



Original Paper

<http://indexmedicus.afro.who.int>

Etude histologique des embryons avortés lors des croisements entre *Phaseolus vulgaris* L. et *Phaseolus coccineus* L.

Pamphile NGUEMA NDOUTOUMOU*, André TOUSSAINT et Jean Pierre BAUDOIN

Université des Sciences et Techniques de Masuku, Institut National Supérieur d'Agronomie et de Biotechnologies. B. P. 99 Poto-Poto Franceville (Gabon)

Université de Liège, Gembloux Agro Bio Tech, Unité de Phytotechnie Tropicale et Horticulture. Passage des Déportés, 2. B-5030, Gembloux, Belgique.

*Auteur correspondant, E-mail: pamphilen@hotmail.com, Tel : +24107770705 ☎ : +241671334,

RÉSUMÉ

L'amélioration du haricot commun (*Phaseolus vulgaris* L.) requiert l'exploitation du pool génique secondaire de cette espèce, composée essentiellement de *Phaseolus coccineus* L. et de *P. polyanthus* G. La pollinisation par *Phaseolus vulgaris* L. présente de meilleures possibilités de maintien des caractères. Cependant, le succès de ces hybridations est limité par des avortements massifs d'embryons, contrairement aux croisements réciproques. La réalisation des coupes histologiques semi-fines (3-5 µm) en résine de Méthacrylate de 2-Hydroxyéthyle (HEMA) sur des embryons âgés de 3 à 10 jours après pollinisation (JAP) a permis de suivre la dynamique de l'embryogenèse chez les génotypes parentaux et dans les combinaisons génotypiques réciproques entre *P. vulgaris* et *P. coccineus*. Des interactions ont été mises en évidence entre l'embryon hybride, le tissu maternel et l'albumen d'une part, et entre l'embryon proprement dit et le suspenseur d'autre part. Le développement de ces différentes structures n'est pas coordonné durant les phases précoces de l'embryogenèse. Ces dysfonctionnements sont souvent à l'origine des difficultés d'alimentation de l'embryon hybride et conduisent inéluctablement à l'avortement de ce type d'embryons
© 2013 International Formulae Group. All rights reserved.

Mots clés: embryon végétal, hybridation interspécifique, suspenseur, barrières d'incompatibilité.

INTRODUCTION

Le haricot commun (*Phaseolus vulgaris* L.) est une légumineuse alimentaire d'origine tropicale. Sa production est considérablement réduite par des contraintes biotiques et abiotiques. De ce fait, il est important d'envisager son amélioration.

L'hybridation interspécifique est souvent utilisée pour faciliter l'échange génétique chez de nombreux végétaux. Ainsi, le croisement entre *Phaseolus coccineus* L. et *Phaseolus vulgaris* L. est utile pour

l'amélioration génétique du haricot commun. L'utilisation du cytoplasme de *P. vulgaris* lors de ces hybridations aboutit généralement à un retour plus ou moins rapide à la forme maternelle dans les générations ultérieures (Angeles, 1986). Lorsque *P. vulgaris* est pollinisateur, les croisements se soldent par des avortements d'embryons à un stade précoce de leur développement selon Nguema et al. (2009). L'hybridation interspécifique entre *P. vulgaris* et les espèces apparentées (*P. polyanthus* G. et *P. coccineus*) révèle donc des

barrières d'incompatibilité post-zygotiques. Des interactions entre l'albumen et l'embryon, d'une part, et entre le suspenseur et l'embryon, d'autre part, conduiraient à des difficultés d'alimentation du jeune embryon (Nguema et al., 2007 & 2009).

Lecomte et al. (1998) puis Geerts et al. (2002) ont travaillé sur les croisements entre *P. polyanthus* et *P. vulgaris*. Ils ont observé comme chez d'autres plantes à fleurs que la double fécondation est l'événement qui déclenche le développement parallèle des deux structures multicellulaires intimement liées : le zygote et l'albumen. L'embryon évolue à travers des stades morphologiques bien définis jusqu'à l'arrêt du développement qui mène à la maturité de la graine. Mais cet arrêt peut être anticipé pour diverses raisons alors que l'embryon est encore immature.

Chez *Phaseolus*, les embryons hybrides se développent plus lentement lorsque *P. coccineus* est le parent maternel dans les croisements entre *P. coccineus* et *P. vulgaris*. Les avortements d'embryons hybrides *P. coccineus* x *P. vulgaris* ont lieu à tous les stades de développement. Ainsi, les signes d'avortement peuvent être observés tout au long de l'embryogenèse. Selon les formes génotypiques combinées, les symptômes diffèrent et s'expriment d'abord au niveau des structures maternelles puis se répercutent sur les embryons. Durant les premiers stades de développement de l'embryon, l'avortement est difficile à déterminer en raison de la taille trop petite de l'ovule et de l'embryon également (Yeung et Meinke, 1993).

