites pour les gousses. Les caractéristiques des embryons matures, germés et des plantules en développement sont déjà décrites dans la partie bibliographique de ce document au paragraphe I. 2. 3. 1.

Tableau 4. Composition chimique des 4 milieux de base pour la culture d'embryons isolés de l'ovule.

Composant du milieu	Nom du milieu **			
	G1 de maturation	G6 de déshydratation	G7g d'induction de racines	G7c de développement en plantules
Macroéléments	Mergeai <i>et al.</i> (1997)	Gamborg <i>et al.</i> (1968)	Gamborg <i>et al.</i> (1968)	Gamborg <i>et al.</i> (1968)
Microéléments	Gamborg <i>et al.</i> (1968)	Gamborg <i>et al.</i> (1968)	Gamborg <i>et al.</i> (1968)	Gamborg <i>et al.</i> (1968)
Vitamines (mg.L⁻¹)				
Thiamine	1	1	1	1
Acide nicotinique	5	5	5	5
Pyridoxine	0,5	0,5	0,5	0,5
Myo-Inositol	100	100	100	100
Acides aminés (mg.L⁻¹)				
Hydrolysate de caséine	1000	-	100	100
Glutamine	1000	-	100	100
Hormones (µM)				
BAP	0,1	-	0,1	0,1
AIA	-	-	1	-
GA	-	-	-	0,18
Saccharose (g.L⁻¹)	30	100	30	30
Divers				
Agar-Difco (g.L ⁻¹)	5	8	5	5
Charbon actif (%)	-	0,5	-	-
pH	±5,4	±5,4	±5,4	±5,4

** les milieux G1, G6, G7g et G7c, correspondent respectivement au milieu de Mergeai *et al.* (1997) pour la maturation et germination d'embryons cordiformes jeunes isolés de l'ovule, au milieu de Hu et Zanettini (1995) pour la déshydratation d'embryons matures germés, au milieu de Geerts (2001) pour l'induction des racines et au milieu de Geerts *et al.* (1999) pour le développement en plantules. « - » signifie que la substance n'a pas été additionnée.

II. 2. 4. 3. Acclimatation

Les plantules sont transplantées dans des pots (Ø 6 cm) contenant un substrat de composition identique à celui utilisé pour les plantes mères (paragraphe II. 2. 2). Pour l'acclimatation, ce substrat est préalablement stérilisé à l'autoclave, à 121 °C pendant 20 minutes. Les racines ou les bases racinaires des explants à acclimater sont rincées délicatement à l'eau de ville afin de supprimer toutes traces du milieu, provenant de la culture *in vitro*, qui pourraient favoriser la prolifération microbienne. Durant l'acclimatation, les pots sont placés dans des cellules climatisées avec des caractéristiques climatiques identiques à celles des plantes mères. Afin d'éviter la déshydratation des explants, ces derniers sont maintenus à l'étouffée sous un couvercle en polyéthylène transparent. L'humidité relative est réduite graduellement après la formation d'au moins une nouvelle feuille trifoliolée, en remplaçant le couvercle étanche par un couvercle percé. Un arrosage hebdomadaire est effectué jusqu'à ce que le développement de la plantule soit suffisant (après formation de 3 à 4 feuilles trifoliolées) pour pouvoir effectuer son passage en grande chambre conditionnée ou en serre tropicale. A ce stade, les plantules sont transplantées en pots ou en sachets en polyéthylène de 3 litres, contenant le même substrat que la plante mère, jusqu'à la floraison et la production de gousses.

II. 2. 4. 4. Protocoles expérimentaux

II. 2. 4. 4. 1. Essais préliminaires

II. 2. 4. 4. 1. 1. Effet de la BAP dans le milieu de maturation et germination

Nous avons utilisé les embryons isolés des gousses fraîchement récoltées à 8 JAP chez NI 637 de *P. vulgaris*. Seuls les embryons cordiformes jeunes munis d'un suspenseur sont mis en culture sur le milieu G1 de maturation et germination (contenant 0,1 µM de BAP) ou sur le même milieu sans BAP. Le milieu G1 est considéré comme témoin. Après une semaine, tous les embryons en maturation sont cultivés successivement sur les trois milieux G6, G7g et G7c, selon le protocole de culture d'embryons isolés de l'ovule.

Pour chacun des milieux G1 avec ou sans BAP, 60 embryons sont établis dans chaque boîte de Pétri standard. Deux répétitions sont réalisées avec 60 embryons par répétition. Tenant compte de l'absence de plantules en développement, nous n'avons rapporté que les taux d'embryons en maturation et les taux d'embryons en germination.

Les taux moyens de maturation et de germination*, calculés respectivement après une semaine dans le milieu G1 de maturation et germination et après deux semaines dans le milieu G6 de déshydratation, sont exprimés en pourcentage par rapport à l'effectif d'embryons initialement mis en culture.

II. 2. 4. 4.1. 2. Influence de l'ANA dans le milieu d'induction de racines

Les embryons germés, comme décrits dans l'essai ci-dessus, sont transférés en tubes de culture sur le milieu G7g, dans lequel l'AIA (1 μ M) est remplacé par l'ANA (1,3 μ M ou 2,6 μ M), le milieu G7g étant considéré comme témoin. Après une semaine de culture, les explants sont transférés sur le milieu G7c de développement des embryons germés pendant deux semaines. Nous rappelons que les compositions chimiques des milieux G7g et G7c sont reprises au tableau 4.

Chaque essai est répété deux fois avec un effectif de 24 embryons par répétition et par traitement. L'absence de plantules en développement nous a amenée à ne rapporter que les taux d'enracinement.

Ce dernier taux est déterminé après deux semaines de culture sur le milieu G7c. Il est exprimé en pourcentage d'explants enracinés par rapport à l'effectif d'embryons germés transférés en tubes. Les explants sont enracinés lorsqu'ils ont formé de nombreuses racines secondaires avec ou sans développement de la tige feuillée.

II. 2. 4. 4. 2. Influence du génotype sur le sauvetage des embryons globulaires

La culture de gousses (paragraphe II. 2. 4. 2. 1) suivie de la culture d'embryons isolés (paragraphe II. 2. 4. 2. 3), mise au point auparavant chez NI 637 de *P. vulgaris* (Geerts *et al.*, 2000; Geerts, 2001), est appliquée à 2 nouveaux génotypes (NI 622 et X 484) de la même espèce et à 1 génotype (NI 16) de *P. coccineus*. NI 637 de *P. vulgaris* est utilisé comme génotype témoin.

Pour chaque génotype, 5 répétitions sont effectuées avec, en moyenne, 18 embryons (extraits des gousses précultivées) par répétition. Tenant compte de l'arrêt de croissance des embryons germés dans le milieu G7c, nous n'avons rapporté que le taux moyen de germination par génotype.

* Le taux de germination était déterminé auparavant dans un milieu G1 de maturation et germination (Mergeai *et al.*, 1997). Dans notre étude nous le déterminons dans un milieu G6 de déshydratation (Hu et Zanettini, 1995) car depuis l'introduction de G6 dans les étapes de culture, l'effectif d'embryons germés est plus élevé (Geerts *et al.*, 1999).

II. 2. 4. 4. 3. Etude comparative de deux systèmes de culture

La culture de gousses (Cg) récoltées 2 JAP est suivie de la culture d'ovules (Cov) ou de la culture de demi-ovules (Cdo) chez *P. vulgaris* (NI 637).

La culture de gousses est réalisée selon le protocole de Geerts (2001). Les ovules et les demi-ovules isolés des gousses précultivées sont transférés sur un milieu de maturation G1. Après 5 jours, les embryons sont extraits des ovules ou des demi-ovules. Leur stade de développement est déterminé à l'extraction. Les embryons extraits des ovules isolés des gousses précultivées ont servi de matériel de référence.

Trois répétitions sont effectuées pour chaque système de culture testé :Cg ou Cg+Cov ou Cg+Cdo. Une répétition est constituée de 100 extractions. Les stades de développement rencontrés à l'extraction sont les stades globulaires, cordiforme jeune, cordiforme âgé et cotylédonaire. L'évaluation s'effectue sur base d'un taux : le pourcentage de chaque stade de développement embryonnaire par rapport à l'effectif total. L'efficacité des systèmes de culture testés est déterminée sur la base du taux d'embryons extraits au stade cotylédonaire.

II. 2. 4. 4. 4. Evaluation de la culture d'ovules

II. 2. 4. 4. 4. 1. Influence de la composition du milieu de culture

Les ovules isolés des gousses fraîchement récoltées à 4 JAP, chez *P. vulgaris* (NI 637), sont cultivés sur les milieux de maturation et germination avec la solution minérale M1 (Mergeai *et al.*, 1997) ou M2 (Geerts, 2001) (tableau 5).

Trois répétitions sont réalisées pour chaque solution minérale avec un effectif de 120 ovules par répétition. L'efficacité du milieu est évaluée par rapport aux taux moyens de maturation et de germination *in ovulo*. La maturation *in ovulo* a lieu lorsque l'ovule augmente de volume. La germination se traduit par le fait que l'embryon soit partiellement ou entièrement visible à l'extérieur de l'ovule. Ces deux taux sont exprimés en pourcentage par rapport à l'effectif d'ovules mis en culture.

Tableau 5. Composition chimique des deux solutions minérales évaluées pour la maturation et germination *in ovulo*.

Composant du milieu	Nom des deux solutions minérales	
	M1	M2
Macroéléments (mg.L⁻¹)		
CaCl ₂ .2H ₂ O	150	600
MgSO ₄ .7H ₂ O	250	435
KNO ₃	2500	2100
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	150	85
(NH ₄) ₂ SO ₄	134	-
KH ₂ PO ₄	-	325
NH ₄ NO ₃	400	1000
Microéléments (mg.L⁻¹)		
MnSO ₄ .H ₂ O	10	15
ZnSO ₄ .7H ₂ O	2	5
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	0,10
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	0,10
KI	0,75	1
H ₃ BO ₃	3	5
NiCl ₂ .6H ₂ O	-	0,04
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	0,40
Fe (mg.L⁻¹)		
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,85	25
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37,25	37,25

Les solutions minérales M1 et M2 correspondent respectivement à celles des milieux de maturation et germination G1 de Mergeai *et al.* (1997) et P1 de Geerts (2001). Source : Lecomte (1997) et Geerts (2001).

II. 2. 4. 4. 2. Influence du génotype

Le protocole de culture d'ovules mis au point préalablement chez NI 637 de *P. vulgaris* est évalué avec trois autres génotypes (X 484, X 707 et NI 622) de la même espèce. Tous les ovules sont cultivés pendant 8 semaines en boîtes de Pétri contenant le milieu de maturation et germination avec la solution minérale M1. Le génotype NI 637 a servi de référence. L'essai est répété trois fois, avec 60 ovules par répétition pour chacun des génotypes, ce qui permet de calculer les taux moyens de maturation *in ovulo*, d'une part, et de germination *in ovulo*, d'autre part, et ce pour chacun des 4 génotypes.

II. 2. 4. 4. 3. Influence de la culture de demi-ovules

Cet essai est effectué avec X 484 de *P. vulgaris*. La culture de demi-ovules est réalisée en parallèle avec la culture d'ovules. Cette dernière technique est considérée comme la culture de référence.

Pour chacune des deux cultures, ovule (Cov) et demi-ovule (Cdo), on réalise 3 répétitions, dont chacune comporte un effectif de 120 explants (soient 2 boîtes de Pétri). Les taux de maturation et de germination *in ovulo* dont les caractéristiques de développement sont décrites par ailleurs (paragraphe II. 2. 4. 4. 4. 1.) sont déterminés. Avec les demi-ovules, il y a maturation lorsque les embryons deviennent visibles. La germination a lieu lorsque l'embryon se détache seul du demi-ovule.

II. 2. 4. 4. 5. Développement des embryons globulaires en plantules

II. 2. 4. 4. 5. 1. Influence du milieu de maturation liquide

Les embryons extraits des gousses précultivées de NI 637 (*P. vulgaris*) sont transférés dans des boîtes de Pétri standard en milieu liquide (5 ml), et placées pendant trois jours sur un agitateur à mouvement circulaire (50 rotations par minute), ou en milieu gélosé pendant une semaine. Ce milieu gélosé est considéré comme le substrat de référence. Tous les embryons sont ensuite transférés successivement sur les trois milieux G6, G7g et G7c de culture d'embryons isolés de l'ovule. Après une semaine de culture en milieu G7c, tous les explants sont acclimatés.

Trois répétitions sont effectuées avec 20 embryons par répétition et par substrat. Les taux de maturation, de germination, de développement en plantules et d'acclimation sont déterminés. Nous avons précédemment expliqué comment calculer les taux de maturation et de germination (paragraphe II. 2. 4. 4. 1. 1.). Le taux de développement en plantules (ou d'embryons germés en développement) est déterminé en pourcentage de plantules en croissance par rapport à l'effectif des embryons germés mis en tubes. Le taux d'acclimation est calculé en pourcentage de plantules acclimatées par rapport à l'effectif des plantules transférées en pot (Ø 6 cm). On considère qu'une plantule est définitivement acclimatée lorsque celle-ci produit au moins 3 à 4 feuilles trifoliolées supplémentaires.

II. 2. 4. 4. 5. 2. Influence du charbon actif

Les embryons germés (NI 637 de *P. vulgaris*) obtenus à partir de la culture des embryons isolés des gousses précultivées (Geerts, 2001) sont transférés en tubes sur le milieu (G7g) d'induction de racines puis sur le milieu (G7c) de développement des embryons germés avec ou sans charbon actif (CA : 0,5%). Les deux milieux G7g et G7c sans CA sont les milieux de référence.

Trois répétitions sont effectuées avec un effectif de 75 embryons germés par répétition. Ce nombre correspond à l'effectif d'embryons mis en culture lorsque tous les embryons germent. Les taux d'enracinement et de développement des embryons germés sont déterminés après 4 semaines de culture sur le milieu G7c.

II. 2. 4. 4. 6. Sauvetage d'embryons par microbouturage de nœuds cotylédonaire

II. 2. 4. 4. 6. 1. Influence du milieu de culture

Après la culture des gousses de NI 16 de *P. coccineus*, les embryons en sont isolés et sont mis en culture successivement sur les milieux G1, G6, G7g et G7c, selon le protocole de culture d'embryons isolés. Après une semaine de culture sur ce dernier milieu G7c, les nœuds cotylédonaire (ou microboutures) sont isolés des embryons germés en arrêt de croissance. Les microboutures sont ensuite cultivées séparément en tubes sur un milieu MS (Murashige et Skoog, 1962) modifié ou G7c de développement en plantules (Geerts *et al.*, 1999 ; Geerts, 2001) modifié. La composition chimique des deux milieux utilisés pour le microbouturage est indiquée dans le tableau 6. Les explants sont cultivés à la lumière dans des conditions climatiques identiques à celles décrites pour la culture de gousses. Après 4 semaines, les explants sont acclimatés. Le protocole de microbouturage utilisé est schématisé dans la figure 14.

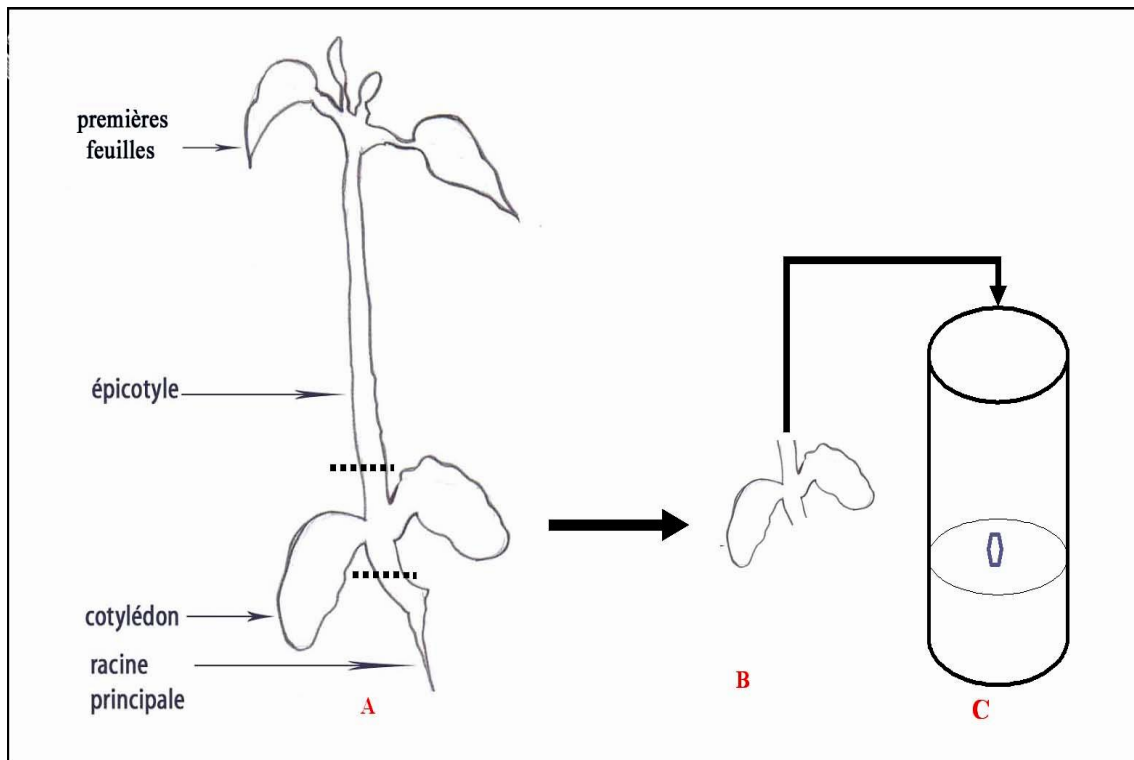


Figure 14. Représentation schématique du microbouturage.

Isolement d'un nœud cotylédonaire (A) suivi de son transfert (B) en tube sur un milieu de microbouturage (C).

Quatre répétitions sont effectuées avec 55 microboutures par répétition et par milieu. Le taux d'acclimatation et les caractéristiques des plantules acclimatées sont déjà décrites dans le paragraphe I. 2. 4. 5. 1. Le taux de régénération en plantules est déterminé en pourcentage de plantules régénérées par rapport à l'effectif des microboutures transférées en tubes. La plantule est régénérée lorsque la microbouture développe une tige avec au moins une feuille trifoliolée et de nombreuses racines adventives.

Tableau 6. Composition chimique des deux milieux MS et G7c modifiés de microbouturage.

Composant du milieu	Nom du milieu	
	MS modifié	G7c modifié
Macroéléments (mg.L⁻¹)		
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	150
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	250
KNO ₃	1900	2500
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	150	150
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	134
KH ₂ PO ₄	170	-
NH ₄ NO ₃	1650	-
Microéléments (mg.L⁻¹)		
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,30	10
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,62	2
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	0,025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	0,025
KI	0,83	0,75
H ₃ BO ₃	6,22	3
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	0,25
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,85	27,85
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37,25	37,25
Vitamines (mg.L⁻¹)		
Thiamine	1	1
Acide nicotinique	5	5
Pyridoxine	0,50	0,50
Myo-Inositol	100	100
Acides aminés (mg.L⁻¹)		
L glutamine	-	100
Hydrolysate de caséine	-	100
Hormones (μM)		
BAP	0,10	0,10
GA	0,18	0,18
Sucre (g.L⁻¹)		
Saccharose	30	30
Agar-Difco (g.L⁻¹)		
	8	8
pH	±5,4	±5,4

Les milieux MS modifié et G7c correspondent respectivement aux milieux testés pour le microbouturage de nœuds cotylédonaire, soit, respectivement, le milieu MS de Murashige et Skoog (1962) modifié en vitamines, en acides aminés, en hormones, en saccharose et en agar-Difco, et le milieu G7c de développement en plantules de Geerts *et al.* (1999) et Geerts (2001) modifié avec 8 g.L⁻¹ d'agar-Difco. « - » indique l'absence de la substance.

II. 2. 4. 4. 6. 2. Influence du génotype

Le protocole de microbouturage, préalablement mis au point chez le génotype NI 16, est appliqué à deux génotypes cultivés (NI 637 et X 484) de *P. vulgaris* ; NI 16 de *P. coccineus* est utilisé comme génotype de référence. Les nœuds cotylédonaire ont été prélevés à partir des embryons germés en arrêt de croissance, depuis 7 à 10 jours, sur le milieu G7c de développement en plantules. Toutes les microboutures sont cultivées en milieu MS modifié.

Trois répétitions sont effectuées avec, en moyenne, 16 à 55 microboutures par répétition et selon le génotype testé.

Cette expérimentation a également été réalisée avec du matériel végétal (gousses) récolté dans une serre tropicale. Outre le témoin NI 6, l'essai a été réalisé avec deux génotypes cultivés (NI 637 et X 484) et un génotype sauvage (NI 622) de *P. vulgaris*. Tenant compte des proliférations microbiennes du matériel végétal récolté en serre, nous avons initié la culture avec des embryons isolés de l'ovule au stade cordiforme jeune (munis d'un suspenseur intact). Ces embryons sont isolés des gousses récoltées entre 7 et 8 JAP chez *P. vulgaris* ou entre 8 et 9 JAP chez NI 16 de *P. coccineus*.

Trois répétitions sont effectuées chacune avec 105 microboutures par génotype. Les taux de plantules régénérées sont déterminés.

II. 2. 4. 4. 6. 3. Influence du charbon actif

Les microboutures isolées des embryons germés mais en arrêt de croissance (chez les génotypes X 484 de *P. vulgaris* et NI 16 de *P. coccineus*) sont cultivées en tubes sur le milieu MS modifié contenant 0,5% ou pas de CA. Pour chaque traitement, 5 répétitions sont effectuées avec 50 microboutures par répétition. Après 4 semaines, les taux d'enracinement et de plantules régénérées sont déterminés.

II. 2. 4. 4. 7. Sauvetage d'embryons hybrides par microbouturage de nœuds cotylédonaire

Les gousses en croissance obtenues lors des croisements interspécifiques entre NI 16 de *P. coccineus* (♀) et NI 637 de *P. vulgaris* sont récoltées aux premiers signes d'avortement, c'est-à-dire dès l'arrêt de croissance et le jaunissement des gousses, qui apparaissent entre le 4^{ème} et 14^{ème} JAP. L'absence d'embryons à l'extraction avec des gousses de moins de 10 JAP, nous a conduit à ne retenir que les gousses récoltées entre 10 et 14 JAP.

Après une comparaison morphologique des embryons hybrides avec ceux obtenus par autofécondation chez les génotypes parentaux, tous les embryons sont cultivés suivant le protocole de culture d'embryons isolés suivi du microbouturage de nœuds cotylédonaire dans le milieu MS modifié contenant 0,5% de CA. Les embryons d'âge identique, isolés des gousses de génotypes parentaux sont utilisés comme référence.

Dans le but de comparer les résultats obtenus chez les hybrides avec ceux obtenus chez les génotypes parentaux, les effectifs identiques d'embryons sont utilisés par répétition, tant chez les hybrides que chez les génotypes parentaux. Cinq répétitions sont effectuées avec 2 à 5 embryons par répétition selon le nombre d'hybrides obtenus. Au total, 11 embryons ont été cultivés chez les hybrides comme chez les génotypes parentaux. Les taux de régénération des plantules ont été déterminés.

II. 2. 4. 4. 8. Caractérisation moléculaire des hybrides

Le caractère hybride des plantules obtenues est vérifié au moyen du couple d'amorces BM 141 provenant du CIAT (Gaitan-Solis *et al.*, 2002) et suivant le protocole décrit par Ouédraogo (2003) ci-après. Le mélange réactionnel contient 30 ng d'ADN, un tampon d'amplification concentré 1x, 0,1 μ M d'amorces (microsatellites), 0,25 mM de dNTPs, 1,5 U de Taq DNA polymérase. Les différents cycles de température pour les réactions PCR ont été réalisés à l'aide d'un thermocycleur PTC-200 (Peltier Thermal Cycler) de MJ Research. L'amplification des profils microsatellites consiste en une période de dénaturation initiale de l'ADN et d'activation de la Taq polymérase à 94 °C pendant 3 minutes, puis une amplification de 35 cycles. Chaque cycle comprend une dénaturation (étape 1) à 94 °C pendant 15 secondes, une hybridation (étape 2) à 55 °C pendant 15 secondes et une élongation (étape 3) de 15 secondes à 72 °C.

Après les 35 cycles, une élongation finale à 72 °C est appliquée durant 5 minutes. Un volume de 10 μ L d'une solution, composée d'un mélange de 10 mM de NaOH, 95% Formamide et 0,05% Bromophénol, est rajouté aux produits d'amplification avant une incubation de 2 minutes à 92 °C, afin de séparer les brins d'ADN pour l'électrophorèse sur gel de polyacrilamide. Les produits amplifiés sont révélés par une coloration au nitrate d'argent (Benbouza *et al.*, 2006).

II. 2. 4. 5. Analyse statistique des données

Les moyennes des variables observées sont déterminées après 2 à 5 répétitions selon l'essai réalisé. Les analyses statistiques des résultats sont effectuées par le programme SAS (ANOVA) et les classements des moyennes par le test de Newman et Keuls au seuil 5%. La représentation des graphiques est effectuée à l'aide du logiciel Minitab version 14 et Excel version 2003.

II. 3. RESULTATS ET DISCUSSIONS

II. 3. 1. Essais préliminaires

II. 3. 1. 1. Effet de la BAP en milieu de maturation et germination

Tenant compte des effets néfastes de la BAP (Lecomte, 1997) sur le développement *in vitro* des embryons cordiformes jeunes NI 637 de *P. vulgaris*, nous l'avons retirée du milieu G1 de maturation et germination. Ce retrait entraîne un accroissement très significatif des pourcentages d'embryons matures et d'embryons germés qui atteignent 94% et 91%, respectivement contre 21% et 6%, respectivement, avec 0,1 μ M de BAP (Fig. 15).