Lecomte et al. (1998) ont décrit le développement de l'ovule dans les croisements entre *P. polyanthus* (♀) x *P. vulgaris*. Geerts et al. (2002) ont observé le développement de l'embryon hybride dans le même croisement. Ces différents auteurs sont parvenus à des conclusions selon lesquelles, le développement de l'ovule autofécondé est plus rapide que celui de l'ovule pollinisé par

un allopollen. Certains symptômes ont également été identifiés lors des avortements d'embryons hybrides. Ils concernent la prolifération de l'endothélium, la résorption du nucelle et le délai de développement de l'embryon par rapport à l'albumen.

Dans les croisements entre *P. coccineus* (♀) et *P. vulgaris*, Nguema et al. (2009) ont observé l'hypertrophie du suspenseur au détriment de l'embryon proprement dit et ils ont confirmé que l'embryon hybride réciproque se développe plus lentement que les embryons parentaux.

Des symptômes supplémentaires et fréquemment observés lors des croisements entre *P. coccineus* et *P. vulgaris* sont décrits dans le présent travail.

La connaissance de ces signes est déterminante pour la conception des méthodes adaptées pour le sauvetage des embryons hybrides au sein du genre *Phaseolus* L.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel végétal et conditions de culture

Les génotypes utilisés sont NI16 et NI1108 de *P. coccineus* et NI637 et X707 de *P. vulgaris*. Ils sont respectivement d'origine rwandaise, mexicaine, brésilienne et colombienne. Il s'agit des cultivars à l'exception de NI1108. Ils ont été identifiés par leur numéro d'introduction (NI) ou leur numéro d'attente d'introduction (X) au Jardin Botanique National de Belgique.

Les semences scarifiées, ont été mises en pré-germination dans des boîtes de Pétri, sur du papier filtre imbibé d'eau distillée. Elles ont passé deux à trois jours à l'obscurité dans une étuve ($24 \pm 1^\circ\text{C}$). L'apparition des premiers organes racinaires et/ou foliaires a marqué la levée. Les plants ont été empotés dans du terreau et placés dans une chambre conditionnée, caractérisée par (i) une température jour/nuit de 24/20°C, (ii) une humidité relative de $75\% \pm 20\%$, (iii) une

photopériode jour/nuit de 12h/12h et (iv) une irradiance de $170\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

Le substrat est composé de : 80% de terreau Klasmann 4 spécial n°26, 15% de tourbe, 5% de sable du Rhin et d'engrais organique (environ 6g/10L de mélange). Il a été régulièrement arrosé et enrichi par une solution nutritive (Otolu et Le Marchand, 1974) dès la huitième semaine après le semis.

Pollinisations

Les génotypes de *P. vulgaris* sont autogames, tandis que la pollinisation a été réalisée manuellement chez les génotypes de l'espèce allogame *P. coccineus*. Les croisements interspécifiques ont été réalisés selon la méthode de Buishand (1956).

Protocole histologique

Les coupes histologiques ont été réalisées suivant le protocole proposé par la firme TMTechnovit, inspiré de Ruzin (1999), décrit par Geerts et al. (2002) et amélioré par Toussaint et al. (2002) et Nguema et al. (2007).

Les objets ont été fixés dans une solution à base de glutaraldéhyde (1,25%) et de paraformaldéhyde (4%). Une série de trois rinçages a ensuite été effectuée dans un mélange équilibré de $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ et $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Les échantillons ont été déshydratés dans un gradient croissant de concentration d'éthanol (30%, 50%, 70%, 90%, 95% et 100%). La pré-infiltration est faite dans un mélange de résine pure (TMTechnovit 7100) et d'éthanol absolu (50/50). Elle a été suivie de l'infiltration proprement dite, puis de l'enrobage des objets pour l'obtention des blocs histologiques en résine dans du Méthacrylate de 2-Hydroxyéthyle (HEMA). Enfin, des coupes de 3 à 5 μm ont été effectuées à l'aide d'un microtome rotatif (Micron H360) équipé de

couteaux Ralf en verre. Les coupes sériées ont été réalisées dans l'axe longitudinal des ovules en vue d'observer l'embryon et le suspenseur dans toute leur longueur. Elles ont ensuite été colorées au bleu de toluidine selon la procédure de Gutmann (1995) pour l'observation générale des structures.

Les lames porte-objet ont été recouvertes de lamelles à l'aide d'une à trois gouttes de l'agent de montage DPX (BDH360294H). Les coupes ont été observées à l'aide d'un microscope Nikon (Model Eclipse E800). Les images, prises par une caméra vidéo couleur de type JVC 3-CCD (model KY-F58), ont été saisies par le logiciel Archive Plus 4.1 utilisant le contraste Gamma.

Observations

Dans ce travail, le terme "embryon" se réfère au suspenseur et à la partie organogénétique diploïde de l'embryon dénommé "embryon proprement dit" (Esau, 1965). Le suspenseur a été arbitrairement divisé en deux zones pour faciliter la description. La base du suspenseur est élargie et rattachée au tissu maternel. Sa partie supérieure, plus étroite constitue le corps du suspenseur.

Les stades successifs de développement de l'embryon ont été identifiés selon la description de Brady et Clutter, (1972) et Walbot et al. (1972). Les principaux stades sont : globulaire, cordiforme et cotylédonaire. La description des principales structures embryonnaires se rapporte notamment au stade de développement de l'embryon, la présence de cellules de l'albumen, l'intégrité de l'endothélium, l'aspect présenté par les cellules basales du suspenseur et le suspenseur lui-même.

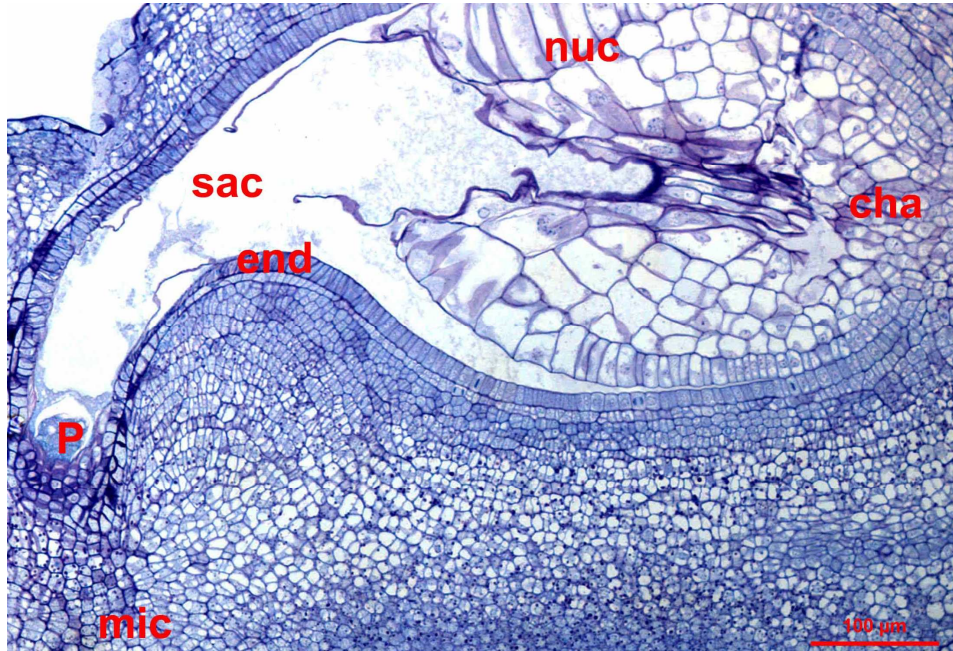


Figure 1 : Coupe longitudinale d'un ovule de *P. coccineus* (♀) x *P. vulgaris* (NI16 x NI637) âgé de 3 JAP, montrant la persistance de développement du nucelle (nuc). Il occupe une grande partie du sac embryonnaire et s'étend jusqu'à la chalaze (cha). Le proembryon (P) est logé du côté micropylaire (mic). Le nucelle n'est pas totalement détaché de l'endothélium (end).