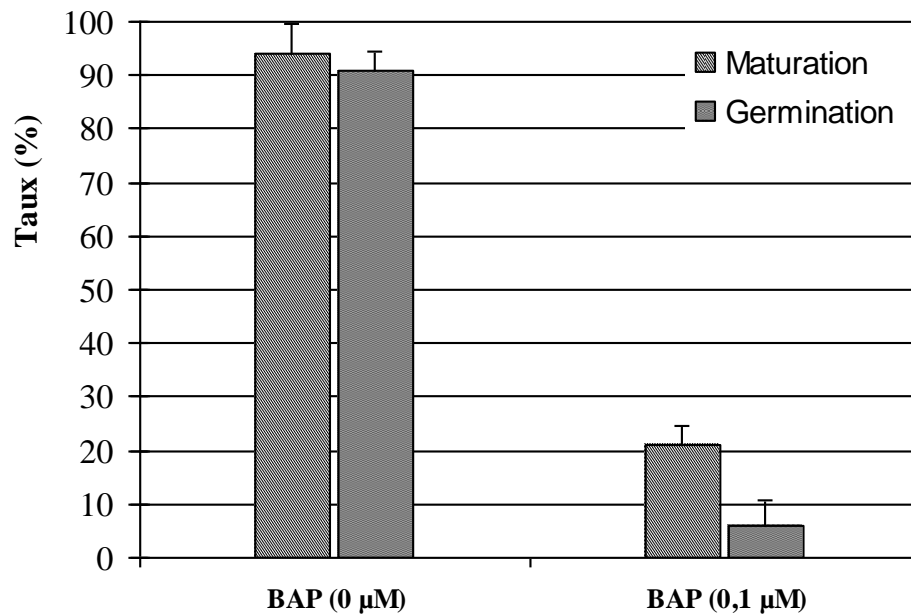


Figure 15. Taux de maturation et de germination d'embryons cordiformes jeunes *P. vulgaris* (NI 637) avec ou sans BAP (0,1 μ M) dans le milieu G1.

Les barres au-dessus des rectangles indiquent les écarts-types des moyennes des embryons matures ou germés, calculées sur 2 boîtes de 60 embryons cultivés dans chacune. Chaque boîte correspond à une répétition.

La BAP dans le milieu de maturation et germination entraîne des malformations des cotylédons avec la disparition de la symétrie bilatérale (Fig. 16A). Par contre, après le retrait de la BAP de ce même milieu, les embryons cordiformes jeunes évoluent normalement et aboutissent successivement à des embryons matures (Fig. 16B) puis germés (Fig. 17). Ces observations rejoignent celles de Lecomte (1997) qui obtient des pourcentages plus élevés de maturation et de germination des embryons cordiformes jeunes en absence de BAP.

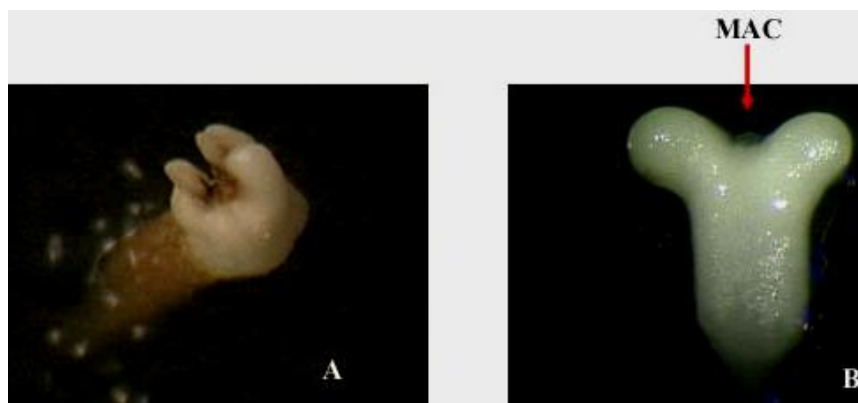


Figure 16. Embryons cordiformes jeunes de *P. vulgaris* (NI 637) après 1 semaine dans le milieu G1 de maturation et germination avec (A) ou sans (B) BAP.

La BAP, dans le milieu de maturation et germination, entraîne la disparition de la symétrie bilatérale (A). Par contre son retrait aboutit à une augmentation du volume de l'embryon et la formation d'une gemmule ou MAC (méristème apical caulinaire), caractéristiques des embryons en maturation (B).

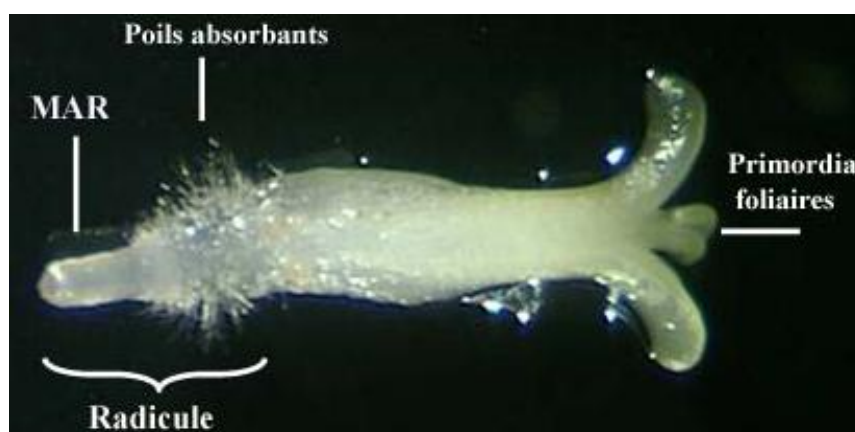


Figure 17. Développement d'un embryon précultivé en milieu G1 de maturation sans BAP après deux semaines sur le milieu G6 de déshydratation.

Les embryons « matures » germés provenant du milieu G1 de maturation et germination sans BAP germent (formation des primordia foliaires et allongement de la radicule) après leur transfert sur le milieu G6 de déshydratation. MAR : méristème apical des racines.

Des résultats similaires ont aussi été rapportés chez d'autres légumineuses alimentaires appartenant aux genres *Lupinus* (Vuillaume et Hoff, 1986b) et *Cicer* (Clarke *et al.*, 2006), lorsque la culture d'embryons isolés de l'ovule est réalisée sur un milieu contenant des hormones. Monnier (1976) avait déjà souligné l'avantage du retrait des hormones en général du milieu de culture des embryons immatures de *C. bursa-pastoris*, car des anomalies morphologiques affectaient leur maturation *in vitro*.

En revanche, la BAP (0,1 μ M) est recommandée pour le développement *in vitro* des embryons au stade cotylédonaire chez *P. vulgaris* (Rabakoarihanta *et al.*, 1979).

Bridgen (1994) recommande un apport de régulateurs de croissance (auxines et cytokinines) dans les milieux d'embryoculture pour l'induction de cals.

Cet essai confirme l'effet très néfaste de la BAP sur le développement d'embryons cordiformes jeunes, lequel est meilleur dans un milieu de maturation sans hormone. Nous choisissons donc pour la suite de nos essais le milieu G1 de maturation et germination sans BAP.

II. 3. 1. 2. Effet de l'ANA en milieu d'induction de racines

Compte tenu des effets favorables rapportés pour l'ANA en remplacement de l'AIA dans le milieu d'induction de racines G7g, lors du sauvetage d'embryons hybrides du genre *Vigna* (Kouadio, 2007), nous l'avons utilisé chez *Phaseolus* afin d'améliorer l'enracinement des embryons germés ainsi que leur développement en plantules. Le taux d'enracinement obtenu (Fig. 18) est nettement plus élevé en présence de 1,3 μM d'ANA (83%) qu'en présence de 1 μM d'AIA (29%) ou de 2,6 μM d'ANA (20%). Cette dernière concentration induit la formation fréquente (56%) de cals hyperhydriques au niveau de la zone racinaire des embryons germés, alors qu'il n'y en a pas ou peu lorsque l'ANA à 1,3 μM et l'AIA à 1 μM , sont respectivement utilisés (Fig. 18).

Toutefois, si l'enracinement a bien eu lieu, le développement de la partie aérienne s'est limité aux deux feuilles primaires. Ni tiges ni feuilles trifoliolées n'ont été observées quelle que soit l'auxine (Fig. 19). De nombreux auteurs (Lecomte, 1997 ; Mergeai *et al.*, 1997 ; Geerts *et al.*, 1999 ; 2000 ; Geerts, 2001) attribuaient les faibles taux de développement en plantules observés chez *Phaseolus* à la formation de cals hyperhydriques de la zone racinaire. Dans notre essai, l'absence de formation de la tige feuillée après contact avec l'ANA (1,3 μM), pourrait s'expliquer par un excès de cette auxine exogène. Arellano *et al.* (2009) ont obtenu chez de nombreuses (10) variétés de *P. vulgaris* 100% des plantules adventives enracinées en utilisant une faible teneur en ANA (0,054 μM) dans un milieu d'enracinement. Les teneurs requises en ANA dépendraient en réalité des espèces végétales. Chez *Vigna*, 100% de plantules enracinées sont obtenues en utilisant 5 μM d'ANA à la place de 1 μM d'AIA dans le milieu G7g d'induction de racines (Kouadio, 2007).

Il ressort de cet essai que l'usage d'ANA (1,3 μM) est favorable à l'enracinement, mais qu'il inhibe le débourrement et la croissance du bourgeon apical des tiges. Cet essai devait être poursuivi avec des teneurs plus faibles en ANA, mais pour des raisons pratiques cela n'a pas eu lieu. Nous avons maintenu l'AIA dans le milieu d'induction de racines pour la suite de nos recherches sur d'autres voies d'amélioration du rendement de plantules en croissance.

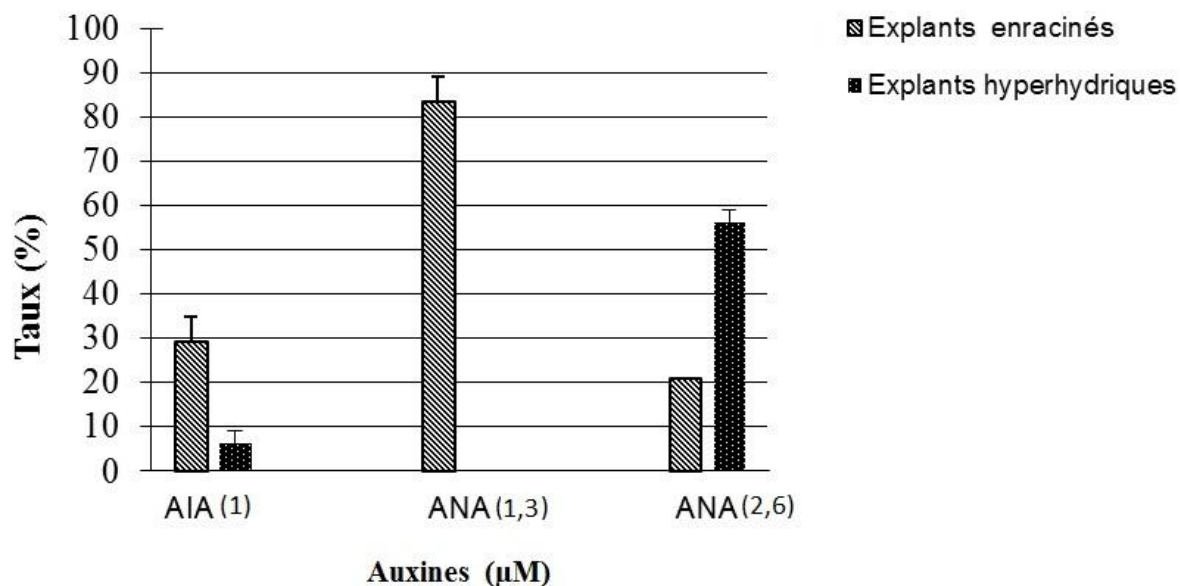


Figure 18. Taux d'explants enracinés et hyperhydriques de *P. vulgaris* (NI 637) après 2 semaines dans le milieu G7c de développement en plantules en fonction de l'AIA ou l'ANA ajouté au milieu G7g d'induction de racines.

Les barres placées au-dessus des rectangles représentent les écarts-types entre les moyennes calculées sur deux répétitions de 24 embryons chacune.



Figure 19. Embryon germé de *P. vulgaris* (NI 637) cultivé sur milieu d'induction G7g avec l'ANA (1,3 μM) à la place de l'AIA (1 μM) enraciné après 2 semaines sur G7c.

II. 3. 2. Influence du génotype sur le sauvetage d'embryons globulaires

Tous les embryons NI 637, NI 622 et X 484 de *P. vulgaris* et NI 16 de *P. coccineus* avaient atteint au stade cordiforme jeune après une semaine de culture de gousses. La germination des embryons (78% et 88%) est alors satisfaisante et significativement équivalente ($P \leq 0,05$) tous génotypes confondus (tableau 7).

Tableau 7. Taux moyens de germination en pourcentage (%) par rapport à l'effectif des embryons isolés mis en culture selon le génotype.

Espèce	Génotype	Effectif embryons	Germination
<i>P. vulgaris</i>	NI 622	80	87,5 ($\pm 9,9$)
	NI 637	80	78,8 ($\pm 7,1$)
	X 484	100	85 (± 5)
<i>P. coccineus</i>	NI 16	100	86 (± 4)

Les taux moyens de germination des embryons chez 3 génotypes de *P. vulgaris* et 1 génotype de *P. coccineus* sont significativement équivalents au seuil de probabilité $P \leq 0,05$. Les valeurs entre parenthèses correspondent aux écarts-types des moyennes calculées pour 5 répétitions, avec des effectifs de 16 à 20 embryons par répétition.

Si les embryons poursuivent leur germination normalement en surface du milieu de culture G6 (Fig. 20A), ils forment un cal hyperhydrique au niveau de la racicule (Fig. 20B) lorsque celle-ci est enfouie dans le même milieu G6.

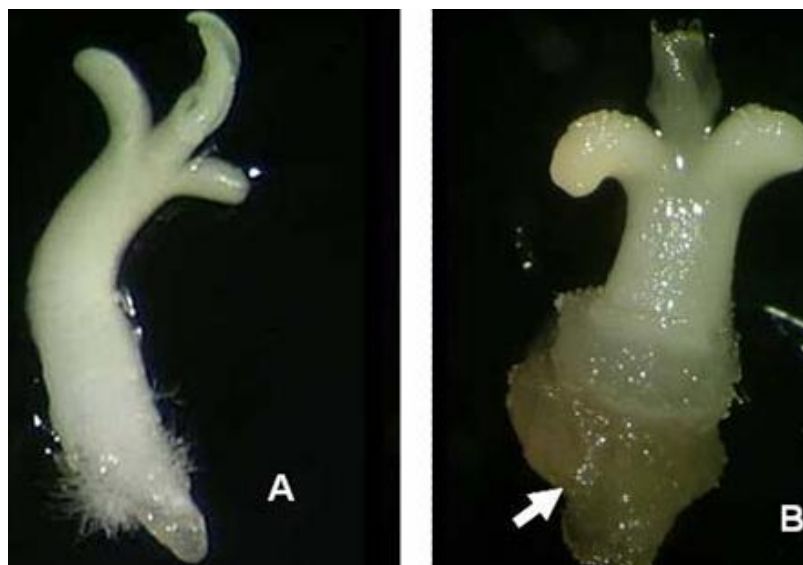


Figure 20. Embryons germés après deux semaines avec racicule en surface (A) ou enfouie (B) dans le milieu G6.

La flèche indique la formation du cal hyperhydrique au niveau de la zone racinaire.

Toutefois, les embryons ne poursuivent pas pour autant leur développement en plantules. On observait toujours un cal brun hyperhydrique à la place des racines et le développement des primordia foliaires en tiges feuillées était interrompu chez tous les génotypes (Fig. 21).

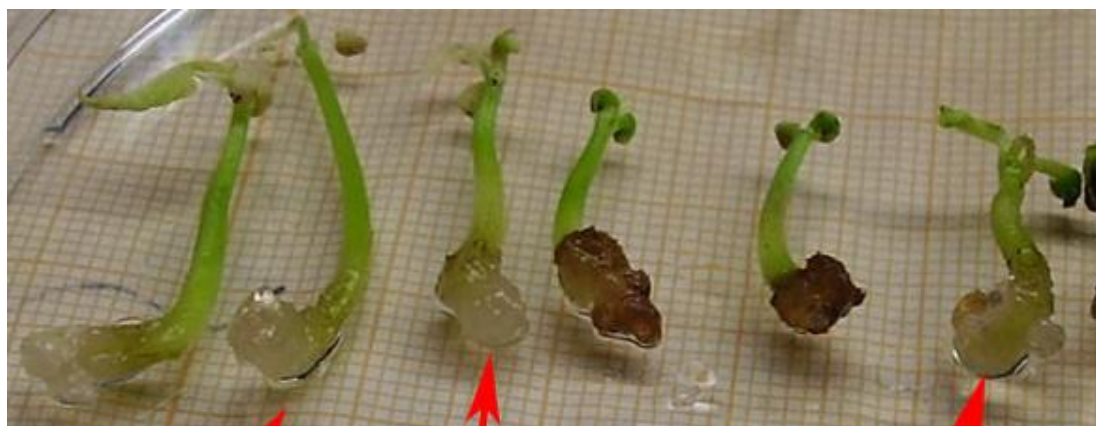


Figure 21. Embryons germés en arrêt de croissance après 2 semaines sur le milieu de développement en plantules G7c.

Les flèches rouges indiquent la formation du cal brun hyperhydrique au niveau du pôle racinaire de chaque explant.

Nos résultats confirment les problèmes d'enracinement et l'arrêt de croissance des embryons germés rapportés auparavant lors de l'embryoculture chez différents génotypes de *P. vulgaris* ou *P. polyanthus* (Lecomte, 1997 ; Mergeai *et al.*, 1997 ; Geerts *et al.*, 2000 ; Geerts, 2001). Des observations identiques ont aussi été rapportées au sein d'un autre laboratoire avec le cultivar ICA Piajo de *P. vulgaris* (Schryer *et al.*, 2005). Ces derniers auteurs ont pu obtenir une amélioration du taux d'enracinement et du taux de plantules en croissance (12%) grâce au microgreffage *in vitro* de *P. vulgaris* sur *P. angustissimus*, suivant un protocole que nous avons illustré dans la figure 8 de la partie bibliographique de ce document, au paragraphe 1.2.3.2.

Bien qu'aucune plantule en croissance n'ait été observée, nos taux de germination obtenus chez NI 637 de *P. vulgaris* correspondent presque au double de ceux rapportés (45%) par Geerts *et al.* (2000) et Geerts (2001). Nos résultats sont aussi supérieurs à ceux rapportés durant la culture d'embryons isolés de l'ovule au stade cordiforme jeune chez différents génotypes de *P. vulgaris* (25 à 70% selon le génotype) et chez NI 16 de *P. coccineus* (33%) (Lecomte, 1997). La différence significative dans la germination entre génotypes constatée par ce dernier auteur ne se répète pas chez nous.

L'explication de la supériorité de nos taux de germination par rapport à ceux rapportés antérieurement pourrait se trouver au niveau de la position des embryons déposés, pour la plupart, en surface du milieu et au niveau du retrait de la BAP du milieu de culture G1.

L'arrêt de croissance des embryons germés observé confirme une fois de plus les difficultés d'obtenir des plantules à partir d'embryons isolés des gousses précultivées (Geerts *et al.*, 2000 ; Geerts, 2001). Les quelques plantules (3%) obtenues avec NI 637 de *P. vulgaris* s'expliqueraient dans leur cas par la présence d'embryons cotylédonaire (9%) parmi les embryons isolés des gousses précultivées (Geerts *et al.*, 2000). Ce dernier stade de développement, requis pour la culture *in vitro*, pourrait être atteint en prolongeant la durée de culture des embryons au sein de leur structure maternelle.

II. 3. 3. Etude comparative de la culture d'ovules et de demi-ovules

Cet essai a été réalisé en vue d'extraire des embryons au stade cotylédonaire. La culture de gousses (Cg) associée à la culture d'ovules (Cov), d'une part, et à la culture de demi-ovules (Cdo), d'autre part, a été comparée à la culture de gousses (Cg) réalisée comme culture témoin. Les embryons extraits (Fig. 22) comportent les types cordiformes jeunes, cordiformes âgés et cotylédonaire.

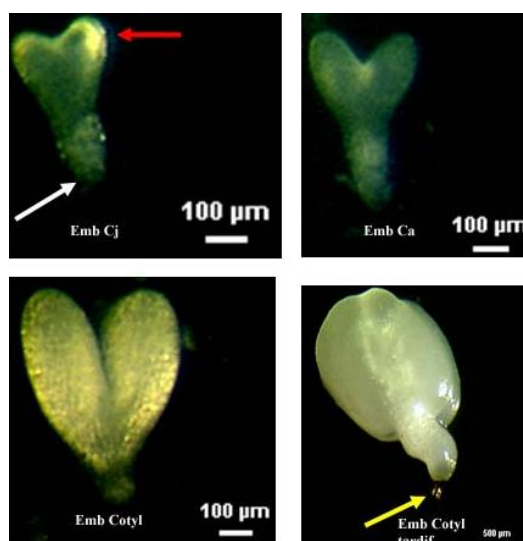


Figure 22. Stades de développement des embryons observés à l'extraction chez *P. vulgaris*.

Les observations sont réalisées à la loupe binoculaire au grossissement x 25 pour les embryons (Emb) au stade Cj (cordiforme jeune) et au grossissement x 10 pour les embryons aux stades Ca (cordiforme âgé) et Cotyl (cotylédonaire).

Les résultats (tableau 8) montrent que la culture de gousses complétée par la Cov ou la Cdo permet d'extraire des embryons cotylédonaire en plus des embryons cordiformes jeunes et âgés, alors que la culture de gousses seule produit uniquement des embryons cordiformes.

Tableau 8. Taux moyens d'extraction et de perte d'embryons (%) chez *P. vulgaris* (NI 637) selon la technique de culture et leur stade de développement.

Technique de culture	Stade de développement embryonnaire			Extraction	Perte
	Cordiforme jeune	Cordiforme âgé	Cotylédonaire		
Cg	73,3 a ($\pm 5,7$)	26,7 a ($\pm 5,6$)	0 b	100	0
Cg + Cov	2,7 b ($\pm 2,5$)	49,0 a ($\pm 8,5$)	5,7 a ($\pm 3,2$)	57,3	42,7
Cg + Cdo	5,0 b ($\pm 3,6$)	37,3 a ($\pm 21,1$)	6,3 a ($\pm 3,7$)	48,7	51,3

Pour chaque technique de culture de gousses (Cg), ou Cg + Cov (culture d'ovules) ou Cg + Cdo (culture de demi-ovules), 3 répétitions ont été réalisées avec 100 ovules par répétition, soit 300 extractions. Les taux moyens d'embryons extraits sont comparés par le test de Newman et Keuls au seuil 5%. Les valeurs suivies de lettres identiques sont significativement équivalentes au seuil de probabilité $P \leq 0,05$. Les valeurs entre parenthèses correspondent aux écarts-types des taux moyens obtenus.

Toutefois, les pertes occasionnées (50%) à l'extraction des embryons provenant des cultures mixtes (Cg+Cov ou Cdo) ont conduit à un rendement en embryons cotylédonaire encore plus faible (6%) que celui rapporté dans les travaux antérieurs (9%) avec la culture de gousses (Geerts *et al.*, 2000 ; Geerts, 2001). En revanche, cette dernière s'est révélée plus appropriée pour l'extraction des embryons aux stades cordiformes jeune et âgé.

Les deux cultures mixtes (Cg+Cov ou Cdo) sont donc efficaces pour permettre aux embryons globulaires de se développer jusqu'au stade cotylédonaire. Les pertes considérables liées à l'extraction doivent trouver une solution. C'est pourquoi nous avons envisagé de réaliser la culture *in ovulo* afin d'induire la germination des embryons *in ovulo*.

II. 3. 4. Evaluation de la germination *in ovulo*

En vue d'induire la germination *in ovulo*, nous avons décidé d'étudier les conditions qui permettraient de prolonger la durée de culture des ovules. Trois facteurs ont aussi été évalués : la solution minérale du milieu de maturation et germination, le génotype et la nature de l'explant (ovule ou demi-ovule).

II. 3. 4. 1. Influence de la solution minérale du milieu de maturation et germination

Cet essai a été réalisé à partir d'ovules isolés des gousses de NI 637 de *P. vulgaris* fraîchement récoltées à 4 JAP. Ce délai correspond aux embryons au stade globulaire tardif (Lecomte, 1997).

La germination *in ovulo* est observée après 8 semaines de culture en présence des solutions minérales M1 et M2 (Fig. 23). Malgré un taux de maturation équivalente, la germination *in ovulo* est significativement ($P \leq 0,05$) supérieure avec M1 (19%) qu'avec M2 (4%) (Fig. 23).