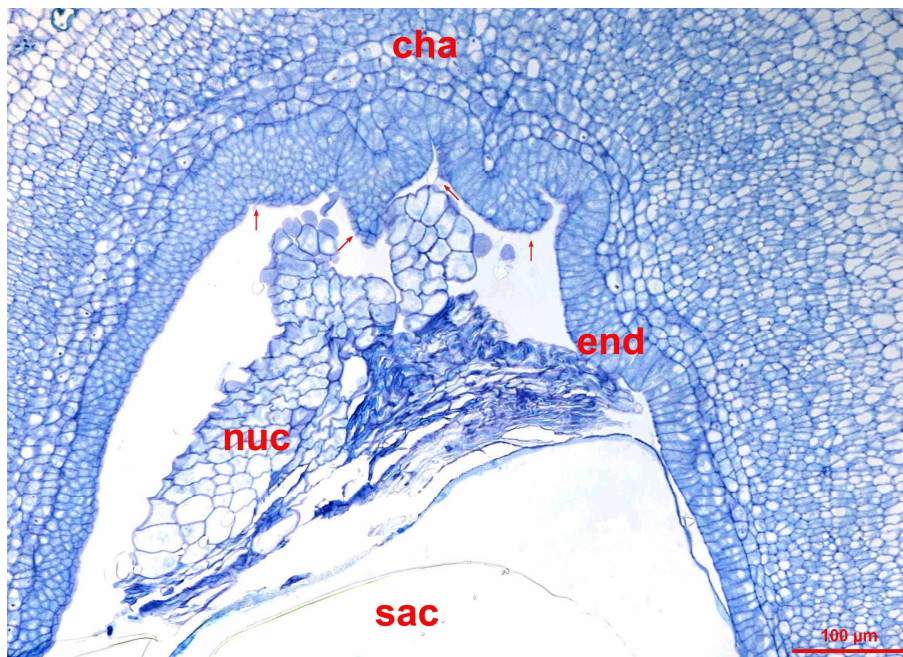


Figure 2 : Coupe longitudinale d'un ovule de *P. coccineus* (♀) x *P. vulgaris*. Ovule hybride (NI16 x NI637) montrant un endothélium (end) malformé et hypertrophié (↓) du côté chalazien (cha), à proximité du nucelle (nuc).

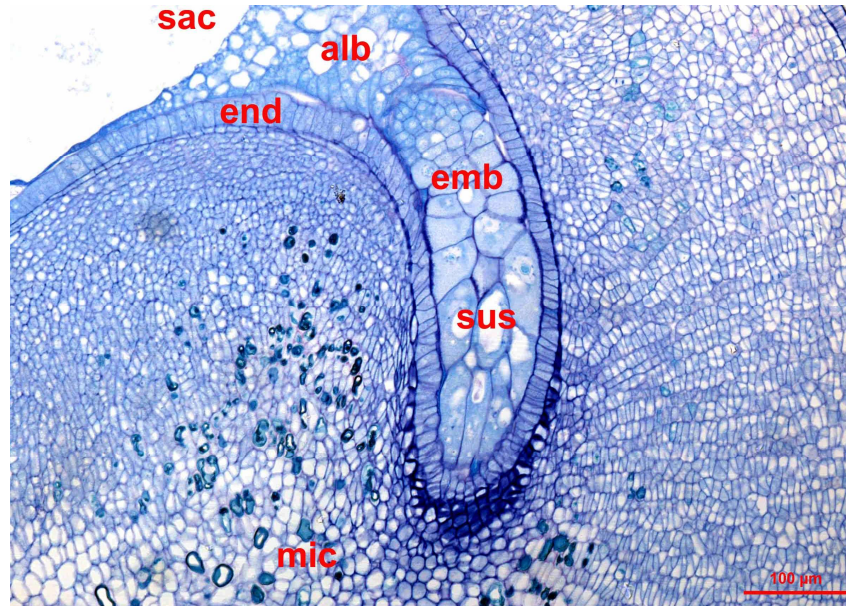


Figure 3 : Coupe longitudinale axiale d'un ovule montrant un embryon *P. coccineus* x *P. vulgaris* (NI16 (♀) x X707) âgé de 7 JAP. L'embryon a atteint le stade globulaire tardif mais il n'est pas entouré de cellules de transfert devant favoriser le passage des éléments nutritifs de la paroi endothéliale (end) vers l'embryon proprement dit (emb) ou le suspenseur (sus). Cet embryon est ainsi condamné à s'approvisionner uniquement à partir de l'albumen (alb) se trouvant à son contact dans le sac embryonnaire (sac).

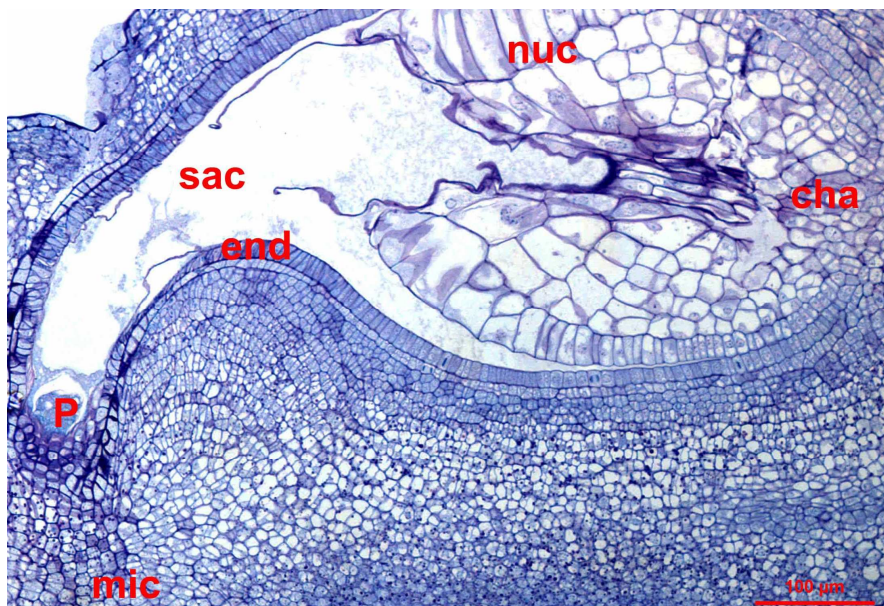


Figure 4 : Coupes longitudinales des ovules de *P. coccineus* (♀) x *P. vulgaris*. Ovule hybride NI1108 (♀) x NI637 âgé de 3 JAP, montrant un proembryon (P) du côté micropylaire alors qu'il n'existe pas de traces d'albumen dans le sac embryonnaire. Les structures maternelles tel que l'endothélium et le nucelle (nuc) du côté chalazien (cha) affichent une organisation post-zygotique normale. La double fécondation n'a pas eu lieu.

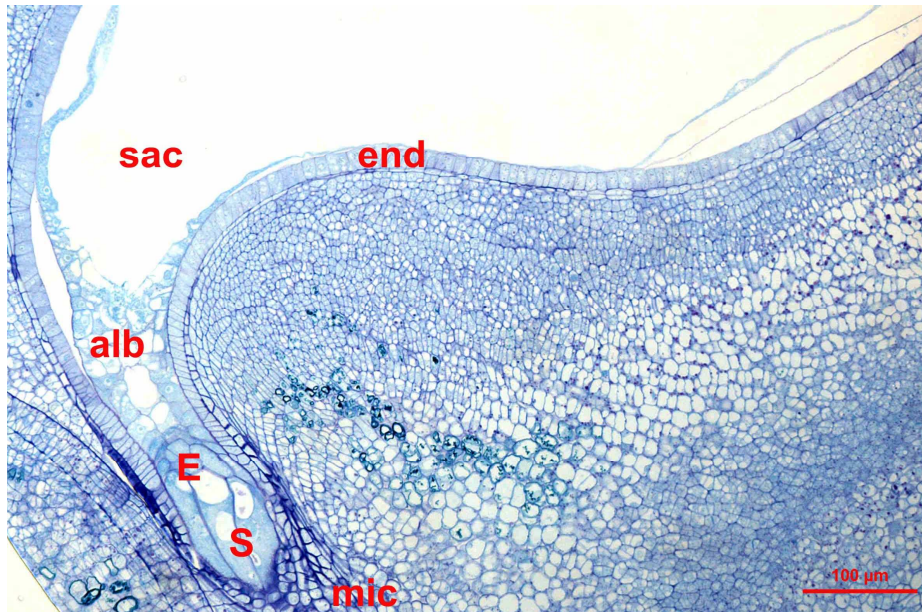


Figure 5 : Coupes longitudinales des ovules de *P. coccineus* (NI1108 ♀) x *P. vulgaris* (NI637). L'embryon est âgé de 6 JAP. L'embryon proprement dit (emb) est peu développé contrairement à l'albumen (alb) et aux cellules suspensoriales (sus).