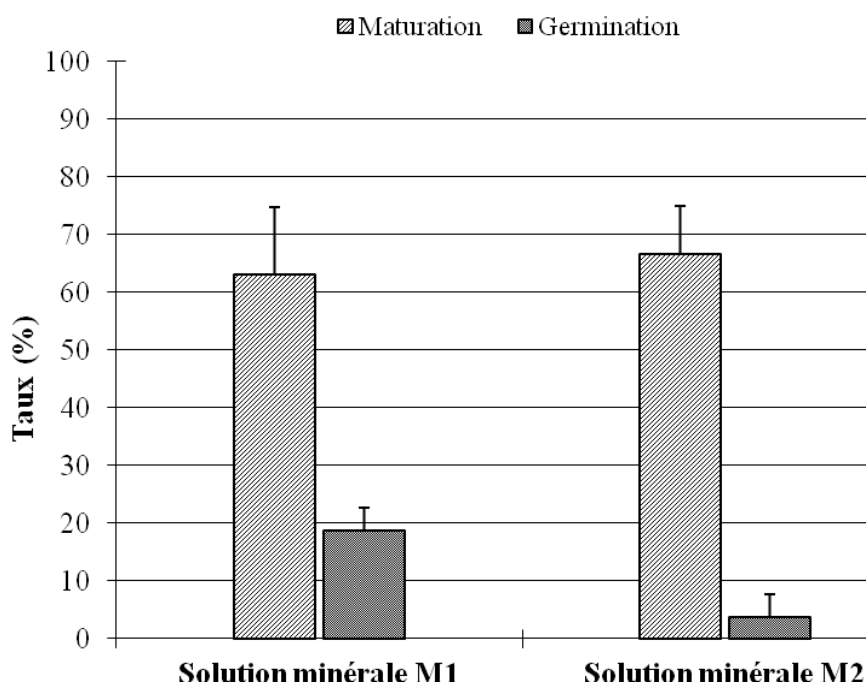


Figure 23. Taux moyens de maturation et de germination *in ovulo* de *P. vulgaris* (NI 637) en fonction de la solution minérale.

Les ovules sont cultivés dans deux milieux de maturation et germination avec la solution M1 (Mergeai *et al.*, 1997) ou M2 (Geerts, 2001) pendant 8 semaines. Les taux moyens de maturation et de germination ont été déterminés pour trois répétitions (120 ovules par répétition) par milieu de culture au seuil de probabilité $P \leq 0,05$. Les barres placées au-dessus des rectangles correspondent aux écarts-types des moyennes des trois répétitions.

Par ailleurs, durant l'incubation on observait un gonflement progressif de l'ovule pendant les deux premières semaines (Fig. 24A), suivi, d'une décoloration et d'un rétrécissement progressif de l'ovule (Fig. 24B) jusqu'à la 8^{ème} semaine où l'embryon devenaient visible (Fig. 24C). Après séparation du reste de l'ovule, les embryons germés *in ovulo* présentaient une longue racine et des primordia foliaires (Fig. 25).

En nous basant sur l'embryogenèse *in vivo* (paragraphe I. 1. 5), le gonflement de l'ovule traduirait une entrée maximale d'eau dans l'ovule en début de maturation ; la dépression ovulaire indiquerait une maturation avancée de l'embryon avec accumulation des réserves dans les cotylédons ; l'observation de l'embryon à l'extérieur de l'ovule indique la germination. Cette dernière étape est précédée dans la nature par la déshydratation de la graine (Campbell et Reece, 2007).

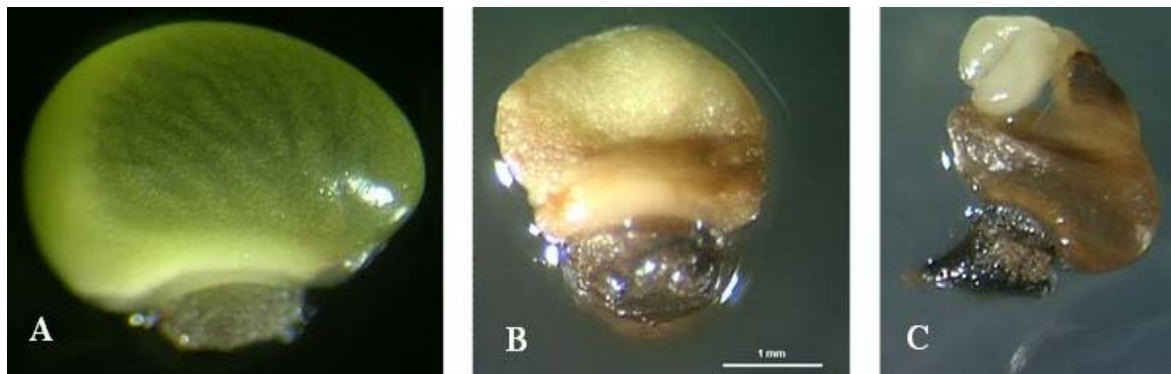


Figure 24. Maturation et germination *in ovulo* à partir d'ovules âgés de 4 JAP chez *P. vulgaris* (NI 637).

L'augmentation du volume de l'ovule après 2 semaines traduirait une entrée maximale d'eau en début de maturation *in ovulo* (A), suivie d'un brunissement et d'une dépression ovulaire qui indiqueraient une accumulation des réserves dans les cotylédons (B) après 4 semaines, ce qui correspond à la maturation tardive. L'observation de l'embryon à l'extérieur de l'ovule (C) à la 8^{ème} semaine correspond à la germination *in ovulo*.



Figure 25. Embryon germé *in ovulo* après 8 semaines et isolés du reste de l'ovule.

Il ressort de nos données que la germination des embryons *in ovulo* est significativement meilleure avec la solution minérale M1 par rapport à M2. Cette dernière (M2) (composée des sels de Phillips *et al.* (1982)) par rapport à la solution minérale M1 (contenant les sels de Gamborg *et al.* (1968)) pourrait être trop riche en sels minéraux.

Toutefois, par rapport à Geerts *et al.* (1999) qui recommandaient un milieu contenant la solution minérale (M2) pour des embryons cordiformes jeunes, notre culture a été réalisée avec des ovules contenant des embryons au stade globulaire. L'excès de sels minéraux serait donc plus néfaste pour les embryons globulaires que pour les embryons cordiformes, comme cela avait été rapporté chez *Capsella* (Monnier, 1976). Chez *Phaseolus*, le développement des embryons globulaires précoces a été réalisé avec succès via la culture de gousses dans un premier milieu de Phillips (P₀0) 2 fois moins concentré en sels minéraux, par rapport aux deux autres milieux (P₀1) (tableau 3) qui sont utilisés pour la culture de gousses renfermant des embryons plus âgés.

L'absence de développement des embryons globulaires dans un milieu à forte teneur en sels minéraux a également été rapportée durant l'embryoculture d'autres légumineuses alimentaires appartenant aux genres *Lens*, avec le milieu de Murashige et Skoog (1962) (Polanco et Ruiz, 2001) ou *Cicer*, avec le milieu ML-6 de Kumar *et al.* (1988) (Clarke *et al.*, 2006).

Nous recommandons le milieu de maturation qui contient la solution minérale M1 (Mergeai *et al.*, 1997) pour la culture des ovules contenant des embryons globulaires. Les résultats relativement faibles de germination *in ovulo* (19%) pourraient être dus au génotype NI 637 de *P. vulgaris*, choisi afin de comparer nos données avec celles obtenues lors des essais antérieurs à notre travail.

II. 3. 4. 2. Influence du génotype

Le protocole de germination *in ovulo* préalablement mis au point chez le génotype NI 637 de *P. vulgaris* a été testé chez 4 autres génotypes de la même espèce avec NI 637 comme référence (tableau 9). Pour tous les génotypes testés, la plus forte proportion d'embryons germés *in ovulo* a été observée au bout de 8 semaines. Les taux de maturation (60%) significativement équivalents ($P \leq 0,05$) d'un génotype à l'autre indiquent qu'il y a maturation *in ovulo* pour tous les génotypes. Par contre, il apparaît, une variabilité génotypique pour la germination. Les taux de germination *in ovulo* obtenus chez les génotypes NI 622 et X 484 sont significativement ($P \leq 0,05$) supérieurs (27%) à ceux des génotypes NI 637 et X 707 (18%).

Tableau 9. Taux moyens de maturation et de germination (%) des embryons globulaires cultivés *in ovulo* en fonction du génotype.

Génotype	Effectif d'ovules cultivés	Taux moyen de maturation	Taux moyen de germination
NI 622	180	66,7 a ($\pm 8,3$)	27,2 a ($\pm 1,9$)
X 484	180	58,3 a ($\pm 8,3$)	26,1 a ($\pm 3,5$)
X 707	180	59,5 a ($\pm 6,3$)	17,8 b ($\pm 2,6$)
NI 637	180	58,3 a ($\pm 8,3$)	18,3 b ($\pm 1,7$)

Chaque génotype a été évalué trois fois avec un effectif de 60 ovules par répétition. Les valeurs suivies par des lettres différentes sont significativement différentes au seuil de probabilité $P \leq 0,05$. Les valeurs entre parenthèses correspondent aux écarts-types des moyennes calculées après 3 répétitions.

Notre taux de germination *in ovulo* correspond au double de celui rapporté au cours d'une étude préliminaire réalisée avec le génotype NI 637 de *P. vulgaris* (8%) (Dherte, 1995). La supériorité de nos résultats pourrait être liée au positionnement à plat des ovules durant la culture. Nous observons parfois la formation d'un cal bun hyperhydrique au niveau du funicule, sans germination *in ovulo*, lorsque celui-ci est inclus dans le milieu (Fig. 26).



Figure 26. Ovule de *P. vulgaris* (X 707) en culture *in vitro* sur un milieu de maturation G1 depuis trois semaines.

La formation du cal hyperhydrique au niveau du funicule est indiquée sur ce schéma par une flèche rouge. Ce cal hyperhydrique est observé lorsque le funicule est inclus dans le milieu de culture.

Nos observations rejoignent celles de Sauer et Friml (2004) pour lesquels l'immersion du funicule dans le milieu s'est révélée défavorable à la survie des ovules et des embryons chez *Arabidopsis*. D'après nos observations, la variabilité de la germination *in ovulo* pourrait être liée à l'incapacité de certains embryons à percer la paroi de l'ovule, particulièrement chez les génotypes NI 637 et X 707 de *P. vulgaris*. A la section, nous avons en effet constaté que la paroi de leurs ovules est plus épaisse que celle des deux autres génotypes (X 484 et NI 622).

II. 3. 4. 3. Influence de la culture de demi-ovules

La culture de demi-ovules a été réalisée dans le but de contourner la barrière que pouvait représenter la paroi de l'ovule vis-à-vis de la germination *in ovulo*. Les ovules et demi-ovules sont issus des gousses récoltées à 4 JAP. L'évolution des embryons dans les demi-ovules ou les ovules est comparable en ce qui concerne le délai d'environ 8 semaines nécessaires pour faire germer le plus grand nombre d'entre eux.

Durant le développement embryonnaire, le demi-ovule (Fig. 27 A) se décolore et vire au brun au bout de deux semaines de culture (Fig. 27 B). L'embryon en développement est alors visible de l'extérieur (Fig. 27 C et D) et il s'isole finalement (Fig. 27 E) et germe *ex ovulo* (Fig. 27 F). Ceci n'est pas observé dans les ovules entiers, pour lesquels les embryons poursuivent leur germination à l'intérieur.

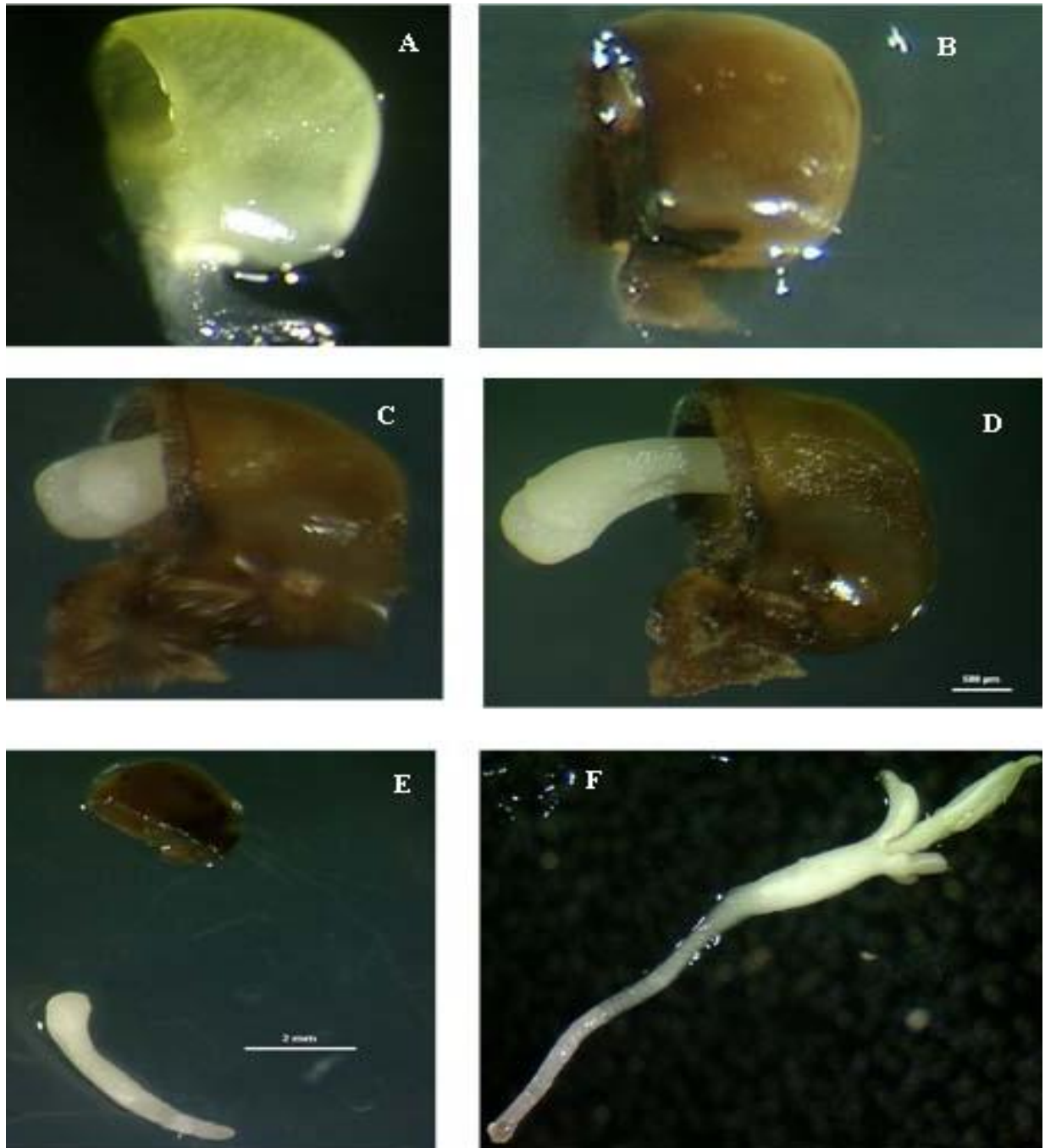


Figure 27. Maturation et germination d'embryons globulaires en demi-ovules chez X 484 de *P. vulgaris*.

Demi-ovule (4 JAP) après 2 (A), 4 (B), 6 (C) et 7 (D) semaines de culture. E : Embryon isolé après germination en demi-ovule à la 8^{ème} semaine. F : Embryon en germination *ex ovulo* après 9 semaines de culture en demi-ovules.

Malgré cette germination aisée, les taux de maturation et de germination des embryons cultivés en demi-ovules sont plus faibles (33% et 8%, respectivement) que ceux des ovules (63% et 27%, respectivement) (Fig. 28).

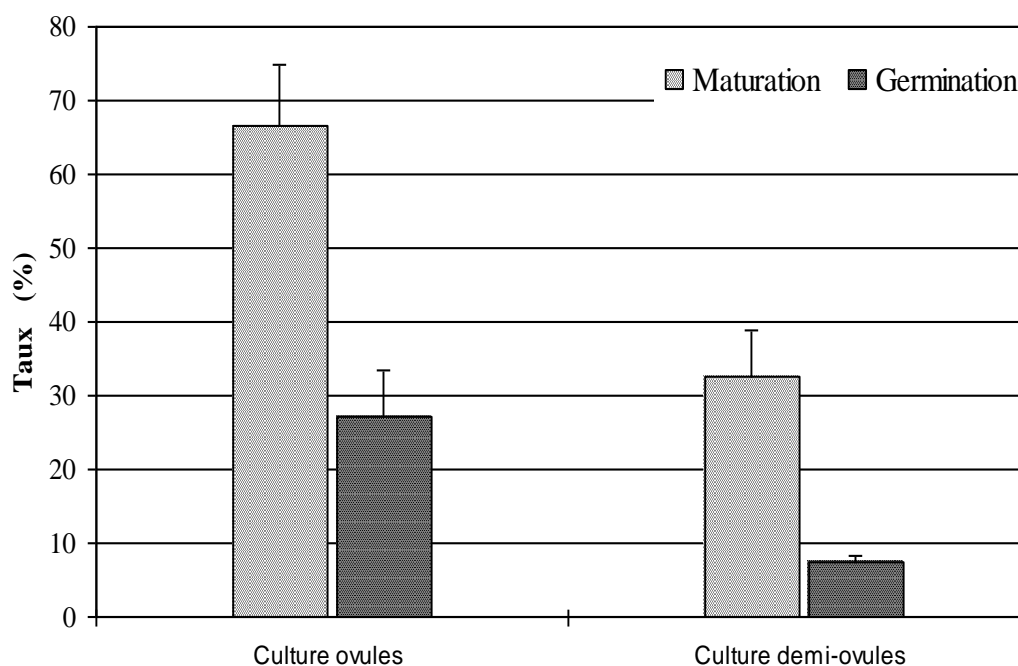


Figure 28. Taux moyens de maturation et de germination *in ovulo* et en demi-ovules de X 484 de *P. vulgaris*.

Taux moyens obtenus après 3 répétitions sur un effectif de 120 ovules par répétition. Les barres placées au-dessus des rectangles correspondent aux écarts-types des moyennes.

Tous les explants cicatrisés ont fini par se nécroser et c'est leur disposition en surface du milieu de culture gélosé qui contribuerait à cette nécrose. L'absence de germination observée en demi-ovules serait donc liée à la fermeture de l'orifice de la cavité ovulaire suite à sa cicatrisation. Chez *L. albus*, Vuillaume et Hoff (1986b) ont rapporté un développement de 60 à 100% (selon le génotype) lorsque les demi-ovules renfermant les embryons cordiformes sont noyés dans un milieu semi-solide (Agar-Difco : 5 g.L⁻¹). Chez *Alstroemeria*, une germination maximale des proembryons hybrides a été obtenue pour des demi-ovules cultivés en milieu liquide (Buitendijk *et al.*, 1995). Dans notre cas, nous avons pu obtenir une germination à partir d'embryons globulaires cultivés en demi-ovules, ce qui n'avait pas été le cas chez *L. albus* (Vuillaume et Hoff, 1986b). Notre germination en demi-ovules, renfermant des embryons globulaires, s'expliquerait par l'utilisation de la solution minérale M1 (milieu de Mergeai *et al.*, 1997) moins riche en sels minéraux que la solution MS, laquelle est utilisée pour la culture de demi-ovules chez *L. albus*.

Il ressort de cette étude que les cultures d'embryons en ovules et en demi-ovules aboutissent à la germination, particulièrement en milieu appauvri en sels, la première culture se révélant plus performante que la seconde. Les taux relativement faibles de germination *in ovulo* (respectivement 27% et 8%, selon le type de culture) par rapport aux taux de germination des embryons isolés des ovules prélevés des gousses précultivées (78 à 88% selon le génotype), nous ont toutefois incitée à maintenir la culture de gousses seule comme technique de base pour la culture d'embryons globulaires.

II. 3. 5. Amélioration du développement des embryons globulaires en plantules

Tenant compte de l'arrêt de croissance affectant les embryons germés (paragraphe II. 3. 2), nous avons testé le milieu G1 de maturation sous forme liquide, d'une part, et l'apport de charbon actif (CA) aux milieux G7g d'induction de racines et G7c de développement en plantules, d'autre part.

II. 3. 5. 1. Influence du milieu liquide de maturation et germination

La maturation des embryons isolés des gousses précultivées a été réalisée en milieu G1 liquide ou gélosé. L'évaluation a porté sur les taux de maturation, de germination, de développement en plantules et d'acclimatation. Les taux moyens de maturation sont déterminés après 3 jours en milieu liquide ou après une semaine en milieu gélosé (Fig. 29). Ce décalage dans la durée de culture s'explique par le fait que l'on observait un développement plus rapide des embryons cultivés en milieu liquide par rapport au milieu gélosé.

En milieu liquide, le pourcentage moyen de maturation atteint 23% contre 82% en milieu gélosé. En fait, en milieu liquide, la majorité des embryons au stade cordiforme jeune sédimentent au fond de la boîte de Pétri et n'évoluent plus. Seuls les embryons cordiformes âgés poursuivaient leur maturation. Parmi eux, certains ont germé prématurément (Fig. 30A). Par contre, en milieu gélosé, la majorité des embryons cultivés se sont développés progressivement, sans germer (Fig. 30 B).

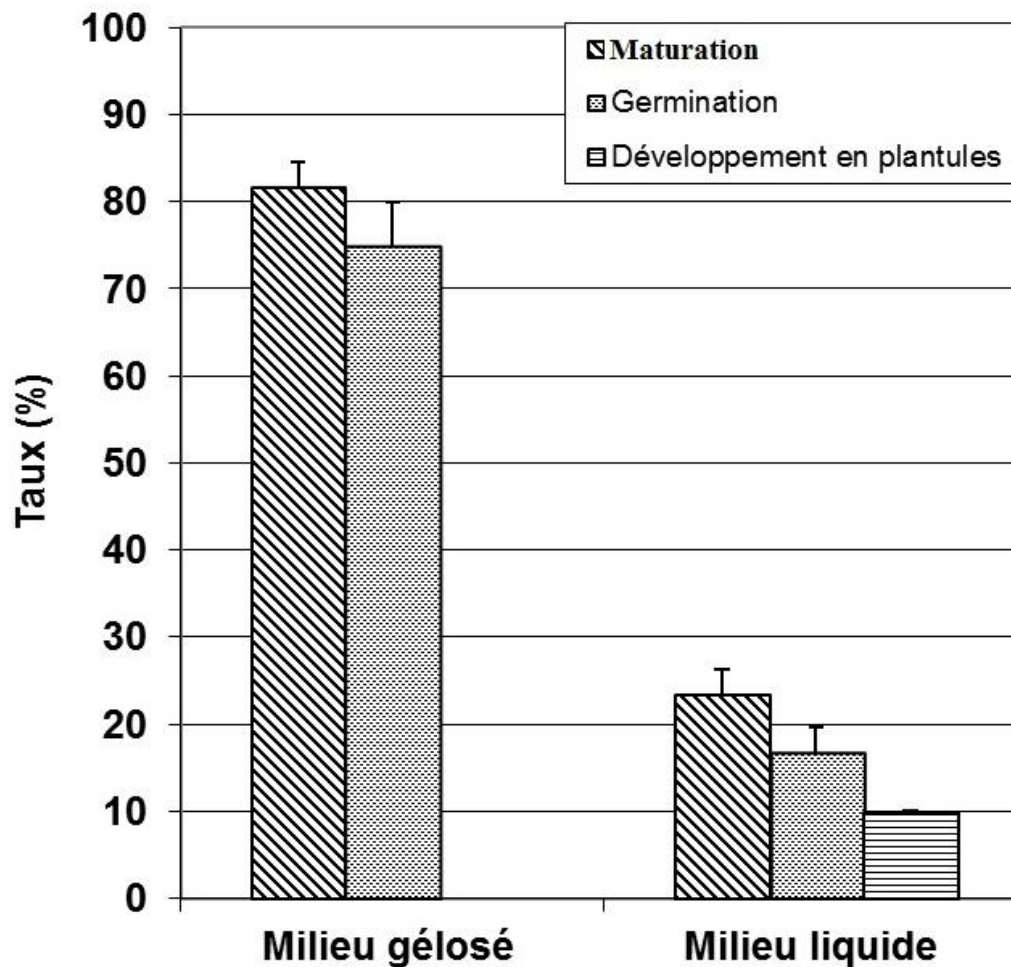


Figure 29. Taux moyens de maturation, de germination et de développement en plantules, en fonction de la nature physique du substrat du milieu de maturation.

Les embryons extraits des gousses cultivées ont servi à évaluer l'influence de la nature physique du substrat chez NI 637 de *P. vulgaris*. Les taux de maturation et de germination sont obtenus sur base de la réalisation de trois répétitions avec un effectif de 20 embryons par répétition. Les taux de maturation et de germination sont significativement supérieurs ($P \leq 0,05$) en milieu gélosé qu'en milieu liquide. Ce dernier permet cependant le développement en plantules et en plantes adultes après acclimatation.

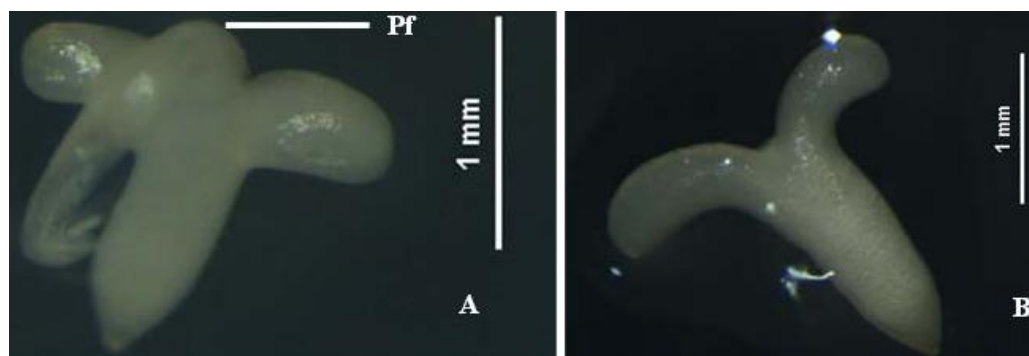


Figure 30. Embryons isolés des gousses précultivées après 3 jours de transfert en milieu (G1) de maturation et germination liquide (A) ou gélosé (B).

Les embryons extraits des gousses cultivées et qui ont été transférés sur un milieu de maturation et germination forment majoritairement des primordia foliaires (Pf) en milieu liquide (A) et évoluent progressivement sans Pf en milieu gélosé (B), après trois jours de culture.