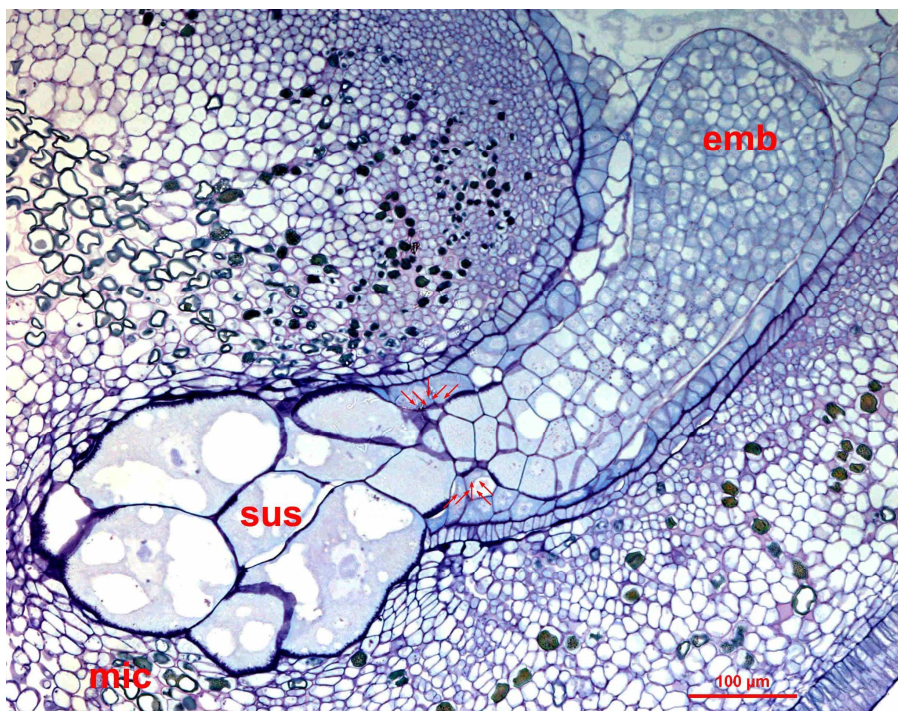


Figure 6 : Coupe longitudinale d'un ovule de *P. coccineus* (♀) x *P. vulgaris* (NI1108 x NI637), montrant un embryon âgé de 9 JAP. Le micropyle (mic) est indiqué au bas de l'image. Le point reliant (↓) le suspenseur (sus) à l'embryon proprement dit (emb) est fait de cellules de petite taille. Cette partie est étranglée par rapport au reste de la structure embryonnaire.

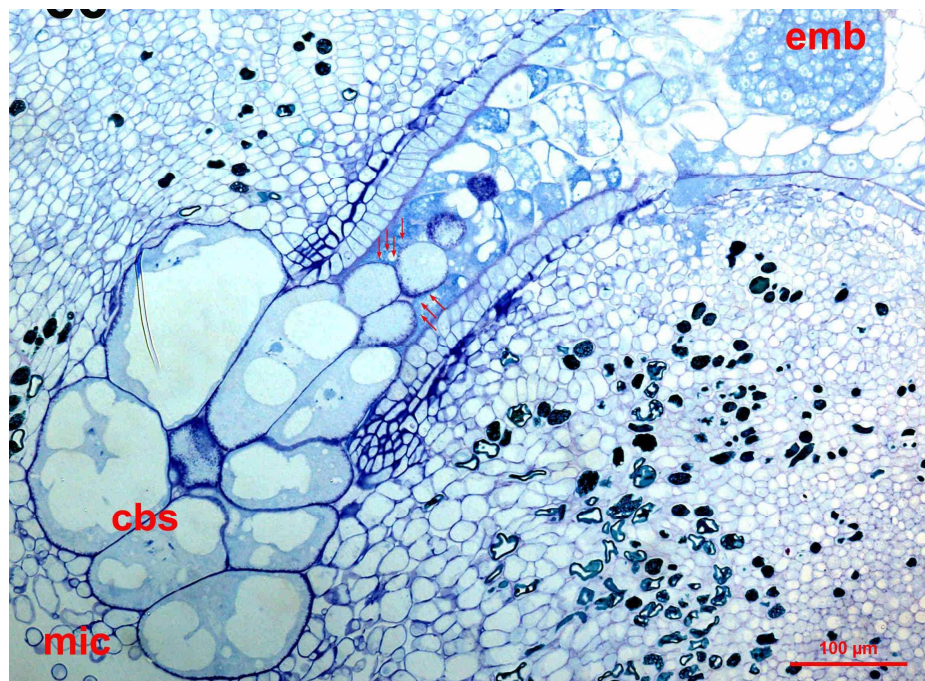


Figure 7. Coupes longitudinales des ovules de *P. coccineus* x *P. vulgaris*. Le côté micropylaire (mic) est indiqué au bas de l'image. Embryon de NI16 (♀) x X707 âgé de 9 JAP. Les cellules basales (cbs) du suspenseur sont énormes et il existe un étranglement (↓) dans sa jonction avec le reste du suspenseur.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Dégénérescence des structures maternelles

Retard de résorption du nucelle

La figure 1 montre l'état du nucelle dans un ovule, 3 jours après la pollinisation croisée entre *P. coccineus* (♀) et *P. vulgaris*.