Deux semaines après le transfert des embryons du milieu G1 sur G6, le taux de germination est plus élevé pour les embryons provenant du milieu gélosé (75%) que pour ceux issus du même milieu de maturation liquide (17%) (Fig. 29). Ces taux de germination atteignent, respectivement, 92% en milieu gélosé contre 72% en milieu liquide, lorsqu'ils sont exprimés par rapport aux effectifs d'embryons survivants transférés de G1 sur G6.

Par ailleurs, nous avons observé chez les embryons provenant du seul milieu liquide un bourgeonnement adventif apparaissant à la surface des cotylédons (Fig. 31).

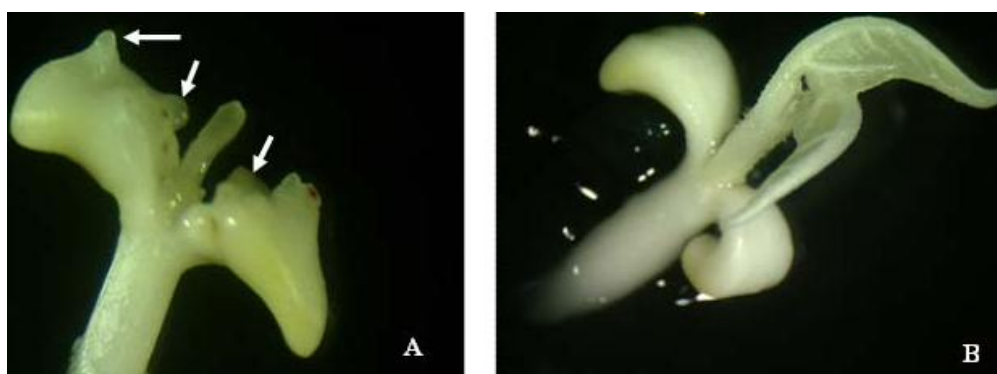


Figure 31. Embryons germés après deux semaines en milieu (G6) de déshydratation à partir des embryons précultivés en milieu G1 liquide (A) ou gélosé (B).

Les embryons provenant du milieu liquide manifestent un bourgeonnement (indiqué par des flèches) de la surface des cotylédons (A) par rapport aux embryons cultivés en milieu gélosé (B).

Après transfert sur milieu G7c, 60% des embryons germés provenant du milieu liquide ont produit des plantules (Fig. 32A), tandis que le reste a donné des embryons hyperhydriques qui se sont nécrosés après une semaine dans G7c. Les embryons germés qui ont évolué en plantules représentent 10% de l'effectif initial des embryons mis en culture.

Les embryons précultivés en milieu de maturation gélosé ont arrêté leur croissance après germination et, finalement, aucune plantule n'a pu être obtenue malgré la meilleure germination observée (Fig. 32B).

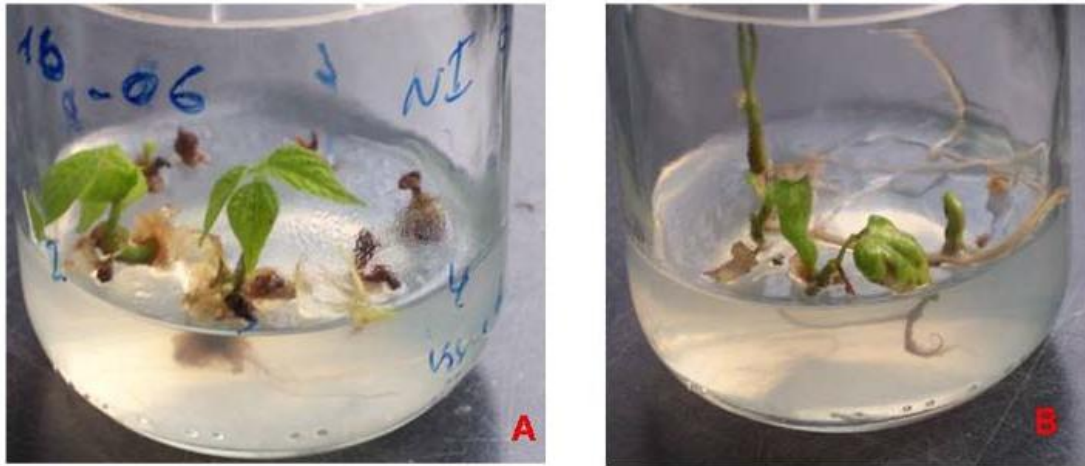


Figure 32. Explants (A) et (B) en culture depuis une semaine dans un milieu de développement en plantules.

A : plantules en croissance obtenues à partir des embryons précultivés en milieu de maturation et germination liquide ; B : arrêt de croissance des explants obtenus d'embryons précultivés en milieu de maturation et germination gélosé.

En acclimatation, les explants qui proviennent du milieu gélosé ont fini par se nécroser (Fig. 33 A). Par contre toutes les plantules qui proviennent du milieu liquide produisent une nouvelle feuille après une semaine (Fig. 33 B). Elles atteignent rapidement le stade adulte, c'est-à-dire le stade de floraison et de développement des gousses (Fig. 34). Alors que leur taille est cinq fois inférieure à celle d'une plante mère, les gousses et les graines produites sont identiques, comme rapporté chez le cultivar Dark Red Kidney de *P. vulgaris* après bourgeonnement adventif (Franklin *et al.*, 1991).



Figure 33. Explant (A) en arrêt de croissance et plantule (B) poursuivant son développement après une semaine d'acclimatation.

L'explant provenant du milieu G1 gélosé est en arrêt de croissance (A) tandis que les plantules issues du milieu G1 liquide développent une nouvelle feuille trifoliolée après une semaine d'acclimatation.



Figure 34. Observation d'une plante adulte après 30 jours d'acclimatation.

Après un mois d'acclimatation, la plante obtenue à partir d'un embryon précultivé en milieu liquide a fleuri et a produit des gousses.

Les performances plus favorables du milieu liquide s'expliqueraient par le fait que ce milieu facilite les échanges avec l'embryon (Raghavan, 1977 ; Etienne et Berthouly, 2002).

Le milieu liquide a cependant posé de sérieux problèmes pratiques dans le repérage des embryons en cours de culture et ce étant donné leur petite dimension. Le milieu liquide entraîne aussi la mort des embryons cultivés au stade cordiforme jeune. Ce type de culture en immersion continue conviendrait donc davantage aux gousses ou aux ovules, qui sont plus facilement manipulables que les embryons. Dans ce contexte, Toussaint *et al.* (2002) ont effectué une étude comparative sur des gousses récoltées à 4 JAP de *P. vulgaris* et *P. polyanthus*. Si la croissance des gousses et celle des ovules qu'elles renferment, et par conséquent des embryons extraits, étaient supérieures en milieu liquide par rapport au milieu gélosé chez *P. vulgaris*, c'était l'inverse chez *P. polyanthus*. Chez *Lupinus* (5 espèces du genre), Kasten et Kunert (1991) ont pu développer des plantules en fixant les embryons cultivés au stade cordiforme sur un support gélosé recouvert d'une fine couche de milieu liquide.

Le manque d'aération semble expliquer la mort des embryons les moins développés et l'hyperhydricité des explants provenant du milieu de maturation liquide. Cabasson *et al.* (1997, cités par Etienne et Berthouly, 2002) ont rapporté chez *Citrus deliciosa* Ten. l'arrêt du développement des embryons somatiques au stade globulaire lorsqu'ils sont cultivés en milieu liquide agité (à 100 rpm). Par contre, 66% d'entre eux atteignaient le stade cotylédonaire en utilisant l'immersion temporaire dans les récipients RITA. Chez *Hevea brasiliensis* (Mull. Arg.), le système de culture RITA a aussi permis de réduire l'hyperhydricité des embryons et de favoriser la germination ainsi que leur développement en plantules (Etienne *et al.*, 1997). L'amélioration des échanges gazeux et de la nutrition que procure l'immersion temporaire semblent être à l'origine des avantages de ce système de culture. Toutefois, les meilleurs résultats sont obtenus avec des fréquences et des durées d'immersion relativement faibles et variables selon les espèces (Etienne et Berthouly, 2002).

Il ressort de notre étude que le milieu liquide est meilleur que le milieu gélosé pour obtenir le développement des embryons en plantules. Le taux de plantules en croissance est trois fois plus élevé par rapport à celui obtenu antérieurement avec le milieu gélosé (3%) (Geerts *et al.*, 2000 ; Geerts, 2001).

Malgré cette amélioration en milieu liquide, les pertes importantes d'embryons cordiformes jeunes, nous ont incitée à maintenir le milieu gélosé afin de chercher d'autres voies d'amélioration du taux des plantules en croissance.

Une synthèse des différentes étapes de culture en milieu liquide ou gélosé avec les résultats obtenus est rapportée dans la figure 35.

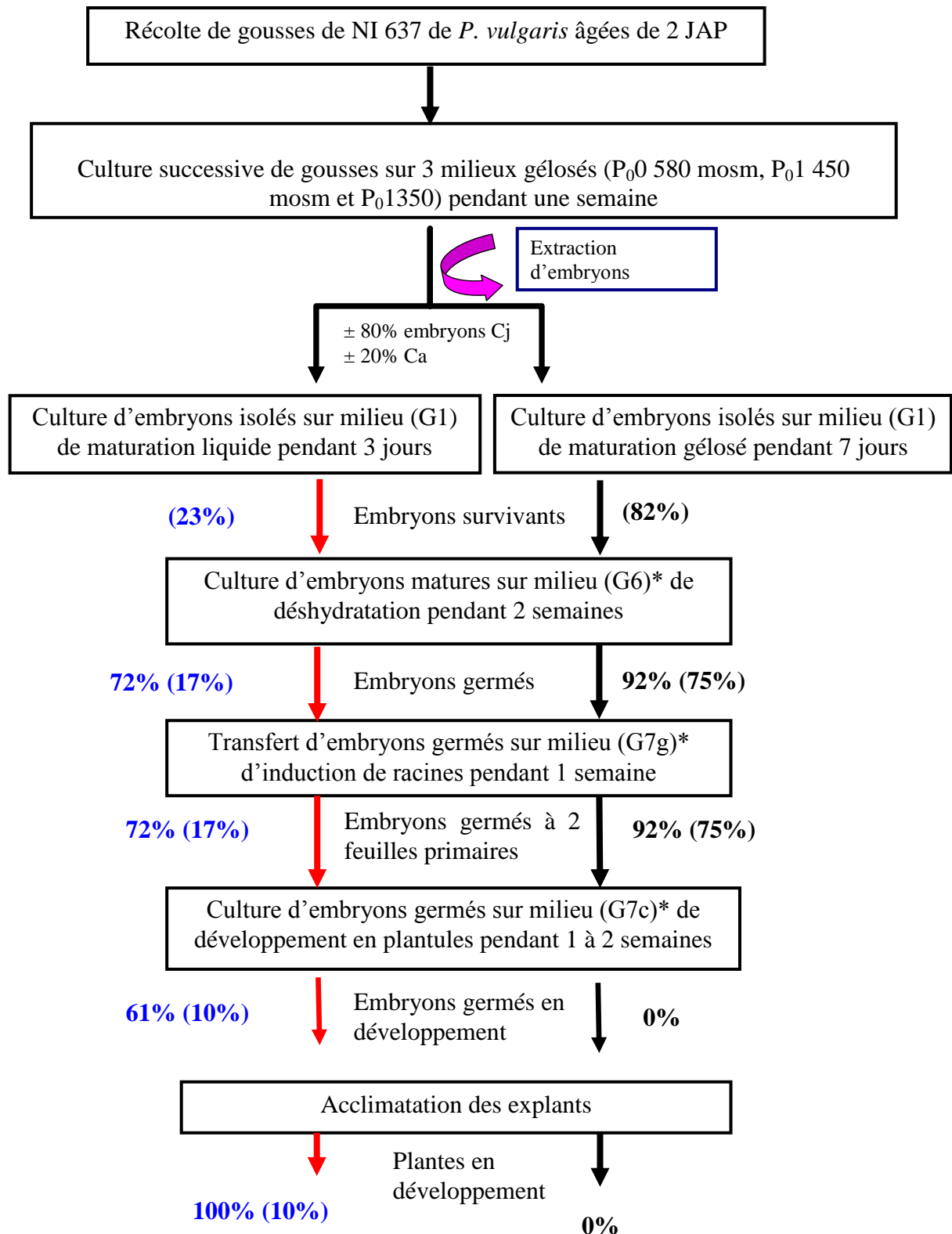


Figure 35. Synthèse des résultats obtenus concernant l'influence de la nature physique du milieu de culture sur le développement d'embryons isolés de gousses précultivées chez NI 637 de *P. vulgaris* jusqu'au stade de « plantules acclimatées ».

Les valeurs en bleu (à gauche) indiquent les résultats obtenus en milieu liquide ; en noir (à droite) ceux obtenus en milieu gélosé. Les valeurs entre parenthèses indiquent les taux en pourcentage par rapport à l'effectif initial des embryons mis en culture (20 embryons par répétition). Abréviations : Cj : cordiforme jeune Ca : cordiforme âgé. L'astérisque (*) indique que les milieux G6 et G7 g et G7c sont gélosés.

II. 3. 5. 2. Influence du charbon actif

Nous avons testé l'effet du charbon actif (CA), additionné dans les milieux G7g (induction de racines) et G7c (développement en plantules), sur l'enracinement et le développement en plantules (Fig. 36). En présence du CA, environ 92% d'embryons germés ont été enracinés et 60% ont évolué en plantules. Par contre, aucune plantule n'a été obtenue en absence de CA. Ces pourcentages rapportés par rapport à l'effectif des embryons germés sont identiques à ceux exprimés par rapport à l'effectif des embryons initialement mis en culture, dans la mesure où ils ont tous germés dans cet essai.

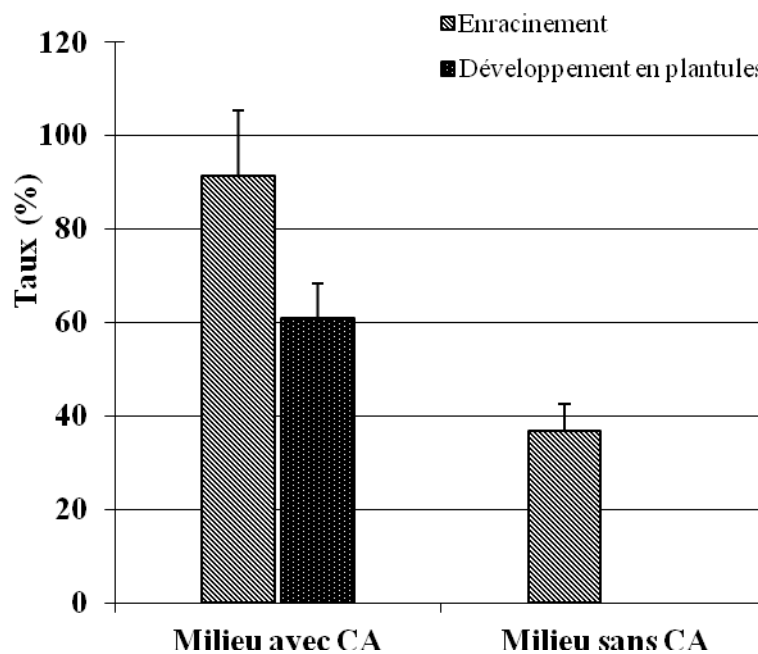


Figure 36. Taux moyens d'enracinement et de développement en plantules en présence ou en absence du CA (charbon actif).

Les taux d'enracinement et de développement en plantules sont calculés ($P \leq 0,05$) après 4 semaines dans le milieu G7c de développement en plantules. Les barres placées au dessus des rectangles représentent les écarts-types des moyennes obtenues pour trois répétitions avec un effectif de 75 embryons germés par répétition.

Les explants cultivés en présence de CA se développent mieux et produisent des plantules vigoureuses (Fig. 37A). Par contre, sans CA, il y a pour la plupart formation de cals bruns hyperhydriques au niveau de la zone racinaire, sans croissance de la partie aérienne (Fig. 37B).

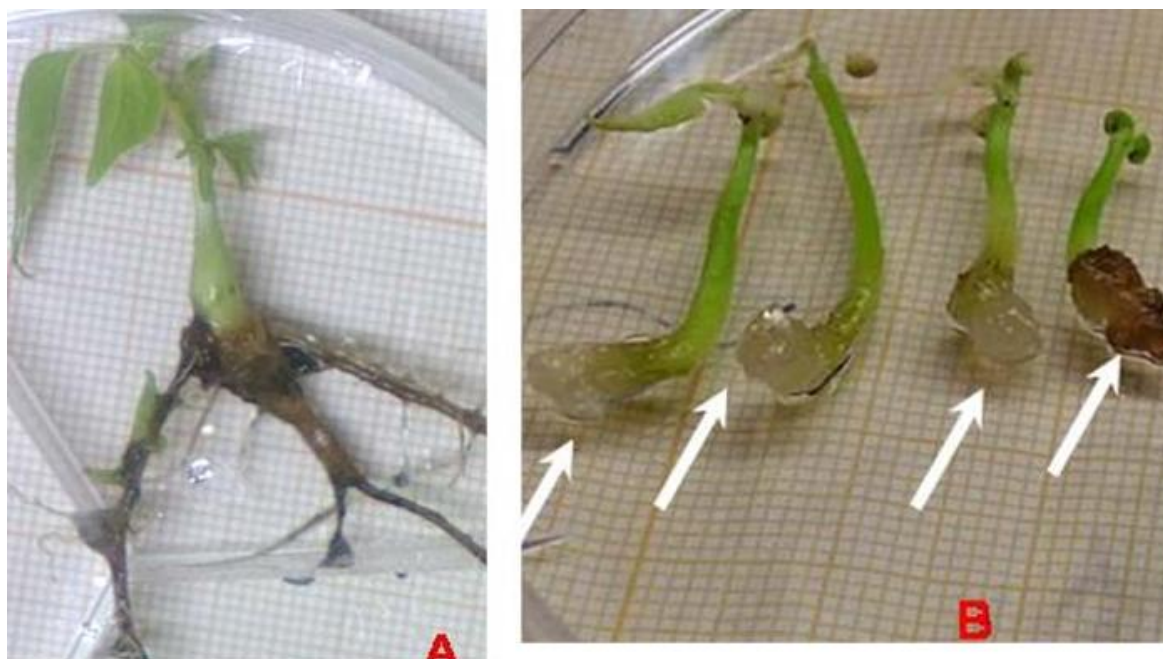


Figure 37. Plantule vigoureuse (A) développée en présence de CA et embryons germés en arrêt de croissance (B) obtenus en absence de CA après 4 semaines en milieu G7.

L'addition du CA dans les milieux d'induction de racines et de développement en plantules a favorisé l'enracinement et le développement des embryons germés (A) tandis que son absence limite leur croissance et favorise la formation de cals bruns hyperhydriques (indiqués par des flèches) au niveau de leur zone racinaire (B).

L'absence des racines peut être due au brunissement de la base des explants ou au milieu environnant. Ce processus de brunissement résulte de l'action d'enzymes oxydases, telles que les polyphénols oxydases, synthétisées par le tissu du fait de l'excision des explants (Lerch, 1981, cité par El Yacoubi *et al.*, 2010). Les polyphénols et les produits de leur dégradation (Maier et Metzlier, 1965 ; Loomis et Battaile, 1966, cités par El Yacoubi *et al.*, 2010) entraîneraient la mort des explants en culture *in vitro*.

Le CA, par ses propriétés d'absorption des dérivés polyphénoliques, aurait favorisé le développement de l'embryon germé en plantule. De tels composés, comme 2-hydroxybenzyl alcool, l'acide 4-hydroxybenzoïque et surtout 4-hydroxybenzyl alcool, ont été identifiés dans le milieu lors de l'embryogenèse somatique et zygotique chez la carotte (Kobayashi *et al.*, 2001 ; 2003).

En présence du charbon actif, nous avons obtenu un meilleur taux de régénération (60%). Cette amélioration est considérable, car elle correspond à un taux de régénération 20 fois plus élevé par rapport à celui rapporté auparavant en absence de CA dans les milieux G7g et G7c (Geerts *et al.*, 2000 ; Geerts, 2001).

Les effets stimulateurs du CA sur l'enracinement et la croissance des plantules *in vitro* ont été rapportés lors des analyses bibliographiques des travaux réalisés chez plusieurs espèces végétales (Pan et van Staden, 1998 ; Thomas, 2008).

Il ressort de notre étude que le charbon actif permet d'améliorer considérablement notre processus de sauvetage d'embryons globulaires cultivés en gousses et ce lorsqu'il est utilisé pour l'enracinement et le développement en plantules. Cependant, certains des embryons germés enracinés ou non restent bloqués au stade « deux feuilles primaires ». Ces derniers nous ont incitée à réaliser le microbouturage de nœuds cotylédonaire.

Un schéma du protocole utilisé et des résultats obtenus avec ou sans CA est représenté en figure 38.

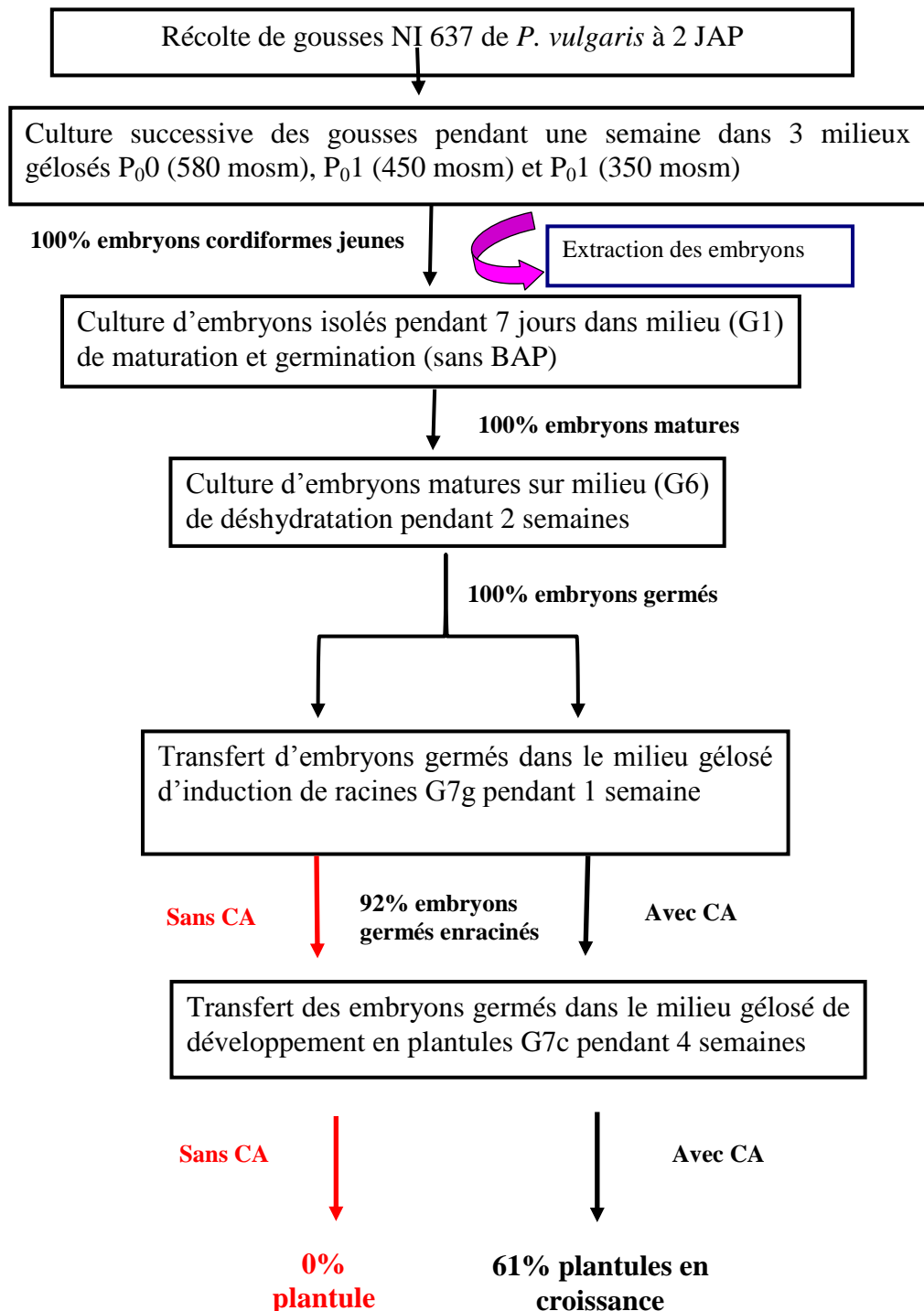


Figure 38. Schéma de synthèse des résultats obtenus dans l'essai portant sur l'influence du CA (charbon actif) sur le développement en plantules des embryons globulaires via la culture de gousses chez NI 637 de *P. vulgaris*.

II. 3. 6. Sauvetage d'embryons globulaires par microbouturage de nœuds cotylédonaire

Dans le but de sauver un grand nombre de plantules à la suite de la germination des embryons issus de la culture de gousses, nous avons eu recours au microbouturage de nœuds cotylédonaire (NC). Nous avons testé trois facteurs importants, à savoir : le milieu de culture, le génotype, et l'emploi du CA.

II. 3. 6. 1. Influence du milieu de culture

Les nœuds cotylédonaire ont été isolés des embryons germés en arrêt de croissance. Ces derniers provenaient de la culture préalable de gousses suivie de la culture d'embryons isolés de l'ovule. *P. coccineus* (NI 16) a été retenue pour cet essai pour son efficacité déjà rapportée au cours de la régénération par microbouturage de nœuds cotylédonaire prélevés de graines germées (Vaquero *et al.*, 1993 ; Santalla, *et al.* 1998).

Nous avons testé en parallèle le milieu MS de Murashige et Skoog (1962) modifié et le milieu G7c de Geerts *et al.* (1999) modifié (tableau 6). Ont été enregistrés les taux de régénération des plantules *in vitro* et des plantes après acclimatation.

Une différence de régénération hautement significative a été obtenue en faveur du milieu MS modifié. Après 4 semaines de microbouturages, ce milieu MS nous a permis de régénérer en plantules 93% des 220 microboutures (pour 4 répétitions réalisées) mises en culture. Ces plantules comportent une tige robuste munie d'une à deux feuilles trifoliolées et des racines adventives (Fig. 39A). Par contre, avec le milieu G7c, on observait un débourrement des bourgeons axillaires du nœud cotylédonaire après une semaine de microbouturage, suivie de la formation de cals bruns à la place des racines, et d'une décoloration (chlorose) des feuilles débourrées et sans formation de tige (Fig. 39B).

Les plantules régénérées dans le milieu MS forment une ou deux nouvelles feuilles trifoliolées après deux semaines d'acclimatation (Fig. 40A) et développent 6 semaines plus tard des plantes adultes (Fig. 40B) identiques aux plantes mères.

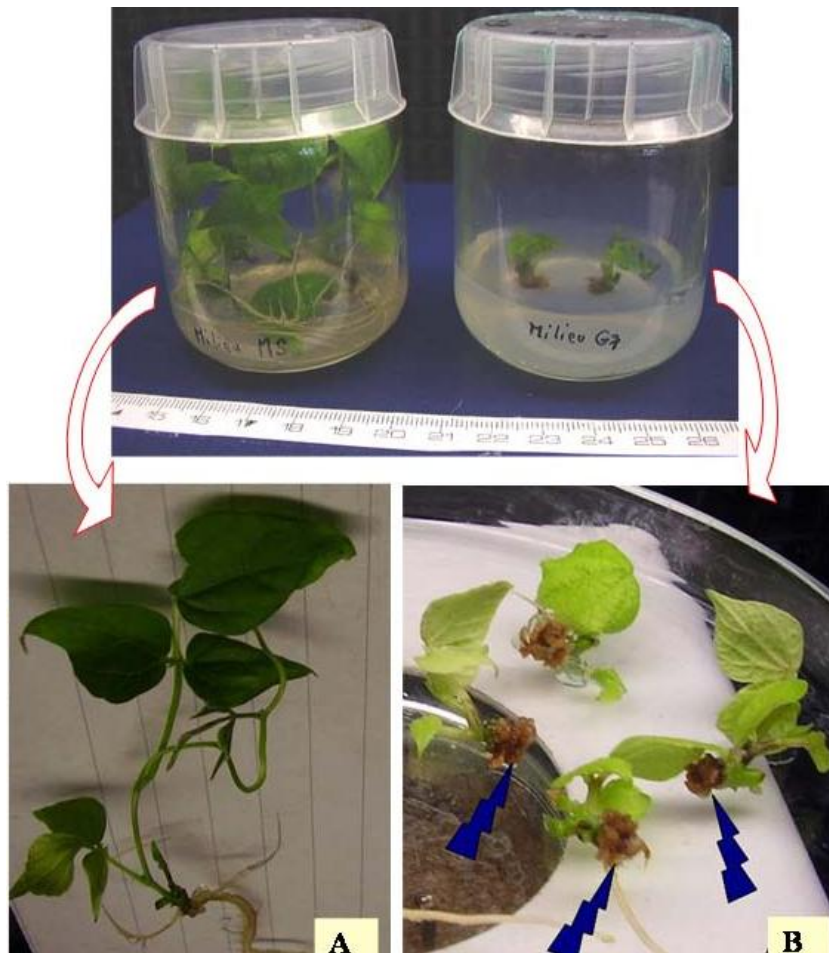


Figure 39. Développement de microboutures de *P. coccineus* (NI 16) après 4 semaines dans les milieux MS (A) et G7c (B).

A : plantule développée dans le milieu MS (Murashige et Skoog, 1962) modifié ; B : explants en arrêt de croissance avec formation de cals bruns au niveau du pôle racinaire (flèches bleues), et obtenus avec les microboutures cultivées en milieu G7c (Geerts *et al.*, 1999) modifié.



Figure 40. Acclimatation et développement de plantes adultes de *P. coccineus*.

A et B représentent respectivement des plantules en croissance après deux semaines d'acclimatation en cellule conditionnée et des plantes adultes régénérées après six semaines en serre tropicale.

La supériorité du milieu MS par rapport au milieu G7c peut s'expliquer par sa teneur élevée en sels minéraux et particulièrement par sa teneur en sels azotés, comme le nitrate d'ammonium (NH_4NO_3), qui constitue l'une des principales sources d'azote (N) dans les milieux de culture *in vitro* (George *et al.*, 2008).

Chez deux cultivars ("Lodino" et "Bico de Ouro") de *P. vulgaris*, Allavena et Rossetti (1986) ont observé que le milieu MS complet était bénéfique au développement des pousses par rapport à un même milieu dans lequel les sels azotés sont réduits de 1/4. Ce second milieu induit des nécroses et du cal, comme nous l'avons aussi observé avec le milieu G7c modifié.

Le milieu MS complet est également utilisé avec succès chez d'autres cultivars de *P. coccineus* (Allavena et Rossetti, 1986 ; Vaquero *et al.*, 1993). Par contre le milieu B5 de Gamborg *et al.* (1968) serait plus efficace que le milieu MS pour la croissance et l'enracinement des pousses adventives chez 4 cultivars (Apetito G13637, Flor de Mayo Anita, ICA Palmar G4523 et Pinto Saltillo) de *P. vulgaris* (Quintero-Jiménez *et al.*, 2010). Il est donc probable qu'il existe une interaction entre le génotype et la composition minérale du milieu de culture pour la réussite de la régénération des plantes par microbouturage de nœuds cotylédonaire dans le genre *Phaseolus*.

Les performances du microbouturage du NC dans le milieu MS (93% de régénération) par rapport au milieu G7c (0%) chez le génotype NI 16 de *P. coccineus*, nous ont incitée à évaluer cette technique chez d'autres génotypes.

II. 3. 6. 2. Influence du génotype

Les taux moyens de plantules régénérées par microbouturage sont significativement ($P \leq 0,05$) affectés par le génotype qu'il s'agisse d'embryons isolés des gousses précultivées (tableau 10) ou d'embryons cordiformes isolés directement de l'ovule (tableau 11). En général, les microboutures de *P. coccineus* se sont mieux développées par rapport à celles de *P. vulgaris*. Cette seconde espèce a un effet génotypique sur la régénération des pousses (tableau 11), comme cela a été rapporté pour micropropager 7 génotypes de *P. coccineus* et 10 génotypes de *P. vulgaris* (Santalla *et al.*, 1998).

Tableau 10. Taux moyens de plantules régénérées (%) à partir d'embryons globulaires précultivés en gousses en fonction du génotype.

Génotype (Espèce)	Effectif total d'embryons	Effectif total des microboutures	Taux moyen de plantules régénérées	
			% de l'effectif des microboutures	% de l'effectif d'embryons
NI 16 (<i>P. coccineus</i>)	225	165	93,0 ($\pm 3,6$) a	73,3 ($\pm 10,7$) a
NI 637 (<i>P. vulgaris</i>)	108	48	76,6 ($\pm 6,1$) b	44,4 ($\pm 4,8$) b
X 484 (<i>P. vulgaris</i>)	108	60	77,3 ($\pm 10,4$) b	55,5 ($\pm 4,8$) b

Les taux moyens suivis par des lettres identiques sont significativement équivalents au seuil de probabilité $P \leq 0,05$. Les valeurs entre parenthèses correspondent aux écarts-types des moyennes calculées après 3 répétitions avec un effectif de 16 à 55 microboutures par répétition selon le génotype.

Tableau 11. Taux moyens de plantules régénérées (%) à partir d'embryons cordiformes jeunes en fonction du génotype.

Génotype (Espèce)	Effectif total d'embryons	Effectif total des microboutures	Taux moyen de plantules régénérées	
			% de l'effectif des microboutures	% de l'effectif d'embryons
NI 16 (<i>P. coccineus</i>)	375	315	96,5 a ($\pm 1,1$)	81,0 a ($\pm 0,9$)
NI 622 (<i>P. vulgaris</i>)	450	315	91,4 a ($\pm 5,0$)	64,0 b ($\pm 3,5$)
X 484 (<i>P. vulgaris</i>)	450	315	57,1 b ($\pm 4,7$)	40,0 c ($\pm 3,3$)
NI 637 (<i>P. vulgaris</i>)	450	315	23,8 c ($\pm 4,7$)	16,7 d ($\pm 3,3$)

Les taux moyens suivis par des lettres identiques sont significativement équivalents au seuil de probabilité $P \leq 0,05$. Les valeurs entre parenthèses correspondent aux écarts types des moyennes calculées après 3 répétitions avec un effectif de 105 microboutures ou 125 à 150 embryons par répétition selon le génotype.

Les résultats relativement faibles obtenus chez les deux génotypes (X 484 et NI 637) cultivés de *P. vulgaris* par rapport à ceux obtenus chez le génotype (NI 622) sauvage et le témoin *P. coccineus* (NI 16) seraient en relation avec la formation de cals bruns au niveau de la section basale des pousses en contact avec le milieu de culture (Fig. 41).

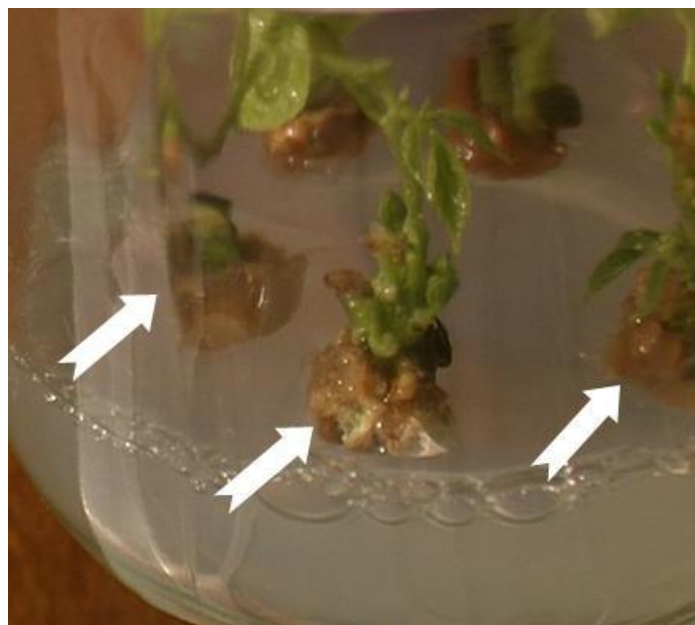


Figure 41. Explants obtenus par microbouturage de nœuds cotylédonaire après 4 semaines de culture dans le milieu MS chez un génotype (X 484) de *P. vulgaris*.

Les flèches indiquent la formation de cals bruns au niveau du pôle racinaire de chaque explant, après 4 semaines de microbouturage dans le milieu MS modifié chez *P. vulgaris* (X 484).

La formation du cal est un préalable à l'enracinement *in vitro*, comme cela a été montré par Ozyigit (2008) chez le cotonnier (*G. hirsutum*) et par Arellano *et al.* (2009) chez *P. vulgaris*. D'après Arellano *et al.* (2009), les pousses en développement à partir du cal induit ont pu former des racines après leur transfert dans un milieu d'enracinement uniquement lorsqu'elles ont été isolées avec une portion de cals à la base des pousses. Toutefois, l'ajout du PVP-360 dans les milieux de culture qui précèdent l'enracinement (c'est-à-dire les milieux de germination de la graine et d'induction des pousses) a été nécessaire à l'enracinement. Le PVP-360 a réduit le brunissement des explants, comme rapporté aussi avec le CA lors de la régénération des pousses chez 10 autres génotypes de *P. vulgaris* (Kwapata *et al.*, 2010).

L'absence d'enracinement dans notre essai, malgré les cals formés, s'expliquerait par le brunissement du cal et du milieu de culture environnant.

Ce brunissement de cals induits à la base des nœuds cotylédonaire et le brunissement du pourtour des explants s'expliqueraient par les composés phénoliques et les produits de leur dégradation, comme nous l'avons déjà rapporté lors des essais portant sur l'embryoculture (paragraphe II. 3. 5. 2.). Durant l'embryoculture, l'addition du CA dans les milieux G7g et G7c nous avait permis d'obtenir des plantules en croissance.

II. 3. 6. 3. Influence du charbon actif

Tenant compte des difficultés d'enracinement et de régénération des plantules de *P. vulgaris* qu'on pourrait attribuer au brunissement du milieu, nous avons de nouveau testé l'apport du charbon actif dans le milieu de microbouturage chez *P. vulgaris* (X 484) et chez le témoin *P. coccineus* (NI 16) (tableau 12).

Tableau 12. Taux moyens d'enracinement et de développement en plantules (%) avec et sans charbon actif chez *P. vulgaris* (X 484) et *P. coccineus* (NI 16).

Espèce	Milieu de culture	Explant (*) enraciné	Plantule régénérée
<i>P. vulgaris</i>	MS + 0,5% CA	89,2 a ($\pm 6,8$)	89,2 a ($\pm 6,8$)
(X 484)	MS	52,9 b ($\pm 8,0$)	43,4 b ($\pm 4,5$)
<i>P. coccineus</i>	MS + 0,5% CA	88,3 a ($\pm 4,8$)	82,5 a ($\pm 9,1$)
(NI 16)	MS	93,7 a ($\pm 5,3$)	85,8 a ($\pm 3,5$)

Les valeurs suivies de lettres identiques sont significativement équivalentes au seuil de probabilité $P \leq 0,05$. Les valeurs entre parenthèses correspondent aux écarts-types des moyennes calculées après 5 répétitions avec 50 microboutures par répétition. (*) : Explant enraciné avec ou sans tiges feuillées.

Après 4 semaines de microbouturage, le taux moyen d'enracinement avec CA est plus élevé (89%) que celui obtenu sans CA (53%). La majorité des microboutures cultivées en présence du CA ont développé des pousses avec de nombreuses racines adventives (Fig. 42A), tandis que sur le milieu témoin sans CA, environ la moitié des microboutures étaient en arrêt de croissance et on observait un brunissement du milieu en contact avec l'explant (Fig. 42B). Quant à NI 16, il a donné des résultats élevés et équivalents ($\pm 90\%$) en présence comme en absence du CA (tableau 12). Malheureusement, les plantules régénérées ont manifesté une décoloration des feuilles en présence du CA (Fig. 43A), ce qui n'est pas observé sans CA (Fig. 43B).

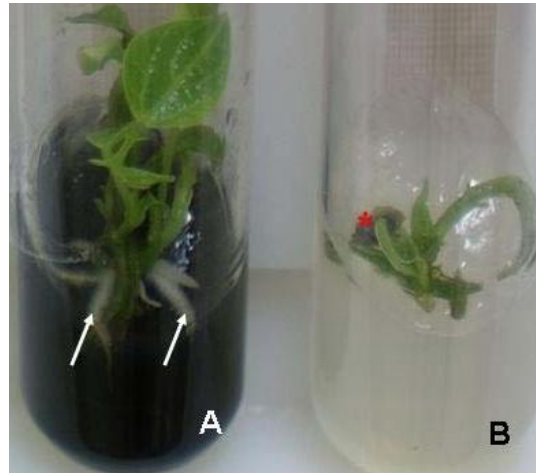


Figure 42. Plantule (A) et explant (B) développés après 4 semaines de microbouturage de nœuds cotylédonaire chez *P. vulgaris* (X 484), respectivement avec ou sans charbon actif.

A : développement de racines adventives (indiquées par les flèches blanches) dans un milieu contenant du charbon actif ; B : pas de développement en plantules de l'explant cultivé en absence du charbon actif. On observe un brunissement de la base de l'explant indiqué par un astérisque (*).

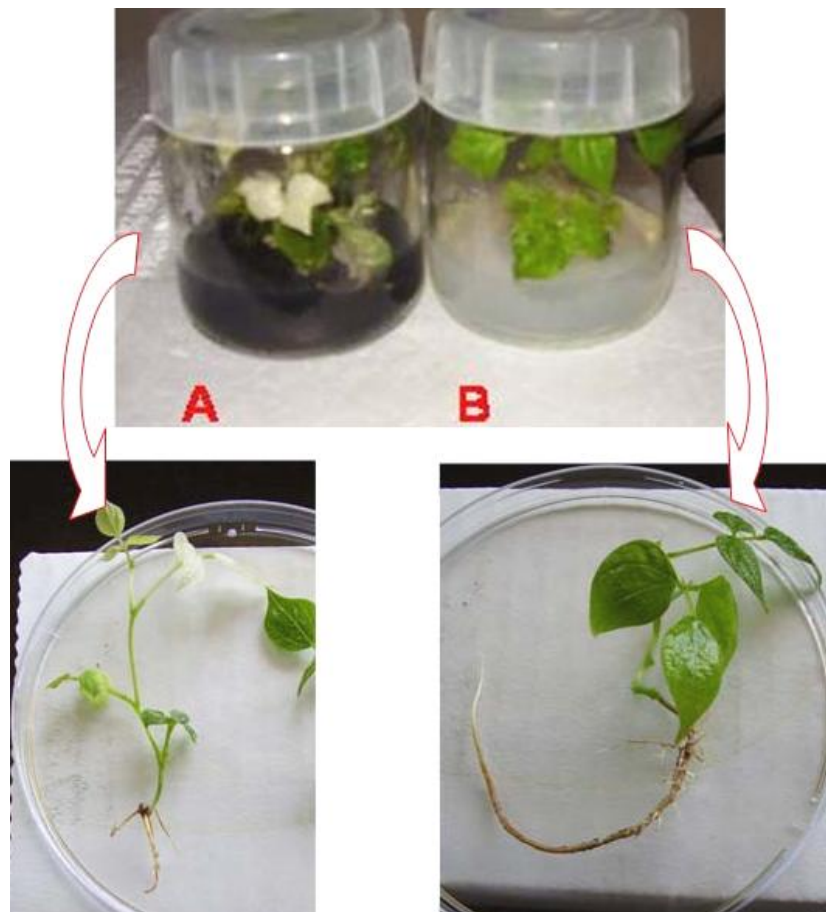


Figure 43. Plantules NI 16 de *P. coccineus* développées après 4 semaines de microbouturage.

Observation d'une plantule de *P. coccineus* avec chlorose (A) en présence du charbon actif, et d'une plantule normale (sans chlorose) (B) en absence du charbon actif.

Nos données sur les effets du charbon actif dans la régénération des plantes par microbouturage confirment les performances de ce composé dans le développement en plantules des embryons germés (paragraphe II. 3. 5. 2.). Les effets positifs du charbon actif ont été rapportés lors de la régénération des plantes chez les légumineuses alimentaires à partir du microbouturage d'explants issus des graines germées, comme le nœud cotylédonaire (NC) chez *Vicia faba* L. (Abdelwahd *et al.*, 2008) ou l'apex des tiges chez *P. vulgaris* (Kwapata *et al.*, 2010).

Les feuilles blanchâtres observées chez le génotype NI16 s'expliqueraient par l'absorption par le CA des éléments utiles à la synthèse de la chlorophylle. Le CA aurait entraîné un appauvrissement du milieu de culture en éléments minéraux comme le fer sous forme chélatée (Lucena, 2006). Tivarekar et Eapen (2001) avaient observé une inhibition totale de la croissance des pousses, chez *V. radiata* L., lorsque le milieu est additionné de 0,5% de CA. D'après ces auteurs, l'inhibition observée en présence du CA est la conséquence de l'absorption par cette substance des composés hormonaux initialement présents dans le milieu.

Du fait que l'effet absorbant du CA peut s'étendre de façon non sélective aux composants du milieu utiles au bon développement des explants, comme les sels minéraux ou des composés hormonaux, certains auteurs recommandent un équilibre entre le CA et les composants utiles du milieu de culture (Nissen et Sutter, 1990 ; Thomas, 2008 ; George *et al.*, 2008).

II. 3. 7. Sauvetage d'embryons hybrides par microbouturage de nœuds cotylédonaire

Lors des hybridations interspécifiques entre *P. coccineus* (NI 16) (♀) et *P. vulgaris* (NI 637), notre intention était d'obtenir des plantes avec l'aide de la culture *in vitro* des embryons globulaires (via la culture préalable de gousses). Malheureusement, des contaminations souvent observées lors de la culture de gousses nous ont incitée à réaliser la culture d'embryons isolés de l'ovule au stade cordiforme jeune. Sur 225 croisements, environ un pourcentage de 73% de gousses avortent entre 2 et 7 jours après pollinisation (JAP), 18% entre 8 et 9 JAP et 9% entre 10 et 14 JAP. Ces dernières gousses ont été retenues pour des extractions. Un effectif total de 11 embryons présumés hybrides ont été mis en culture. Parmi ces embryons, 9 étaient au stade cordiforme jeune avec des cotylédons asymétriques (Fig. 44A) et 2 au stade cotylédonaire avec des cotylédons symétriques comparables aux embryons isolés des gousses de génotypes parentaux (NI 16 et NI 637) (Fig. 44B).

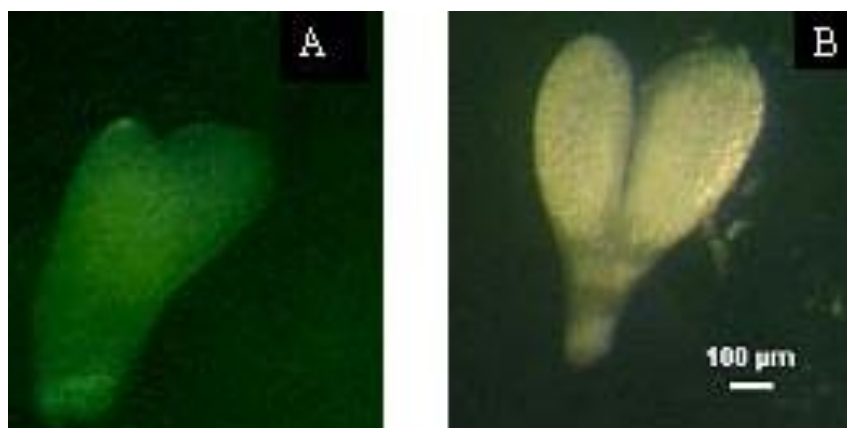


Figure 44. Embryons issus d'un hybride interspécifique (A) et de *P. coccineus* (B) isolés des gousses récoltées 10 JAP.

A : l'embryon « hybride » (NI 16 (♀) x NI 637) est encore au stade cordiforme jeune avec cotylédons asymétriques ; B : Embryon cotylédonaire de *P. coccineus* (NI 16) avec les cotylédons symétriques.

Après la culture *in vitro* des embryons isolés de l'ovule, la totalité des embryons ont atteint le stade de germination tant, chez les génotypes parentaux que chez les présumés hybrides (Fig. 45). Ces derniers ont présenté d'importantes taches brunes sur les cotylédons (Fig. 45A), accompagnées de diffusion dans le milieu de culture environnant. Ces troubles n'ont pas été observés chez les embryons de génotypes parentaux (Fig. 45B).

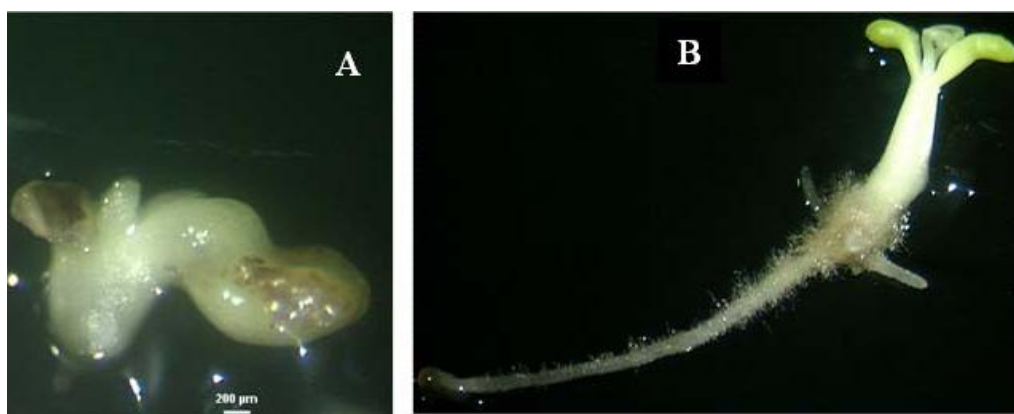


Figure 45. Embryons germés après deux semaines sur le milieu G6 : (A) hybride présumé NI 16 (♀) x NI 637 ; (B) NI 16 de *P. coccineus*.

Le microbouturage de nœuds cotylédonaires sur le milieu MS modifié et en présence du CA a conduit au développement de 11 microboutures en plantules chez les parents (*P. coccineus* et *P. vulgaris*) et de 3 microboutures sur 11 chez les présumés hybrides. De ces dernières, 2 sur 3 présentent une morphologie identique à celle des parents (Fig. 46A). La troisième microbouture a débuté sa croissance avec un retard de 4 semaines. La tige était blanchâtre et les feuilles très rudimentaires (Fig. 46B).



Figure 46. Plantules développées après 4 semaines de microbouturage chez NI 16 de *P. coccineus* (A) et après 8 semaines chez un présumé hybride (*P. coccineus* x *P. vulgaris*) (B).

La plantule de génotype parental est régénérée *in vitro* après un délai de 4 semaines par rapport à la plantule présumée hybride (N16 x NI 637) qui affiche toujours du cal brun à la base de l'explant, malgré le CA dans le milieu de microbouturage.

Le reste (8) des embryons présumés hybrides n'a pas évolué en plantules. Certains de ces embryons ont stoppé leur croissance au stade de germination et les microboutures qui en sont isolées ont fini par se nécroser (Fig. 47) ; d'autres ont donné des pousses de morphologies aberrantes sans tige ou racine et/ou avec une touffe de feuilles entre les cotylédons (Fig. 48).