À l'anthèse, de nombreuses cellules nucellaires sont présentes au sein de l'ovule, enveloppant le sac embryonnaire jusqu'au moment de la fécondation. Dès les premiers jours du développement embryonnaire, le nucelle recouvert par les téguments se résorbe pendant que l'albumen emplit progressivement le sac embryonnaire. Lorsque l'embryon arrive à maturité, il ne subsiste plus qu'une fine couche de cellules nucellaires, aplaties.

Lorsque l'avortement a eu lieu, les cellules nucellaires du côté chalazien restent petites et fortement vacuolisées tandis que celles qui se trouvent du côté micropylaire sont densément colorées et font apparaître des noyaux en pleine dégradation. À l'aide de la coloration au PAS (Periodic Acid

Schiff), on observe des restes de substances amidonnées, réduites et initialement synthétisées pour l'alimentation du futur embryon conformément aux observations de Chamberlin et al. (1994), Mawson et al. (1994) et Lecomte et al. (1998).

Dans d'autres cas faisant suite à l'avortement d'embryons, la coloration au bleu de toluidine révèle des zones intensément colorées à la jonction entre le nucelle et les cellules tégumentaires, traduisant la présence plus ou moins abondante de substances phénoliques dans le tissu ovulaire (Yeung et Meinke, 1993).

Au-delà du stade cordiforme jeune, le reliquat nucellaire est visible du côté chalazien, dans l'ovule avorté. Les cellules nucellaires sont ainsi dépourvues de cytoplasme.

Prolifération et épaissement de l'endothélium

La figure 2 illustre les malformations constatées sur l'endothélium des ovules

contenant des embryons hybrides *P. coccineus* (♀) x *P. vulgaris*.

Lors du développement de l'embryon hybride *P. coccineus* x *P. vulgaris*, l'évolution de l'endothélium est caractéristique quelle que soit la combinaison génotypique. De manière systématique, l'épaississement de l'endothélium est observé durant l'embryogenèse alors que sa prolifération n'intervient que lorsque l'avortement est déclenché.

Dans la partie latérale du sac embryonnaire, l'endothélium est en voie de déstructuration. Il se déforme, en se plissant Figure 2 : c'est un signe précurseur de la dégénérescence de sa structure. Par la suite, l'endothélium se décolle progressivement du tégument externe, de la chalaze vers le reste du sac embryonnaire. À certains endroits, il s'épaissit, à d'autres, il s'écrase ou se décolle complètement du tégument de l'ovule.

Absence de cellules de transfert au voisinage de l'embryon

La figure 3 montre un embryon hybride (*P. coccineus* (♀) x *P. vulgaris*) au contact des parois endothéliales.

L'albumen subit une phase de division nucléaire à la suite de la fécondation pour donner des noyaux répartis dans le sac embryonnaire. Il se retrouve proche de l'embryon et autour de la membrane interne du sac embryonnaire. Dans la suite des divisions cellulaires, on retrouve un ensemble de cellules localisées de part et d'autre de l'embryon proprement dit et du corps du suspenseur. Leur rôle est de servir de pont nutritif entre l'endothélium et l'embryon en développement. Il s'agit des cellules de transfert. Cette structure systématiquement présente lors du développement des embryons autofécondés de *P. coccineus* et *P. vulgaris* n'est pas toujours visible dans des ovules contenant des embryons hybrides *P. coccineus* (♀) x *P. vulgaris*.

Lorsque les symptômes d'avortement concernent le tissu maternel, ils s'étendent à l'embryon selon le degré atteint par le processus abortif Figures 1 et 2. Ils concernent comme l'ont remarqué Geerts et al. (2002) le

développement de l'albumen, la dégénérescence du nucelle et l'hypertrophie des éléments vasculaires de l'ovule. Des épaississements intracellulaires sont aussi observés sur l'endothélium et les assises tégumentaires, avec de nombreux grains d'amidon, comme on l'observe également chez *Arabidopsis thaliana* (Baud et al., 2002).

Nous convenons avec Lecomte et al. (1998) que l'implication des tissus maternels dans la nutrition et la croissance de l'embryon et de l'albumen est indubitable. Les structures telles que le nucelle, les assises tégumentaires et l'endothélium jouent un rôle important dans le transfert des nutriments à destination de l'embryon.