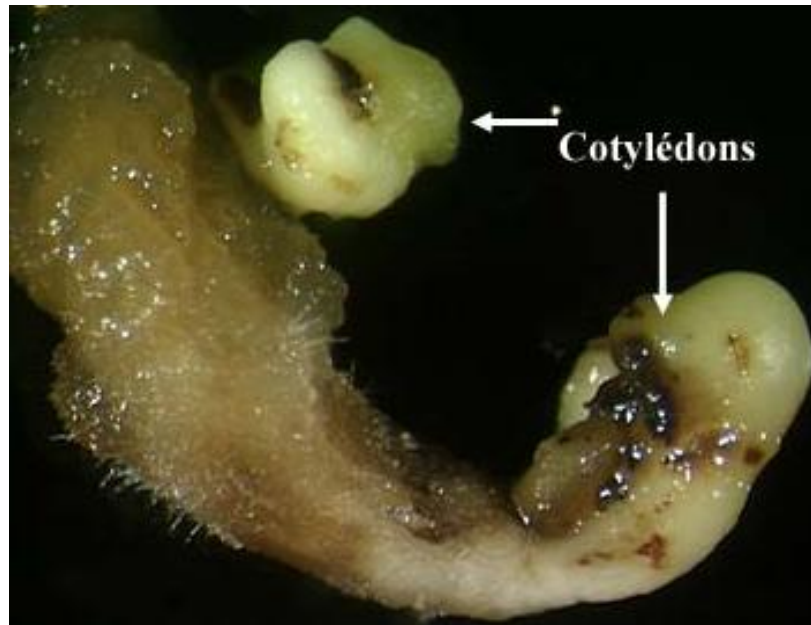


Figure 47. Observation d'une microbouture présumée hybride (*P. coccineus* x *P. vulgaris*) avec des cotylédons nécrosés après 4 semaines de microbouturage.

Le brunissement avancé chez certains explants présumés hybrides est accompagné d'une déformation des cotylédons et d'une absence de régénération de plantules.

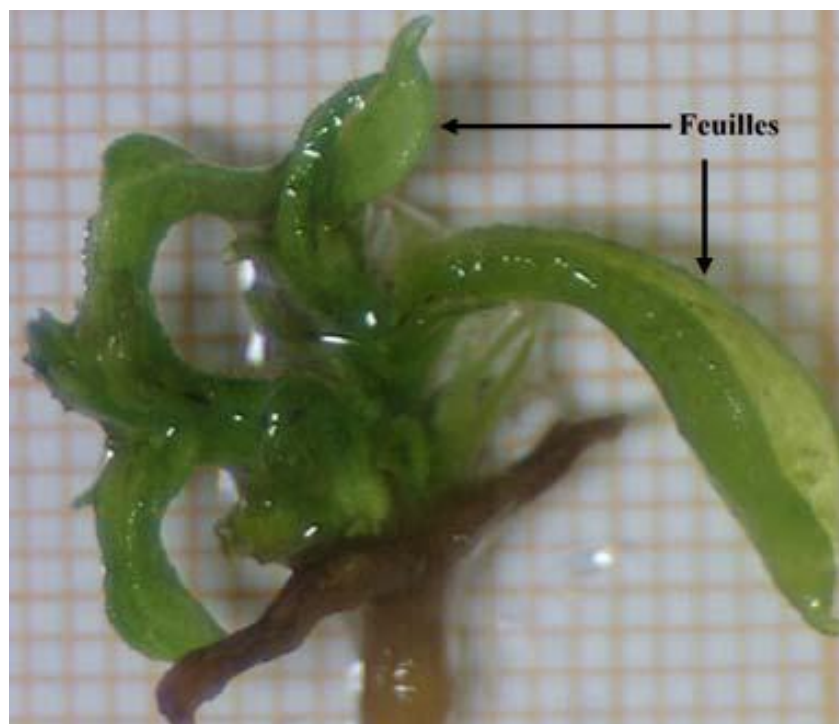


Figure 48. Pousse aberrante obtenue après 8 semaines de microbouturage de nœuds cotylédonaire chez un présumé hybride.

Le brunissement avancé chez d'autres explants présumés hybrides est accompagné d'une régénération de pousses aberrantes.

Les trois présumés hybrides régénérés par microbouturage ont été soumis à une analyse moléculaire au moyen des amorces SSR BM 141. Seul un individu (C) dans le profil de migration obtenu (Fig. 49) présente les bandes du parent mâle *P. vulgaris* (NI 637 ; canal A) et du parent femelle *P. coccineus* (NI 16 ; canal B). Les bandes identiques à celles du parent femelle chez les individus (D et F) révèlent que les embryons mis en culture sont issus d'autofécondations.

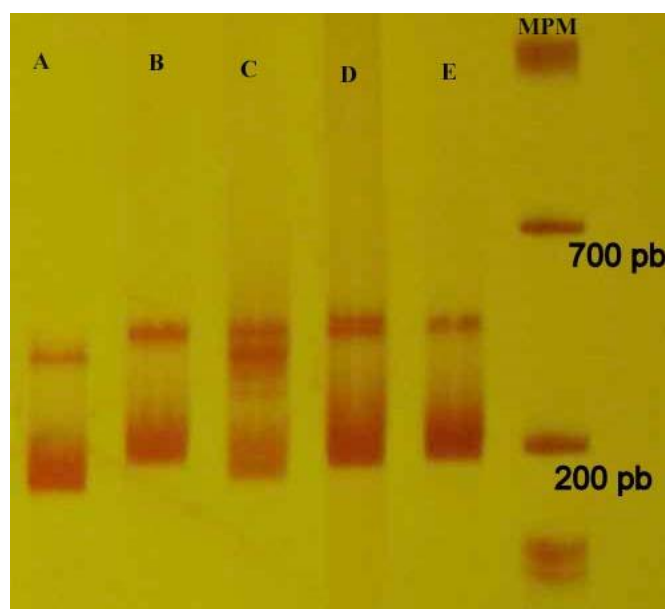


Figure 49. Profil de migration des fragments amplifiés par BM 141 sur l'ADN extrait des feuilles de plantules présumées hybrides et de génotypes parentaux.

ADN extrait du parent mâle *P. vulgaris* (NI 637) (A), du parent femelle *P. coccineus* (NI 16) (B) et des présumés hybrides *P. coccineus* (♀) x *P. vulgaris* (C, D et E). Seul l'individu C, caractérisé par la présence des bandes spécifiques des deux parents, est un hybride. MPM : marqueur de poids moléculaires.

Il résulte de nos observations que le protocole qui consiste à réaliser l'embryoculture suivie du microbouturage de nœuds cotylédonaire nous a permis de régénérer *in vitro* 1 plantule hybride (NI 16 *P. coccineus* (♀) x NI 637 *P. vulgaris*) sur 11 embryons cultivés. Le brunissement important des tissus causerait l'arrêt de croissance des pousses débourrées (Fig. 47 et 48) et leur nécrose. Ce problème avait été remarqué (paragraphe II. 3. 2), durant l'étape d'enracinement ou de développement en plantules sur le milieu G7c, lors de nos essais d'embryoculture avec les génotypes parentaux *P. coccineus* et *P. vulgaris*. Toutefois, chez nos présumés hybrides, le brunissement apparaît, dès leur introduction *in vitro*, dans le milieu de maturation et germination.

Ce problème de brunissement n'a pas été souligné chez d'autres légumineuses alimentaires appartenant aux genres *Cicer*, *Trifolium*, *Lupinus*, *Lens* ou *Cajanus* (paragraphe I. 2 .4). Chez *Lupinus* ou *Cicer*, la culture a lieu en milieu liquide (Vuillaume et Hoff, 1986b ; Mallikarjuna, 1999 ; Clarke *et al.*, 2006 ; Wilson *et al.*, 2008). Les substances phénoliques sécrétées aux sites de la blessure pourraient avoir été diluées, ce qui aurait permis de réduire ou de supprimer les effets inhibiteurs de ces substances.

Néanmoins, la culture d'embryons cordiformes jeunes isolés de l'ovule combinée au microbouturage de nœuds cotylédonaire nous a permis de régénérer une plantule hybride (NI 16 *P. coccineus* (♀) x NI 637 *P. vulgaris*) sur 11 embryons présumés hybrides mis en culture. Mais ceci n'avait pas été possible, dans les travaux antérieurs, avec l'embryoculture seule (Lecomte, 1997).

La figure 51 représente un modèle de protocole de sauvetage *in vitro* que nous proposons pour les croisements entre *P. coccineus* (♀) et *P. vulgaris*. Nous préconisons, d'une part, d'ajouter du CA au milieu de culture dès la première étape de culture, dans le milieu de maturation et germination et, d'autre part, d'initier le sauvetage par la culture préalable de gousses. Ces modifications permettraient d'améliorer le rendement de sauvetage d'embryons hybrides *P. coccineus* (♀) x *P. vulgaris* qui avortent au stade globulaire.

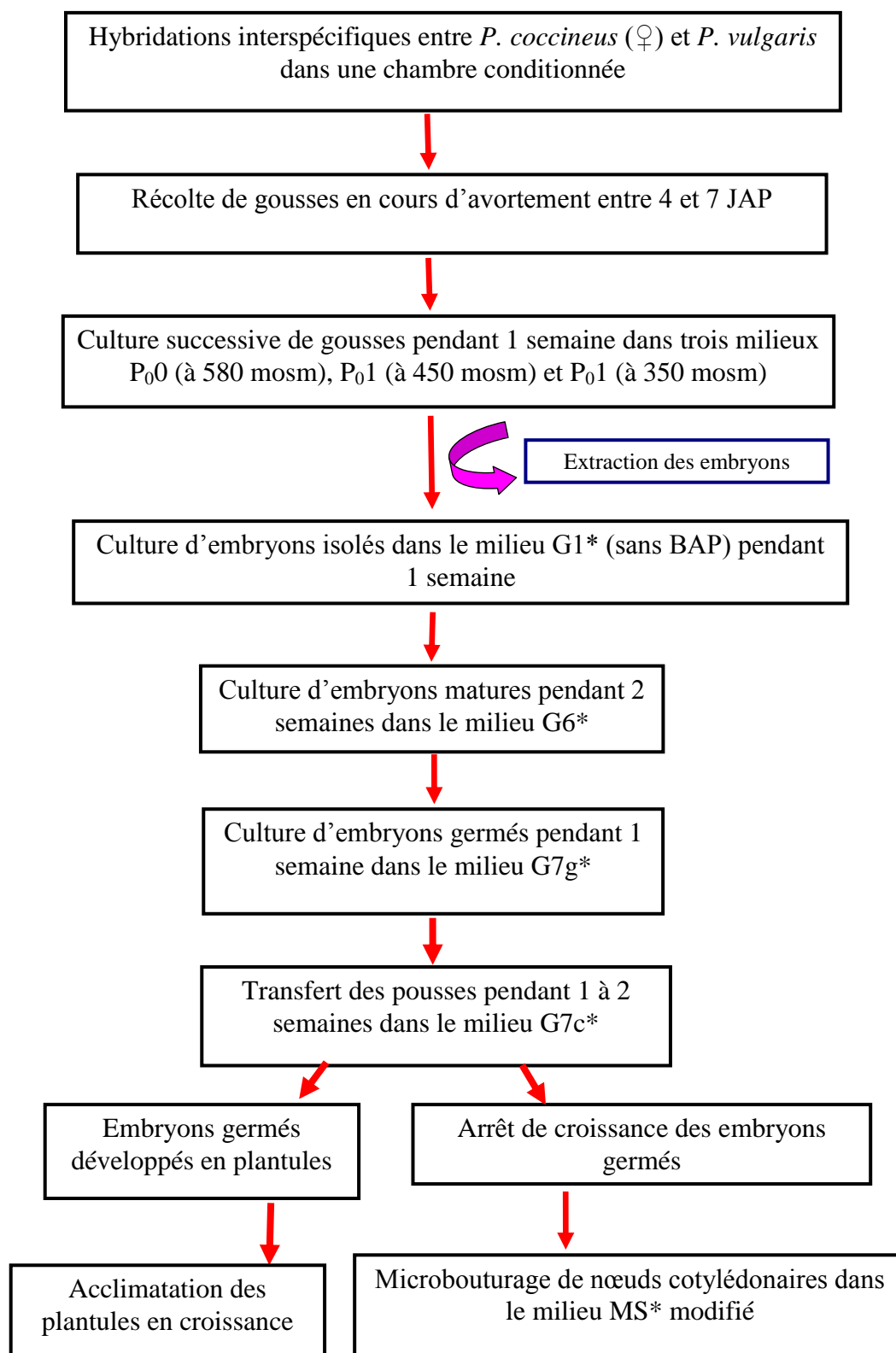


Figure 50. Schéma proposé pour le sauvetage *in vitro* d'embryons hybrides *P. coccineus* (♀) x *P. vulgaris*.

L'astérisque (*) indique que les milieux G1 ; G6, G7g et G7c contiennent du CA, afin de réduire ou supprimer le brunissement de l'explant ou du milieu de culture.

III. DISCUSSION GENERALE

Des hybridations interspécifiques entre *P. coccineus* ou *P. polyanthus* (parent femelle) et *P. vulgaris*, permettent d'introgresser des caractères agronomiques intéressants au haricot commun. Malheureusement, elles aboutissent souvent à l'avortement des embryons au stade globulaire. L'embryoculture permet d'obtenir des hybrides interspécifiques à partir des embryons aux stades cordiforme âgé ou cotylédonaire, mais pas au stade globulaire, stade de développement où l'avortement se produit dans la majorité des cas (60%) (Lecomte, 1997).

La culture préalable de gousses avait permis d'obtenir des plantes à partir des embryons globulaires chez une espèce pure *P. vulgaris* (NI 637). L'arrêt de croissance des embryons germés et l'absence de formation des racines avaient limité à 3% le rendement des plantules en développement (Geerts *et al.*, 2000 ; Geerts, 2001). L'amélioration de ce rendement a été l'objectif essentiel visé par notre travail. La stratégie mise en place passe par l'étude des conditions de régénération sur le matériel d'origine pure (*P. coccineus* et *P. vulgaris*) et la transposition de celle-ci à leurs hybrides interspécifiques.

Nous avons commencé par évaluer le protocole de culture de gousses (Geerts *et al.*, 2000 ; Geerts, 2001) chez deux nouveaux génotypes (NI 622 et X 484) de *P. vulgaris* et chez un génotype (NI 16) de *P. coccineus*. Cela nous a permis de confirmer les difficultés d'obtenir des plantes à partir des embryons globulaires du genre *Phaseolus*. Toutes les plantules obtenues *in vitro* présentaient du cal brun hyperhydrique à la base racinaire avec un arrêt de croissance de la tige feuillée, comme rapporté, dans la majorité des cas, lors des travaux antérieurs (Lecomte, 1997 ; Mergeai *et al.*, 1997 ; Geerts *et al.*, 2000 ; Geerts, 2001).

Malgré cette absence de régénération *in vitro*, nous avons pu confirmer le rôle néfaste de la BAP dans le milieu G1 de maturation et germination, comme rapporté par Lecomte (1997). Le retrait de cette hormone nous a permis d'obtenir un taux de germination deux fois plus élevé chez tous les génotypes testés, par rapport à celui obtenu antérieurement (soit 45%) (Geerts *et al.*, 2000 ; Geerts, 2001). Les effets positifs du retrait des hormones du milieu de culture d'embryons isolés de l'ovule ont aussi été révélés durant la culture d'embryons isolés de l'ovule chez d'autres légumineuses alimentaires appartenant aux genres *Lupinus* (Vuillaume et Hoff, 1986b) et *Cicer*

(Clarke *et al.*, 2006). Monnier (1976) avait déjà souligné l'avantage du retrait des régulateurs de croissance en général du milieu de culture des embryons immatures chez *C. bursa-pastoris*, pour éviter des anomalies morphologiques qui affectaient la maturation *in vitro*. Les régulateurs de croissance peuvent aussi être à l'origine de la formation de cals (Bridgen, 1994). Durant l'embryogenèse, les embryons régulent leurs besoins hormonaux dès les premières étapes de leur développement (Friml *et al.* 2003 ; Umehara *et al.*, 2007 ; Kawashima *et al.*, 2010).

Les difficultés d'obtenir des plantules chez tous les génotypes testés de *P. vulgaris* (NI 637, NI 622, X 484 et X 707) et *P. coccineus* (NI 16) nous ont incitée à rechercher d'autres voies de régénération à partir des embryons globulaires.

L'étude comparative de deux systèmes de culture de gousses, la culture de gousses suivie de la culture d'ovules ou de demi-ovules, a été réalisée chez NI 637 de *P. vulgaris* afin d'obtenir à l'extraction des embryons cotylédonaire requis pour l'embryoculture. Dans ce contexte, notre objectif a été atteint ; malheureusement, les blessures occasionnées à l'extraction des embryons cotylédonaire (50%) ont limité le rendement d'extraction à un pourcentage de 6% seulement.

Ces pertes nous ont incitée à prolonger la durée de culture jusqu'à la germination *in ovulo* ou en demi-ovules, toujours avec le génotype NI 637. Pour cela, un délai d'environ huit semaines a été nécessaire pour aboutir à la germination dans un milieu de maturation et germination contenant la solution minérale M1 à faible teneur en sels minéraux (Mergeai *et al.*, 1997). Cette dernière a été plus performante par rapport à la solution minérale M2 contenant les sels du milieu de maturation et germination de Geerts *et al.* (1999). Un milieu à teneur réduite en sels a aussi été recommandé pour la culture des embryons globulaires via la culture de gousses (Geerts, 2001). Selon cet auteur, le développement des embryons globulaires précoces a été réalisé avec succès via la culture de gousses chez NI 637 de *P. vulgaris* dans un premier milieu de Phillips *et al.* (1982) (P₀ à 580 mosm) 2 fois moins concentré en sels minéraux, par rapport à deux autres milieux (P₀1 à 450 mosm et P₀1 à 350 mosm) (tableau 3). La culture d'ovules a également révélé des différences significatives par rapport au génotype et à la nature de l'explant (ovules ou demi-ovules). Certains génotypes se sont montrés récalcitrants à la germination *in ovulo*, comme c'est le cas pour NI 637 et X 707 de *P. vulgaris* ($\pm 17\%$) alors que d'autres génotypes (NI 622 et X 484) de la même espèce ont manifesté une aptitude à la germination relativement plus élevée ($\pm 27\%$).

Malgré ces différences, nous avons obtenu un taux de germination *in ovulo* deux fois plus élevé par rapport à celui obtenu durant les études préliminaires (8%) réalisées par Dherte (1995). Cette amélioration a été possible grâce à la position à plat des ovules à la surface du milieu. Cette disposition à plat a permis de réduire le cal que forme le funicule enfoui dans le milieu (Fig. 26), comme chez *Arabidopsis* (Sauer et Friml, 2004). Les difficultés de germination *in ovulo* chez certains génotypes de *P. vulgaris* nous ont incitée à évaluer la culture en demi-ovules. Malheureusement, ce second mode de culture est moins performant que la culture d'ovules pour la germination. Cela s'explique surtout par la cicatrisation rapide de l'orifice sectionné, suivie de la nécrose des explants. Chez *Lupinus*, il est recommandé de cultiver les demi-ovules inclus dans un milieu faiblement gélosé (5 g.L⁻¹ d'Agar-Difco) mais pas en surface (Vuillaume et Hoff, 1986a). Chez *Alstroemeria*, on recommande la culture en milieu liquide sur agitateur (à 50 rpm) (Buitendijk *et al.*, 1995).

Malgré une supériorité de la germination *in ovulo* (27%) par rapport à la germination en demi-ovules (8%), nos résultats restent relativement faibles par rapport à ceux que nous avons obtenus avec des embryons isolés des gousses précultivées (78 à 88% selon le génotype). Cela nous a conduite à maintenir la culture de gousses, comme technique de base pour tenter d'améliorer le taux de développement en plantules (3%) (Geerts *et al.*, 2000, Geerts, 2001). Sur base du protocole de culture de gousses, nous avons étudié l'influence de deux facteurs, à savoir, la nature physique du milieu (G1) de maturation et germination, d'une part, le charbon actif (CA) dans les milieux (G7g) d'induction de racines et (G7c) de développement en plantules, d'autre part.

Concernant la nature physique du substrat de culture, aucune plantule n'a été obtenue lorsque la culture a été réalisée en milieu G1 de maturation et germination gélosé. En revanche, avec le milieu G1 liquide nous avons pu obtenir 60% d'embryons germés en développement qui ont tous donné des plantes adultes après un mois d'acclimatation. Notre taux de réussite est de 10% de régénération, lorsqu'on tient compte de l'effectif initial des embryons cultivés.

Le succès du milieu liquide s'explique par le fait qu'il facilite les échanges avec l'embryon (Raghavan, 1977 ; Etienne et Berthouly, 2002). La mort des embryons plus petits et l'hyperhydricité des embryons provenant du milieu liquide constituent encore un obstacle à l'efficacité du milieu liquide par immersion continue. Différents auteurs préconisent la culture en milieu liquide par oxygénation des explants. La culture en milieu liquide par immersion temporaire dans les récipients automatiques (RITA) avait été recommandée durant l'embryogénèse somatique par Etienne *et al.* (1997) et Etienne et Berthouly (2002) chez *Hevea brasiliensis* (Mull. Arg.) et par Cabasson *et al.* (1997, cités par Etienne et Berthouly, 2002) chez *Citrus deliciosa* Ten. La culture sur pont en « papier filtre » imprégné du milieu liquide a aussi été réalisée avec succès à partir d'embryons cordiformes jeunes chez *Lupinus angustifolius* L. (Wilson *et al.*, 2008).

Malgré les troubles (hyperhydricité des explants et mort des embryons cordiformes jeunes) qui ont limité à 10% notre taux de régénération, le milieu liquide nous a permis d'obtenir une amélioration du taux de plantules en croissance, trois fois plus élevé par rapport au résultat antérieur obtenu en milieu gélosé (3%) par Geerts *et al.* (2000) et Geerts (2001).

L'addition du charbon actif (CA) dans les milieux (G7g) d'induction de racines et (G7c) de développement en plantules a permis de confirmer que ce composé jouait un rôle essentiel dans l'enracinement et le développement en plantules, en réduisant la formation du cal brun et l'hyperhydricité des explants (Pan et van Staden, 1998 ; Thomas, 2008). D'après ces auteurs, le succès du CA s'expliquerait par sa capacité, d'une part, à absorber les substances inhibitrices diffusées dans le milieu, et d'autre part, à créer un environnement obscur favorable à la formation et à la croissance des racines. L'ajout du CA dans les milieux G7g et G7c nous a permis d'obtenir un taux de plantules en développement 20 fois plus élevé par rapport à celui rapporté auparavant (3%) par Geerts *et al.* (2000) et Geerts (2001). Cependant le développement de certains explants est encore limité au stade des deux feuilles primaires. L'arrêt de croissance de ces derniers nous a incitée à orienter nos travaux vers la recherche d'une voie de régénération à partir des explants autres que l'embryon. Dans ce contexte, plusieurs travaux de régénération *in vitro* par organogénèse, à partir d'explants isolés des graines matures germées, comme le nœud cotylédonaire, l'axe embryonnaire ou l'apex des tiges, avaient permis de régénérer des plantes dans le genre *Phaseolus* (paragraphe I.3).

En utilisant le nœud cotylédonaire provenant des embryons germés nous avons pu obtenir des régénérations de plantes chez *P. vulgaris* et *P. coccineus*. Cependant un effet génotype intervient : le taux de régénération *in vitro* est significativement plus élevé chez le génotype cultivé NI 16 de *P. coccineus* et chez le génotype sauvage NI 622 de *P. vulgaris* par rapport à d'autres génotypes cultivés (X 484 et NI 637) de *P. vulgaris* (tableaux 10 et 11). Santalla *et al.* (1998) ont rapporté des observations similaires lors de la micropropagation de 7 génotypes de *P. coccineus* et de 10 génotypes de *P. vulgaris*. La formation de cals bruns à la base racinaire de certains génotypes de *P. vulgaris* serait responsable de l'échec de la régénération de certains explants de *P. vulgaris* (Santalla *et al.*, 1998).

L'ajout du charbon actif dans le milieu de microbouturage de nœuds cotylédonaire isolés des embryons germés du génotype X 484 de *P. vulgaris* a permis de confirmer, une fois de plus, le rôle positif de ce composé pour réduire la présence de cals bruns et pour promouvoir l'enracinement et le développement des plantules *in vitro*. Le taux de régénération obtenu avec du charbon actif est deux fois supérieur (89%) à celui rapporté sans charbon actif (43%). Les performances du charbon actif ont également été rapportées lors du microbouturage d'explants isolés des graines germées, comme le nœud cotylédonaire chez *Vicia faba* L. ou l'apex des tiges chez *P. vulgaris* (Abdelwahd *et al.*, 2008 ; Kwapata *et al.*, 2010, respectivement). Des effets identiques au charbon actif ont été rapportés avec le PVP-360 chez 10 cultivars de *P. vulgaris* (Arellano *et al.*, 2009).

Malgré le rôle positif du charbon actif sur la régénération *in vitro* des plantules, cette substance a induit la chlorose chez un génotype (NI 16) de *P. coccineus*. Cela montre qu'en plus des substances phénoliques (toxiques aux explants), le charbon actif absorbe des substances utiles à la croissance et au développement des tissus, comme rapportées chez *V. radiata* L. (Tivarekar et Eapen, 2001).

De nombreux auteurs recommandent un équilibre entre le charbon actif et les substances utiles à la croissance de la plantule (Nissen et Sutter, 1990 ; Thomas, 2008 ; George *et al.*, 2008).

Ce processus de régénération qui combine l'embryoculture et le microbouturage de nœuds cotylédonaire nous a permis d'obtenir un taux de développement en plantules 15 fois plus élevé par rapport à celui rapporté antérieurement avec la culture de gousses seule (3%) chez NI 637 de *P. vulgaris* (Geerts *et al.*, 2000 ; Geerts, 2001).

Cela s'expliquerait par l'efficacité des bourgeons axillaires du nœud cotylédonaire dans la régénération des plantes chez *P. coccineus* et *P. vulgaris* (Vaquero *et al.*, 1993 ; Santalla, *et al.*, 1998). Chez les croisements interspécifiques réalisés au sein des genres *Cajanus* (Mallikarjuna *et al.*, 2006 ; Mallikarjuna et Moss, 1995 ; Mallikarjuna et Saxena, 2002) et *Trifolium* (Roy *et al.*, 2004 ; Řepková *et al.*, 2006), les bourgeons axillaires du nœud cotylédonaire s'étaient révélés efficaces pour la régénération adventives des hybrides à partir des embryons au stade cotylédonaire. Chez une espèce autofécondée du genre *Lens*, les plantules adventives ont été régénérées à partir des bourgeons axillaires du nœud cotylédonaire des embryons cordiformes jeunes germés *in ovulo* (Polanco et Ruiz, 2001). Dans nos travaux, nous avons pu obtenir une régénération à partir du microbouturage de nœuds cotylédonaire isolés des embryons germés provenant de la culture des embryons globulaires (via la culture de gousses).

L'application du microbouturage aux hybrides interspécifiques *P. coccineus* x *P. vulgaris* nous a permis de produire une plantule hybride sur onze embryons cordiformes jeunes présumés hybrides, ce qui n'avait pas été le cas avec la culture des embryons au stade cordiforme jeune (Lecomte, 1997). Ce résultat pourrait certainement être amélioré si l'on parvenait à réduire le brunissement qui affecte les embryons hybrides dès leur mise en culture en milieu de maturation et germination et qui se prolonge jusqu'au microbouturage.

IV. CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

IV. 1. Conclusion générale

Notre travail nous a permis d'atteindre l'objectif que nous nous étions fixée, à savoir, l'amélioration du développement d'embryons globulaires en plantules via la culture de gousses. Les différents essais mis en œuvre pour y parvenir nous ont permis de dégager plusieurs conclusions.

Le protocole de culture de gousses précédemment mis au point chez NI 637 de *P. vulgaris* a été étendu à deux nouveaux génotypes (X 484 et NI 622) de la même espèce et au génotype NI 16 de *P. coccineus*. Avec le retrait de la BAP du milieu de maturation et germination, le taux de germination est 2 fois plus élevé par rapport à celui obtenu lors des études antérieures.

L'absence de régénération des plantules confirme toutefois les difficultés de régénérer des plantules à partir de la culture d'embryons au stade globulaire.

Nous avons cherché, dans un second temps, à poursuivre le développement des embryons jusqu'au stade cotylédonaire avant de les extraire. La culture de gousses, suivie de la culture d'ovules, d'une part, ou de demi-ovules, d'autre part, a été réalisée. Bien que ce stade de développement ait été atteint via les deux cultures mixtes précitées, les blessures occasionnées à l'extraction des embryons cotylédonaires ont limité l'efficacité des deux cultures mixtes à un pourcentage de 6% d'embryons cotylédonaires. L'extraction de ces derniers n'a pas été rapportée par la culture de gousses seule. Mais, en revanche, celle-ci a permis d'extraire les embryons cordiformes jeunes et âgés sans blessure ou perte d'embryons.

Les deux cultures mixtes comprenant la culture de gousses suivie de la culture d'ovules ou de demi-ovules sont donc plus efficaces que la culture de gousses seule.

Dans le but de réduire les pertes occasionnées à l'extraction, nous avons tenté la germination des embryons *in ovulo* à partir d'ovules prélevés de gousses fraîchement récoltées à 4 JAP chez *P. vulgaris*. Il faut environ 8 semaines pour observer la germination *in ovulo* ou en demi-ovules. Les taux de germination obtenus *in ovulo* (18 et 27%, selon le génotype) ou en demi-ovules (8%) sont moins élevés par rapport à la germination des embryons cordiformes jeunes isolés des gousses précultivées (78 à 88% selon le génotype).

La germination des embryons globulaires est possible *in ovulo* ou en demi-ovules. Les taux obtenus par ces deux techniques de culture sont toutefois moins élevés que ceux des embryons isolés des gousses précultivées.

Les taux relativement faibles d'embryons germés *in ovulo* nous ont décidée à maintenir la culture de gousses, avec retrait de la BAP du milieu de maturation et germination, comme protocole de base. Le milieu liquide de maturation et germination (G1), d'une part, et le charbon actif dans les milieux (G7g) d'induction de racines et (G7c) de développement en plantules, d'autre part, ont ensuite été évalués chez le génotype NI 637 de *P. vulgaris*. Le milieu de maturation et germination liquide a permis à 60% d'embryons germés d'atteindre le stade de plantules en croissance et ces dernières ont toutes atteint le stade adulte après acclimatation. Aucune plantule n'a été obtenue avec le milieu gélosé. Ce taux de réussite en milieu liquide ne représente finalement que 10% des embryons initialement mis en culture du fait des pertes occasionnées par la mort des embryons plus petits. Malgré ces pertes, le taux de plantules en croissance que nous avons obtenu est trois fois supérieur à celui rapporté antérieurement en milieu gélosé.

La culture préalable des embryons isolés de l'ovule (provenant des gousses précultivées) en milieu de maturation liquide favorise la régénération des plantules *in vitro* qui se développent toutes en plantes après acclimatation.

L'enracinement et le développement des embryons germés en plantules sont favorisés par la présence du charbon actif (0,5%) dans les milieux G7g d'induction de racines et G7c de développement des embryons germés, avec des taux respectifs de 92% et 61% contre 37% et 0% sans charbon actif. Le charbon actif empêche ainsi la formation de cals hyperhydriques à la place des racines et favorise l'évolution des embryons germés en plantules acclimatables. Le taux de développement en plantules obtenu est 20 fois plus élevé par rapport à celui rapporté précédemment chez NI 637 de *P. vulgaris*.

Nos données confirment l'effet bénéfique du charbon actif pour le développement du système racinaire et la croissance de la tige feuillée, rapporté dans la littérature chez différentes espèces végétales.

Tenant compte des embryons germés enracinés mais en arrêt de croissance (40%) malgré la présence du charbon actif, nous avons testé le microbouturage de nœuds cotylédonaire sur la régénération *in vitro* des génotypes cultivés de *P. vulgaris* et *P. coccineus* et d'un génotype sauvage de *P. vulgaris*. Le taux de régénération obtenu chez NI 637 de *P. vulgaris* est 15 fois plus élevé que celui rapporté auparavant sans le microbouturage de nœuds cotylédonaire avec le même génotype.

La culture de gousses combinée au microbouturage de nœuds cotylédonaire permet d'améliorer le taux de plantules régénérées à partir de la culture d'embryons globulaires. Ce nouveau protocole de sauvetage est très performant car il permet d'obtenir des plantules vigoureuses *in vitro* qui, après leur acclimatation, se développent en plantes adultes avec un rendement proche de 100%, notamment chez *P. coccineus* (NI 16).

Le microbouturage de nœuds cotylédonaire a été appliqué à des embryons provenant d'hybridations interspécifiques *P. coccineus* (NI 16) (♀) x *P. vulgaris* (NI 637). Bien qu'initié, cette fois, à partir d'embryons isolés de l'ovule au stade cordiforme jeune, le microbouturage nous a permis de régénérer une plantule hybride des 11 embryons (présupposés hybrides) mis en culture sur milieu MS modifié en présence du charbon actif.

Notre protocole combinant l'embryoculture et le microbouturage de nœuds cotylédonaire a permis de régénérer, pour la première fois, une plantule hybride viable à partir de la culture d'embryons cordiformes.

En résumé, la recherche de conditions de culture appropriées à chaque étape du processus d'embryoculture et la recherche d'alternatives aux blocages de la croissance végétative nous a permis d'atteindre notre objectif qui était d'obtenir une amélioration du taux de développement en plantules d'embryons globulaires via la culture de gousses chez *Phaseolus*. Les principales conclusions qui découlent de nos expérimentations sont les suivantes. Nous confirmons l'avantage du retrait de la BAP du milieu G1 de maturation et germination sur la germination des embryons cordiformes jeunes isolés de l'ovule. Les cultures mixtes, c'est-à-dire la culture de gousses combinée à la culture d'ovules ou de demi-ovules, ont permis aux embryons globulaires d'atteindre le stade cotylédaire. Mais leur performance est limitée à cause des pertes engendrées par l'extraction des embryons cotylédonaire tardifs. La germination des embryons *in ovulo* ou en demi-ovules est possible à partir des embryons globulaires, mais ces deux techniques sont moins efficaces par rapport à la culture des embryons isolés de l'ovule au stade cordiforme jeune et provenant des gousses précultivées. La culture préalable des embryons en milieu de maturation et germination liquide nous a permis d'obtenir un taux de plantules en croissance trois fois plus élevé par rapport à celui du milieu gélosé. La présence du charbon actif dans les milieux (G7g) d'induction de racines et (G7c) de développement en plantules favorise l'enracinement et le développement des embryons germés en plantules, soit un taux 20 fois plus élevé que le taux sans charbon actif. Le microbouturage de nœuds cotylédonaire provenant des embryons

germés en arrêt de croissance nous a permis d'obtenir un taux de régénération 15 fois plus élevé que celui rapporté antérieurement sans microbouturage. Cet essai nous a permis de proposer, aujourd'hui, un protocole d'embryoculture (Fig. 42) applicable au sauvetage d'embryons hybrides (*P. coccineus* x *P. vulgaris*) qui avortent au stade globulaire. L'application de ce protocole combinant l'embryoculture et le microbouturage de nœuds cotylédonaire nous a permis d'obtenir, pour la première fois, une plantule hybride *P. coccineus* (NI 16) x *P. vulgaris* (NI 637) à partir de la culture d'embryons isolés de l'ovule au stade cordiforme jeune. Ce stade de développement embryonnaire est souvent observé chez les embryons isolés des gousses précultivées. La culture préalable de gousses combinée à la culture d'embryons isolés devrait permettre de sauver les embryons globulaires.

La figure 51 récapitule les expérimentations réalisées et les résultats obtenus dans ce travail.

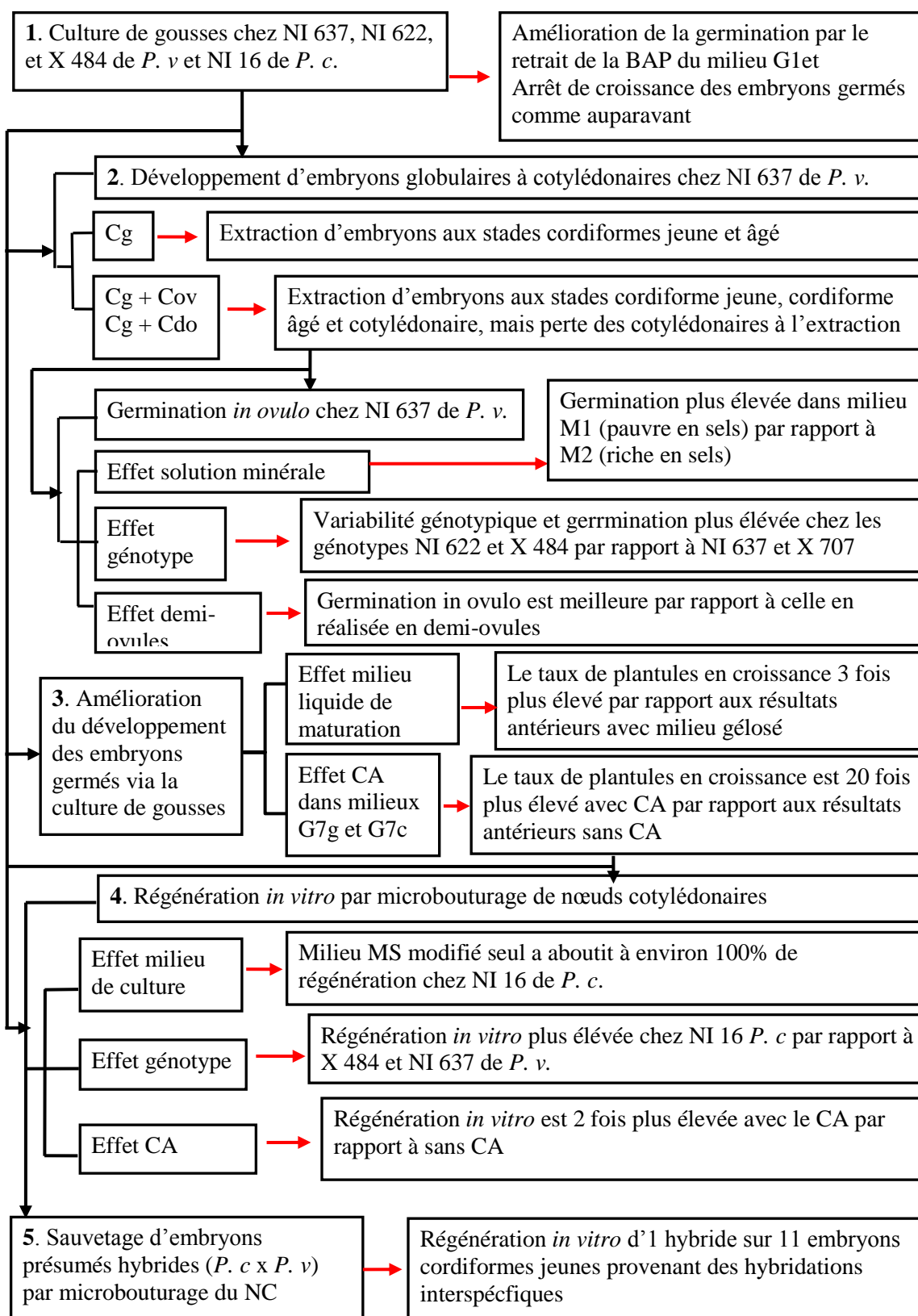


Figure 51. Schéma de synthèse des travaux réalisés.

1 à 5 correspond aux expérimentations réalisées ; NC : nœud cotylédonaire ; CA : charbon actif ; *P.v.* : *P. vulgaris* ; *P. c* : *P. coccineus* ; cg : culture de gousses, Cov : culture d'ovules, Cdo : culture de demi-ovules.

IV. 2. Perspectives

Bien que nous soyons parvenue à améliorer le taux de plantules en croissance (3%), rapporté auparavant, à partir de la culture de gousses (Geerts *et al.*, 2000 ; Geerts, 2001), certains résultats devraient cependant faire l'objet de nouvelles investigations afin de résoudre les problèmes qui persistent.

La culture d'embryons isolés des gousses précultivées en milieu G1 de maturation et germination liquide accélère le développement de ceux-ci en plantules viables. Malheureusement, la mort des embryons cordiformes jeunes et l'hyperhydricité des pousses limitent les performances de cette technique à un taux de régénération de 10%. Pour améliorer ce rendement, nous préconisons, soit de réaliser la culture *in vitro* des embryons isolés des gousses précultivées en milieu de maturation liquide par immersion temporaire dans les récipients RITA (Etienne et Berthouly, 2002 ; Berthouly et Etienne, 2005), soit d'initier la culture en milieu liquide continue à partir des embryons au stade cotylédonaire. Ces derniers pourraient être obtenus via la culture préalable de gousses, suivie de la culture d'ovules ou de demi-ovules durant une période de culture adaptée au développement des embryons cotylédonaire et à leur extraction des ovules ou demi-ovules précultivés.

L'addition du charbon actif dans les milieux G7g d'induction de racines et G7c de développement en plantules améliore considérablement l'enracinement et le développement des embryons germés. Mais sa présence dans un milieu de régénération entraîne le jaunissement des feuilles, notamment chez l'espèce *P. coccineus*. Cela suggère que le charbon actif absorbe, en plus des substances nocives, des substances utiles composant le milieu de culture. Tenant compte de sa capacité d'absorption non sélective, il serait souhaitable d'effectuer un essai, afin de déterminer la teneur du charbon actif appropriée au génotype ou à l'espèce en présence avant de les appliquer aux hybrides interspécifiques.

Tenant compte des performances de l'embryoculture combinée au microbouturage de nœuds cotylédonaire, nous l'avons appliquée pour le sauvetage des hybrides interspécifiques (*P. coccineus* (♀) x *P. vulgaris*), mais le brunissement et les malformations des explants hybrides limitent le taux de régénération *in vitro*. La prévention ou la réduction du brunissement peut être obtenue avec du charbon actif ou une autre substance absorbante comme le PVP-360. Ces deux composés devraient être utilisés dès les premières étapes de la culture d'embryons hybrides jusqu'à l'étape de microbouturage, selon l'importance du brunissement. Cette réduction du brunissement *in vitro* pourrait aussi être obtenue via la culture préalable des embryons en milieu de maturation et germination liquide continu ou par

immersion temporaire, selon le stade de développement atteint à l'extraction, avant leur culture dans les milieux gélosés G6 de déshydratation, G7g d'induction de racines et G7c de développement en plantules. Cette culture préalable en milieu liquide favoriserait également la croissance rapide des embryons hybrides qui apparaît tardivement par rapport aux embryons de génotypes parentaux.

Dans le but d'augmenter l'effectif des embryons hybrides à cultiver, nous préconisons également d'effectuer leur sauvetage dès le stade globulaire via la culture de gousses associée au microbouturage de nœuds cotylédonaire, selon le protocole proposé en figure 50.

Le comportement physiologique observé lors du sauvetage *in vitro* des embryons hybrides confirme les difficultés de développement à terme de ces embryons *in situ*. Des progrès devraient être réalisés dans la caractérisation des gènes impliqués dans l'arrêt du développement des embryons hybrides. Une telle approche permettrait de mieux identifier quelques gènes dont le dysfonctionnement pourrait être à l'origine des avortements embryonnaires.

Les essais portant sur l'évaluation du protocole de culture de gousses chez différents génotypes de *Phaseolus* nous ont permis d'obtenir de meilleurs taux de germination après retrait de la BAP du milieu de maturation et germination. L'absence de développement des embryons germés chez tous les génotypes évalués pourrait être attribuée aux difficultés d'enracinement, à cause de la dégradation de l'AIA dans le milieu d'induction de racines. Cette dégradation pourrait survenir lors du passage à l'autoclave ou à la lumière durant la culture *in vitro*. Nous préconisons de stériliser l'AIA par filtration à froid, d'une part, et de réduire le délai d'exposition de l'AIA à la lumière, d'autre part. Les difficultés induites par l'instabilité de l'AIA pourraient encore être résolues en utilisant des auxines plus stables, soit l'AIB ou l'ANA, à la place de l'AIA et à des concentrations appropriées au développement des plantules.

La culture d'ovules (renfermant les embryons globulaires) dans un milieu unique jusqu'à la germination *in ovulo* est une opération qui permet de réduire les pertes causées par l'extraction des embryons. Cette technique a cependant ses limites, puisqu'elle aboutit à un faible taux de germination après une durée d'environ 2 mois de culture. La culture successive des ovules dans les milieux à concentration en saccharose décroissante favoriserait le développement à terme des embryons globulaires qu'ils renferment, comme cela avait été réalisé chez *Arabidopsis* (Sauer et Friml, 2004).

La culture de demi-ovules entraîne, par cicatrisation, la fermeture de la cavité ovulaire et la nécrose des explants lorsqu'ils sont déposés à la surface du milieu. Cela pourrait être évité en réalisant la culture de demi-ovules enfouis dans un milieu gélosé (à faible teneur en agar-Difco) ou en milieu liquide, comme réalisé dans les genres *Lupinus* et *Alstroemeria* (Vuillaume et Hoff, 1986b ; Buitendijk *et al.*, 1995).

L'aboutissement de ces différentes alternatives contribuerait à faire avancer la recherche dans le domaine du sauvetage des embryons hybrides interspécifiques chez *Phaseolus*.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdelwahd R., Hakam N., Labhilili M., Udupa S. M. (2008). Use of an absorbent and antioxidants to reduce the effect of leached phenolics in *in vitro* plantlet regeneration of faba bean. *Afr. J. Biotechnol.* **7**(8): 997–1002.
- Abid G. (2011). Molecular characterization of embryogenesis in *Phaseolus*. Thèse de doctorat: Gembloux Agro. Bio Tech. Université de Liège (Belgium).
- Allavena A, Rossetti L. (1983). Efforts in somatic embryogenesis of *Phaseolus vulgaris* L. *Acta Hort.* **131**: 239-246.
- Allen, D. J., Ampofo, J. K. O. et Wortmann, C. S. (1996). Ravageurs, maladies et carences nutritives du haricot commun en Afrique. CIAT, Colombie, 131p.
- Alvarez H. N., Asher P. D. et Davis W. (1981). Interspecific hybridization in *Euphaseolus* through embryo rescue. *Hortscience.* **16**: 541-543.
- Arellano J., Fuentes S. I., Castillo-España P. et Hernández G. (2009). Regeneration of different cultivars of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) via indirect organogenesis. *Plant Cell, Tiss. and Organ Cult.* **96**(1): 11-18.
- Baud S., Boutin J. P., Miquel M., Lepiniec L. et Rochat C. (2002). An integrated overview of seed development in *Arabidopsis thaliana* ecotype WS. *Plant Physiol. Biochem.* **40**: 151–160.
- Baudoin J. P., Camarena M. F. et Schmit V. (1992). Contribution à une meilleure connaissance de la position phylétique de la légumineuse alimentaire *Phaseolus polyanthus* Greenm. *Bull. Recher. Agron. Gembloux.* **27**(2) : 167-198.
- Baudoin J.P. (2001). Contribution des ressources phytogénétiques à la sélection variétale de légumineuses alimentaires tropicales. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **5**(4) : 221-230.
- Baudoin J. P., Demol J., Louant B. P., Maréchal R., Mergeai G. et Otoul E. (2002). *Amélioration des plantes : application aux principales espèces cultivées en régions tropicales*. Gembloux (Belgique) : Presses Agronomiques de Gembloux.
- Baudoin J. P., Silué S., Geerts P., Mergeai G., Jacquemin J. M. et Toussaint A. (2004). Interspecific hybridization with *Phaseolus vulgaris* L.: Embryo development and its genetics. In Pandalai S.G., ed. *Recent Research Developments in Genetics and Breeding*. Trivandrum, Kerala, India: Research Signpost, p. 349-364.
- Benbouza H., Jacquemin J. M., Baudoin J. P. et Mergeai G. (2006). Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **10**(2): 77-81.
- Berger F. (2007). Endosperm development. In K.Roberts ed. *Handbook of Plant Science*. Chichester, UK: John Wiley & Sons Ltd., p. 519-523.
- Berleth T. et Chatfield S. (2002). Embryogenesis: pattern formation from single cell. *The Arabidopsis book: The American Society of Plant Biologists.*

- Bernal G. et Graham P. H. (2001). Diversity in the rhizobia associated with *Phaseolus vulgaris* L. in Ecuador, and comparisons with Mexican bean rhizobia. *Canadian J. of Microbiol.* **47**(6): 526-534.
- Berthouly M. et Etienne H. (2005). Temporary immersion system : A new concept for use liquid medium in mass propagation. In *Liquid culture systems for in vitro plant propagation*. Dordrecht, Pays Bas: Springer, p. 165-195.
- Blair M. W., Bassett M. J., Hiebert E., Polston J. E., McMillian R. T. Graves W. et Lamberts M. (1995). Occurrence of bean golden mosaic virus in Florida. *Plant Dis.* **79**: 529-533.
- Blair M. W., Caldas G. V., Avila P., Lascano C. (2006) Tannin content of commercial classes of common bean. *Annu. Rep. Bean Improv. Coop.* **49**:151–152.
- Bridgen, M. P. (1994). A review of plant embryo culture. *HortScience* **29**:1243–1246.
- Broughton W.J., Hernandez G., Blair M.W., Beebe S., Gepts P. et Vanderleyden J. (2003). Beans (*Phaseolus* spp.) - Model Food Legumes. *Plant and Soil.* **252**: 55-128.
- Buishand T. J. (1956). The Crossing of Beans (*Phaseolus* spp.). *Euphytica.* **5** (1): 41-50.
- Buitendijk J. H., Pinsonneaux N., van Donk A.C., Ramanna M.S. et van Lammeren A. A. M. (1995). Embryo rescue by half-ovule for the production of interspecific hybrid in *Alstroemeria*. *Scientia horticultrurae.* **64**: 65-75.
- Cabasson C., Alvard D., Dambier D., Ollitrault D. et Teisson C. (1997). Improvement of Citrus somatic embryo development by temporary immersion. *Plant Cell Tiss. and Org. Cult.* **50**: 33-37.
- Camarena F. et Baudoin J. P. (1987). Obtention des premiers hybrides interspécifiques entre *Phaseolus vulgaris* et *Phaseolus polyanthus* avec le cytoplasme de cette dernière forme. *Bull. Rech. Agron. Gembloux*, **22**, 1, 43–55.
- Camarena M. F. (1988). Etude de la transmission des caractères de *Phaseolus polyanthus* Greenm. dans *Phaseolus vulgaris* L. au travers de l'utilisation du cytoplasme *P. polyanthus*. Thèse de Doctorat : FUSAGx Gembloux. Belgique.
- Campbell N. et Reece J. (2007). *Biologie*. 7e éd. Paris: Pearson Education.
- Centro internacional de Agricultura tropical (1987) Principales maladies du haricot en Afrique. Cahier d'étude destiné à être utilisé comme complément de l'unité audiotutorielle traitant le même sujet. D. J. Allen. Production : Luz Maria Medina. Cali, Colombia. CIAT, 32p.

- Centro internacional de Agricultura tropical (1989) Diversité génétique dans le genre *Phaseolus*. Cahier d'étude destiné à être utilisé comme complément de l'unité audiotutorielle traitant le même sujet. D. G. Debouck. Production : Luz Maria Medina. Cali, Colombia. CIAT, 52p.
- CGIAR. Bean (*Phaseolus vulgaris*). CGIAR (Groupe Consultatif pour la Recherche Agricole Internationale). [en ligne]. 2005. Consulté 07/04 2010. Disponible sur World Wide Web: <<http://www.cgiar.org/impact/research/beans.html>>.
- Chacón M. I., Pickersgill S. B. et Debouck D. G. (2005). Domestication patterns in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and the origin of the Mesoamerican and Andean cultivated races. *Theor. Appl. Genet.* **110**: 432-444.
- Clarke H. J., Wilson J. G., Kuo I., Lülldorf M. M., Mallikarjuna N., Kuo J. et Siddique K. H. M. (2006). Embryo rescue and plant regeneration *in vitro* of selfed chickpea (*cicer arietinum* L.) and its wild annual relatives. *Plant cell, Tiss. and org. cult.* **85**(2): 197-204.
- Cohen D., Ladizinsky G., Ziv M. et J. Muehlbauer F. (1984). Rescue of interspecific lens hybrids by means of embryo culture. *Plant Cell Tiss. and Org. Cult.* **3**(4): 343-347.
- Curaba J., Moritz T., Blervaque R., Parcy F., Raz V., Herzog M. et Vachon G. (2004). AtGA3ox2, a Key Gene Responsible for Bioactive Gibberellin Biosynthesis, Is Regulated during Embryogenesis by LEAFY COTYLEDON2 and FUSCA3 in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **136**: 3660-3669.
- De Klerk G. T. (2002). Rooting of microcuttings: Theory and practice. *In Vitro Cell & Develop. Biol.-Plant.* **38**(5): 415-422.
- Debeaujon, I., Nesi, N., Perez, P., Devic, M., Grandjean, O., Caboche, M. et Lepiniec, L. (2003) Proanthocyanidin-accumulating cells in *Arabidopsis* testa: regulation of differentiation and role in seed development. *Plant Cell.* **15**: 2514–2531.
- Delgado-Sánchez P., Saucedo-Ruiz M., Guzán-Maldonado S. H., Villordo-Pineda E., González-Chavira M., Fraire-Velázquez S., Acosta-Gallegos J. A. et Mora-Avilés A. (2006) An organogenic plant regeneration system for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Sci.* **170**(4): 822–827.
- Dherte O. (1995). Contribution à la mise au point d'une technique de culture *in vitro* d'embryons globulaires de *Phaseolus*. Mémoires de fin d'études: FUSAGx (Gembloux). Belgique.
- Drijfhout E. (1978). Genetic interaction between *Phaseolus vulgaris* and bean common mosaic virus with implications for strain identification and breeding for resistance. Doctoral thesis. Wageningen, 98.
- El Yacoubi H., Chriki N., Nadif A. et Rochdi A. (2010). Le syndrome de la feuille jaune 'YLS': état phytosanitaire du *saccharum sp.* au Maroc et élimination du virus 'ScYLV' par culture *in vitro*. *Lebanese Sci. J.* **11**(1) : 31-43.

- Etienne H., Lartaud M., Michaux-Ferrière N., Carron M.P., Berthouly M. et Teisson C. (1997). Improvement of somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis* (Mull. Arg.) using the temporary immersion technique. *In vitro Cell. Dev. Biol.* **33**: 81-87.
- Etienne H. et Berthouly M. (2002). Temporary immersion system in plant micropropagation. *Plant cell Tiss. and org. Cult.* **69**(3): 215-231.
- Faostat. [en ligne]. (2005). Consulté 07/04 2010. Disponible sur World Wide Web: <<http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>, (07/04/10)>.
- Feraru E. et Friml J. (2008). PIN Polar Targeting. *Plant Physiol.* **147**: 1553-1559
- Fofana B., Vekemans X., Du Jardin P. et Baudoin J.P. (1997). Genetic diversity in Lima bean (*Phaseolus Lunatus* L.) as revealed by RAPD markers. *Euphytica*. **95**(2): 157-165.
- Franklin C.I., Trieu T.N., Gonzales R.A. et Dixon R.A. (1991) Plant regeneration from seedling explants of green bean (*Phaseolus vulgaris* L.) via organogenesis. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **24**:199–206.
- Fratini R. et Ruiz M.L. (2006). Interspecific hybridization in the genus *Lens* applying *in vitro* embryo rescue. *Euphytica*. **150**(1-2): 271-280.
- Freytag G. F. et Debouck D. G. (2002). *Taxonomy, distribution, and ecology of the genus Phaseolus (Leguminosae–Papilionoideae) in North America, Mexico and central America*. SIDA, Botanical Miscellany, Bot. Research Inst. 23. Texas.
- Friml J., Vieten A., Michael S., Weijers D., Schwarz H., Hamann T., Offringa R. et Jürgens G. (2003). Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of Arabidopsis. *Nature*. **426**: 147-153.
- FUSAGx. Laboratoire de Phytopharmacie (2004). Fiche 1 : Maladie et ravageurs du haricot. In : FUSAGX, *Fiches : Maladies et ravageurs*. Vol. 7. Rungis (France) : COLEACP, Programme Initiative Pesticides, 1-52.
- Gaitan-Solis E., Duque M.C., Edwards K.J. et Tohme J. (2002). Microsatellite Repeats in Common Bean (*Phaseolus vulgaris*): Isolation, Characterization and Cross-Species Amplification in *Phaseolus* ssp. *Crop Sci.* **42**(6): 2128-2136.
- Gamborg O.L., Miller R.A. et Ojima K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*. **50**(1): 151-158.
- Geerts P., Mergeai G. et Baudoin J. P. (1999). Rescue of early heart-shaped embryos and plant regeneration of *Phaseolus polyanthus* Greenm. and *Phaseolus vulgaris* L. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **3**(3): 141-148.
- Geerts P., Sassi K., Mergeai G. et Baudoin J. P. (2000). Development of an *in vitro* pod culture technique for young pods of *Phaseolus vulgaris* L. *In vitro Cell. Dev. Biol. - Plant.* **36**: 481-487.

- Geerts P. (2001). Study of embryo development in *Phaseolus* in order to obtain interspecific hybrids. Thèse de Doctorat : FUSAGx. Gembloux (Belgique).
- Geerts P., Toussaint A., Mergeai G. et Baudoin J. P. (2002). Study of the early abortion in reciprocal crosses between *Phaseolus vulgaris* L. and *Phaseolus polyanthus* Greenm. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **6**(2): 109-119.
- George E. F., Hall M. A. et De Klerk G. J. (2008). *Plant Propagation by Tissue Culture* Volume 1. 3ème éd. Springer.
- Gulati A., Schryer AP. et Mchghen A. 2001. Regeneration and micrografting of lentil shoots. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant.* **37**: 798–802.
- Haldas W. et Przywara L. (2002). *In vitro* culture of immature Zygotic embryos of White Clover (*Trifolium repens* L.). *Acta Biol. Cracoviensia / Bot.* **44**: 213-222.
- Harada J. J. et Kwong R. W. (2007). Plant embryogenesis (zygotic and somatic). In K. Roberts ed. *Handbook of Plant Science*. Chichester, UK: John Wiley & Sons Ltd., p. 495-502.
- Hillocks R. J., Madata C. S., Chirwa R., Minja E. M. et Msolla S. (2006). *Phaseolus* bean improvement in Tanzania, 1959-2005. *Euphytica.* **150**(1-2): 215 - 231.
- Hu C. Y. et Zanettini M. H. B. (1995). Embryo culture et embryo rescue for wide cross Hybrids. In: Gamborg O.L. et Phillips G.C., eds. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Fundamental Methods*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany, p. 129-141.
- Kasten W. et Kunert R. (1991). A culture method for isolated immature embryos of different *Lupinus* species. *Biol. Zentralblatt* **110** (4): 290- 300.
- Kawashima T. et Goldberg R. B. (2010). The suspensor: not just suspending. *Trends Plant Sci.* **15**(1): 23-30.
- Khalafalla M. M. et Hattori K. (2000). Ethylene inhibitors enhance *in vitro* root formation on faba bean shoots regenerated on medium containing thidiazuron. *Plant Growth Regulation.* **32**(1): 59-63.
- Kobayashi T., Higashi K. et Kamada H. (2001). 4-Hydroxybenzyl alcohol accumulates in suspension-cell cultures and inhibits somatic embryogenesis in carrot. *Physiol Plant.* **112**: 280–284.
- Kobayashi T., Higashi K. et Kamada H. (2003) 4-Hydroxybenzyl alcohol accumulates in flowers and developing fruits of carrot and inhibits seed formation. *J. of Plant Physiol.* **160**: 713-716.
- Kouadio D. (2007). Etude de la diversité génétique de *Vigna unguiculata* (L.) Walpers par l'analyse des barrières d'incompatibilité. . Doctorat : FUSAGx. Gembloux, Belgique.
- Kumar A. S., Gamborg O. L. et Nabors M. W. (1988). Plant regeneration from cell suspension cultures of *Vigna aconitifolia*. *Plant Cell Rep.* **7**: 138-141.

- Kwapata K. Sabzikar R. Sticklen M. B. Kelly J. D. (2010). *In vitro* regeneration and morphogenesis studies in common bean. *Plant Cell Tiss Org. Cult.* **100**: 97-105.
- Lecomte B. (1997). Etude du développement embryonnaire *in vivo* et *in vitro* dans le genre *Phaseolus* L. Thèse de Doctorat: FUSAGx Gembloux, Belgique.
- Lecomte B., Longly B., Crabbe J. et Baudoin J. P. (1998). Etude comparative du développement de l'ovule chez deux espèces de *Phaseolus* : *P. polyanthus* et *P. vulgaris*. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **2**(1): 77-84.
- Lucena J. J. (2006) Synthetic iron chelates to correct iron deficiency in plants. In: Abadía J, Barton L. L., eds. *Iron nutrition and interactions in plants*. Springer, Dordrecht, p. 103-128.
- Makunga N. P., Jäger A. K et Van Staden J. (2006). Improved *in vitro* rooting and hyperhydricity in regenerating tissues of *Thapsia garganica* L. *Plant Cell Tiss. and Org. Cult.* **86**(1): 77-86.
- Mallikarjuna N. et Moss J. P. 1995. Production of hybrids between *Cajanus platycarpus* and *Cajanus cajan*. *Euphytica* 83:43-46.
- Mallikarjuna, N., 1998. Ovule culture to rescue aborting embryos from pigeonpea (*Cajanus cajan* L. Millspaugh) wide crosses. *Indian J. Exp. Biol.*, **36**(2), 225-228.
- Mallikarjuna N., 1999. Ovule and embryo culture to obtain hybrids from interspecific incompatible pollinations in chickpea. *Euphytica*, **110**(1), 1-6.
- Mallikarjuna N. et Saxena K.B., 2002. Production of hybrids between *Cajanus acutifolius* and *C. cajan*. *Euphytica*, **124**(1), 107-110.
- Mallikarjuna N., Jadhav D. et Reddy P. (2006). Introgression of *Cajanus platycarpus* genome into cultivated pigeonpea, *C. cajan*. *Euphytica*. **149**(1-2): 161-167.
- Mallikarjuna N., Jadhav D., Nagamani V., Amudhavalli C. and Hoisington D. A. (2007) Progress in interspecific hybridization between *Cicer arietinum* and wild species *C. bijugum*. *Journal of SAT Agricultural Research* **5**(1): 1-3.
- Mallikarjuna N. et Jadhav D. R. (2008). Techniques to produce hybrid between *Cicer arietinum* L. x *C. pinnatifidum* Jaub. *Indian J. Genet.* **68**(4): 398-405.
- Maquet A., Zoro Bi I., Delvaux M., Wathelet B. et Baudoin J. P. (1997). Genetic structure of a Lima bean base collection using allozyme markers. *Theor. Appl. Genet.* **95**: 980-991.
- McKern N. M., Mink G. I., Barnett O. W., Mishra A., Whittaker L. A. Silbernagel M. J., Ward C. W. et Shukla D. D. (1992). Isolates of bean common mosaic virus comprising two distinct potyviruses. *Phytopathology*. **82**: 923-928.
- Melotto M., Balardin R.S. et Kelly J. D. (2000). Host-pathogen interaction and variability of *Colletotrichum lindemuthianum*, p. 346-361. *Colletotrichum* host

- specificity, pathology, and host-pathogen interaction. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA.
- Mergeai G., Schmit V., Lecomte B. et Baudoin J. P. (1997). Mise au point d'une technique de culture *in vitro* d'embryons immatures de *Phaseolus*. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **1**(1): 49-58.
- Miklas P. N., Kelly J. D., Beebe S. E. et Blair M. W. (2006). Common bean breeding for resistance against biotic and abiotic stresses: From classical to MAS breeding. *Euphytica*. **147**(1-2): 105-131.
- Mohamed S. V., Sung J. M., Jeng T. L. et Wang C. S. (2006). Organogenesis of *Phaseolus angularis* L. high efficiency of adventitious shoot regeneration from etiolated seedlings in the presence of N6-benzylaminopurine and thidiazuron. *Plant Cell Tiss. and Org. Cult.* **86**(2): 187-199.
- Mok D. W. S.; Mok M. C. et Rabakoarihanta A. (1978). Interspecific hybridization of *Phaseolus vulgaris* with *P. lunatus* and *P. acutifolius*. *Theor. Appl. Genet.* **52**: 209-215.
- Monnier M. (1976). Culture *in vitro* de l'embryon immature de *Capsella Bursa-pastoris* Moench. *Rev. Cyt. Biol. Végét.* **39**: 1-120.
- Murashige T. et Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant.* **15**(3): 473-497.
- Nassar M. A. N. (1978). Studies of reciprocal interspecific hybridizations between *Phaseolus coccineus* L. and *Phaseolus vulgaris* L. Thèse de Doctorat: University of Southampton. Biology Department, England, 287 p.
- Nissen S. J. et Sutter E. G. (1990). Stability of IAA and IBA in nutrient medium to several tissue culture procedures. *HortScience*. **25**(7) : 800-802.
- Nyabyenda P. (2005). *Les plantes cultivées en régions tropicales d'altitude d'Afrique : Généralités, Légumineuses alimentaires, Plantes à tubercules et racines, Céréales*. Presse agronomique Gembloux Agro bio Tech. Gembloux.
- Otoul E. et Le Marchand G. (1974). Contribution à l'étude de l'influence de l'équilibre minéral sur la composition en amino acides de *P. vulgaris* L. *Bull. Rech. Agron. Gembloux*. **9**(1) : 72-93.
- Ouedraogo M. (2003). Etude de la variabilité génétique et du flux de gènes chez des populations sauvages de *Phaseolus lunatus* L. dans la vallée centrale du Costa Rica à l'aide des marqueurs enzymatiques et microsatellites. Thèse de Doctorat : FUSAGx Gembloux, Belgique.
- PABRA. (2007). Nutrition et santé : la vision de la PABRA. Alliance panafricaine de recherche sur le haricot. **3**: 2.
- Pan M. J. et van Staden J. (1998) The use of charcoal in *in vitro* culture – A review, *Plant Growth Regulation*. **26**: 155–163.

- Phillips G. C., Collins G. B. et Taylor N. L. (1982). Interspecific hybridization of red clover (*Trifolium pratense* L.) with *T. sarosense* Hazsl. Using *in vitro* embryo rescue. *Theor. App. Genet.* **62**(1): 17-24.
- Polanco M. C. et Ruiz M. L. (2001). Factors that affect plant regeneration from *in vitro* culture of immature seeds in four lentil cultivars. *Plant Cell Tiss. and Organ Cult.* **66**(2): 133-139.
- Prendota K., 1984. Recherches sur l'utilisation de *Phaseolus acutifolius* A. Gray pour l'amélioration du haricot commun (*Phaseolus vulgaris* L.). Thèse de Doctorat : Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux (Belgique).
- Quintero-Jiménez A., Espinosa-Huerta E., Acosta-Gallegos J.A., Guzmán-Maldonado H. S. et Mora-Avilés M. A. (2010). *Plant Cell. Tiss. Org. Cult.* **102**: 381-386.
- Rabakoarihanta A., Mock M. C. et Mock D. W. S. (1979). Fertilisation and early embryo development in reciprocal interspecific crosses of *Phaseolus*. *Theoretical and Applied Genetics.* **54**: 55-59.
- Raghavan V. (1977). Applied Aspects of Embryo culture. In Reinert J. et BAJAJ Y.P.S. (eds.). *Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue, and Organ Culture*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, p. 375-397.
- Raven P. H., Evert R. F. et Eichhorn S. E. (2007). *Biologie Végétale*. 2 éd. Bruxelles: De Boeck Université.
- Roy A. K. , Malaviya D. R. , Kaushal P. , Kumar B. et Tiwar A. (2004). Interspecific hybridization of *Trifolium alexandrinum* with *T. constantinopolitanum* using embryo rescue. *Plant Cell Reports.* **22**(9): 705-710.
- Santalla M., Power J. B. et Davey M. R. (1998). Efficient *in vitro* shoot regeneration responses of *Phaseolus vulgaris* and *P. coccineus*. *Euphytica.* **102**(2): 195-202.
- Sauer M. et Friml J. (2004). *In vitro* culture of *Arabidopsis* embryos within their ovules. *The Plant Journal.* **40**(5): 835-843.
- Schmit V. et Baudoin J. P. (1987). Multiplication et évaluation de *Phaseolus coccineus* L. et *P. polyanthus* Greenm., deux espèces intéressantes pour l'amélioration de la productivité des légumineuses vivrières. *Bull Rech Agron Gembloux.* **22**(3): 235-253.
- Schryer P. A., Lu B. R., Vandenberg A. et Bett K. E. (2005). Rapid regeneration of *Phaseolus angustissimus* and *P. vulgaris* from very young zygotic embryos. *Plant Cell. Tiss. and Org. Cult.* **83**(1): 67-74.
- Shii C.T., Rabakoarihanta A., Mok M. C., Mok D.W.S. (1982). Embryo development in reciprocal crosses of *Phaseolus vulgaris* L. and *P. coccineus* L. *Theor Appl Genet.* **62**:59-64.
- Silué S. (2009). Mécanismes génétiques de l'embryogenèse chez *Phaseolus* et application en hybridation interspécifique. Doctorat : FUSAGx. Gembloux (Belgique).

- Singh S. P. (1992). Common bean improvement in the tropics. *Plant Breed. Rev.* **10**: 199-269.
- Singh S. P. (2001). Broadening the genetic base of common beans cultivars. *Crop Sci.* **41**(6): 1659-1675.
- Srivastava K., Tiwari K. N., Singh R., Singh B. D. et Jaiswal H. K. (2001). Shoot Regeneration from Immature Cotyledons of *Cicer arietinum* L. *Biol. Plantarum.* **44**(3): 333-337.
- Takada S., Hibara K., Ishiba T. et Tassaka M. (2001). The CUP-SHAPED COTYLEDON 1 gene of Arabidopsis regulates shoot apical meristem formation. *Development.* **128**: 1127-1135.
- Thomas D. T. (2008). The role of activated charcoal in plant tissue culture. *Biotechnol. advances.* **26**(6): 618-631.
- Tivarekar S. et Eapen S. (2001). High frequency plant regeneration from immature cotyledons of mungbean. *Plant Cell. Tiss. and Org. Cult.* **66**(3): 227-230
- Toussaint A., Geerts P., Clement F., Mergeai G. et Baudoin J. P. (2004). Early abortion in reciprocal crosses between *Phaseolus vulgaris* and *Phaseolus polyanthus*, and *in vitro* culture of immature embryos from these species. *Belgian J. of Botany.* **137**(1) : 47-57.
- Traoré A. Y. (1980). Deux légumineuses alimentaires *Vigna mungo* L. Hepper et *Phaseolus vulgaris* L.: influence de la nutrition minérale et principalement des apports en soufre sur le développement des plantes et les rapports en acides aminés soufrés des graines. Mémoire de DEA: FUSAGx. Gembloux (Belgique).
- Umehara M., Ikeda M. et Hiroshi K. (2007). Endogenous Factors that Regulate Plant Embryogenesis: Recent Advances. *Japanese J. of Plant Sci.* **1**(1):1-6.
- Vaquero F., Robles C., Ruiz M. L. (1993). A method for long-term micropropagation of *Phaseolus coccineus* L. *Plant Cell Reports.* **12**: 395-398
- Vuillaume E. et Hoff T. (1986a). Essais d'hybridation interspécifique entre *Lupinus albus* L. et *Lupinus mutabilis* Sweet. Influence des conditions de culture et du génotype. *Agronomie.* **6**(10): 919-924.
- Vuillaume E. et Hoff T. (1986b). Développement *in vitro* d'embryons immatures de *Lupinus albus* L. et de *Lupinus mutabilis* Sweet par culture de gousses, d'ovules ou d'embryons isolés. *Agronomie.* **6**(10): 925-930.
- Wilson, J. G., Clements J. C., Quealy J. et Yang H. (2008). Development of an interspecific hybridisation protocol for *Lupinus*. In: Palta J.A. & Berger J.B., eds. *Lupins for Health and Wealth Proceedings of the 12th International Lupin Conference, 14-18 September, 2008, Fremantle, Western Australia*: International Lupin Association, Canterbury, New Zealand.

- Wortmann C. S. *Phaseolus vulgaris* L. (common bean). PROTA (Plant Ressources of Tropical Africa / Ressources végétales de l'Afrique tropicale). [en ligne]. 2006. Consulté 18/2 2008. Disponible sur World Wide Web: <<http://database.prota.org/search.htm>>.
- Zambre M., De Clercq J., Vranova' E., Van Montagu M., Angenon G. et Dillen W. (1998) Plant regeneration from embryo-derived callus in *Phaseolus vulgaris* L. (common bean) and *P. acutifolius* A. Gray (tepary bean). *Plant Cell. Rep.* **17** (8):626–630.

ANNEXES

ANNEXE 1

Composition chimique des milieux correspondant aux phases successives de la culture d'embryons isolés chez *Phaseolus*.

Composant du milieu	Nom des milieux de culture d'embryons isolés de l'ovule				
	P1	G1	G6	G7g	G7c
Macroéléments (mg.L⁻¹)					
NH ₄ NO ₃	1000	400	-	-	-
KNO ₃	2100	2500	2500	2500	2500
CaCl ₂ .2H ₂ O	600	150	150	150	150
MgSO ₄ .7H ₂ O	435	250	250	250	250
KH ₂ PO ₄	325	-	-	-	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	134	134	134	134
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	85	150	150	150	150
Microéléments (mg.L⁻¹)					
KI	1	0,75	0,75	0,75	0,75
H ₃ BO ₃	5	3	3	3	3
MnSO ₄ .H ₂ O	15	10	10	10	10
ZnSO ₄ .7H ₂ O	5	2	2	2	2
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,40	0,25	0,25	0,25	0,25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,100	0,025	0,025	0,025	0,025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,100	0,025	0,025	0,025	0,025
Na ₂ EDTA	-	37,25	37,25	37,25	37,25
FeSO ₄ .7H ₂ O	25	27,85	27,85	27,85	27,85
Vitamines (mg.L⁻¹)					
Thiamine	1	1	1	1	1
Acide Nicotinique	5	5	5	5	5
Pyridoxine	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Myo-Inositol	100	100	100	100	100
Acides aminés					
Hydrolysate de caséine	1000	1000	-	100	100
Glutamine	1000	1000	-	100	100
Hormones (μM)					
BAP	0,1	0,1	-	0,1	0,1
ALA	-	-	-	1	-
GA	-	-	-	-	0,18
Saccharose (g.L ⁻¹)	30	30	100	30	30
Agar-Difco (g.L ⁻¹)	5	5	8	5	5
Charbon actif (%)	-	-	0,5	-	-
pH	±5,4	±5,4	±5,4	±5,4	±5,4

P1, G1, G6, G7g et G7c, correspondent respectivement aux deux milieux de maturation et germination d'embryons cordiformes jeunes isolés de l'ovule de Geerts *et al.* (1999) et de Mergeai *et al.* (1997) ; aux milieux de déshydratation d'embryons (Hu et Zanettini, 1995), d'induction de racines (Geerts, 2001) et au milieu d'enracinement ou la production des plantules (Geerts *et al.*, 1999 ; Geerts, 2001). – signifie que la substance n'a pas été additionnée.

ANNEXE 2

Composition chimique des solutions minérales des milieux utilisés pour le sauvetage des embryons hybrides chez certaines légumineuses alimentaires.

Composant de la solution minérale	Nom de la solution minérale des milieux			
	MS	B 5	ML-6	P
Macroéléments (mg.L⁻¹)				
NH ₄ NO ₃	1650	-	1000	1000
KNO ₃	1900	2500	1000	2100
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	150	330	600
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	250	179	435
KH ₂ PO ₄	170		170	325
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	134	-	-
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	-	150		85
Ca (NO ₃) ₂ .4H ₂ O	-	-	500	-
Microéléments (mg.L⁻¹)				
KI	0,83	0,75	0,83	1
H ₃ B O ₃	6,20	3	6,20	5
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,30	10	22	15
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,60	2	8,60	5
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	0,25	0,25	0,40
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	0,025	0,025	0,100
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	0,025	0,025	0,100
Fer (mg.L⁻¹)				
Na ₂ EDTA	37,25	37,25	-	37,25
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,80	27,85	-	25
NaFeEDTA	-	-	27,85	-

MS et B5, ML-6 et P correspondent respectivement aux sels minéraux (macro et microéléments) des milieux de MS Murashige et Skoog (1962), B5 de Gamborg *et al.* (1968), ML-6 de Kumar *et al.* (1998) et P de Phillips et Collins (1979). - signifie que la substance n'a pas été additionnée.