Les cellules de transfert sont absentes au voisinage de l'embryon Figure 3. Or, leur présence entre l'embryon et l'endothélium est importante pour l'approvisionnement des embryons en nutriments. Ces cellules sont indispensables pour suppléer le suspenseur hypertrophié des embryons hybrides (*P. coccineus* (♀) x *P. vulgaris*), dans le rôle de transit et de fourniture d'éléments nutritifs à l'embryon. Dès qu'elles restent involutives, l'embryon est voué à une sous-alimentation qui le conduit à l'avortement.

Symptômes d'avortements des structures hybrides: diploïde et triploïde

La double fécondation s'achève par la formation du zygote (diploïde) et de l'albumen (triploïde). Pour des raisons génétiques ou physiologiques, le développement de l'une de ces structures peut être perturbé, puis entraîner la dégénérescence de l'autre.

Retard dans la division de l'albumen

La figure 4 présente des anomalies observées au niveau de l'albumen lors des croisements entre *P. coccineus* (♀) et *P. vulgaris*.

La division initiale du noyau de l'albumen primaire mène à la formation d'un albumen coenocytique. Cependant, la division mitotique du zygote ne survient pas et résulte en un avortement de l'embryon hybride. Dans d'autres circonstances, l'albumen se caractérise par une faible cellularisation, avec

de multiples vacuoles éparpillées dans le cytoplasme. À ce moment, les noyaux sont faiblement colorés traduisant une activité ralentie de l'albumen. Enfin, l'absence de la double fécondation Figure 4 explique l'avortement de l'embryon.

Nous avons comme d'autres auteurs (Yeung et Meinke, 1993; Lester et Kang, 1998; Bommert et Werr, 2001 et Costa et al., 2004) remarqué une cellularisation précoce de l'albumen suivie d'une sollicitation importante de l'albumen par l'embryon.

Durant les stades les plus avancés de l'embryogenèse, il devient difficile d'identifier les difficultés liées au mauvais fonctionnement de l'albumen car, à l'approche de la dessiccation de la graine, les tissus vivants ne sont plus abondants dans les structures ovulaires.

La cellularisation de l'albumen a lieu au stade cordiforme de développement de l'embryon chez *Phaseolus*. Chez les génotypes observés dans ce travail, l'albumen de type nucléaire subit une plus grande cellularisation avant qu'il ne soit écrasé par l'expansion de l'embryon dans le sac embryonnaire. Ainsi, au fur et à mesure que l'embryon croît, seulement une fine couche pariétale d'albumen cellulaire reste près de la paroi endothéliale et au voisinage de l'extrémité apicale de l'embryon proprement dit.

L'albumen constitue parfois une barrière physique difficile à franchir par les nutriments lorsqu'il tapisse la paroi interne de l'endothélium. De ce fait, les embryons poursuivent leur développement mais une réduction de la disponibilité en nutriments va résulter en la sous-alimentation de l'embryon à des stades précoces de développement ou à la formation d'une quantité très faible de réserves pour l'ovule lors des étapes de développement les plus avancées. Ce manque de produits de réserve fragilise les embryons lors de leur maturation. La conséquence de ce phénomène est que les embryons échouent dans la majorité des cas. C'est certainement l'une des principales raisons des avortements

tardifs d'embryons hybrides au sein du genre *Phaseolus*.

De manière générale, lorsque l'albumen est mis en cause dans les avortements d'embryons hybrides, le développement de l'embryon est retardé. Les cellules de l'albumen central dégénèrent. Les cellules albuminées les plus proches de l'endothélium diffèrent de celles qui sont au voisinage de l'embryon proprement dit par leur taille et leur organisation spatiale. Dans certains ovules, l'albumen pariétal est plus développé et une couche de cellules de l'albumen borde la cavité du sac embryonnaire.

Retard du développement de l'embryon

La figure 5 montre l'embryon hybride accusant d'un retard de développement par rapport à l'albumen lors des hybridations entre *P. coccineus* (♀) et *P. vulgaris*.

L'embryon se développe dans l'ovule qui est protégé par des téguments. Il est établi que les embryons hybrides ne croissent pas à la même vitesse que les embryons autofécondés au sein du genre *Phaseolus* (Nguema et al., 2009). Lors de leur croissance, le volume d'albumen liquide diminue, et l'embryon continue à évoluer vers le stade cotylédonaire. Par contre chez l'embryon hybride, au même stade de développement (globulaire ou cordiforme), le volume d'albumen liquide augmente, et les cotylédons ne s'étalent pas. Ainsi, les embryons hybrides qui ont poursuivi leur développement avortent au stade cotylédonaire jeune dans les croisements entre *P. coccineus* (♀) et *P. vulgaris*. Aux stades globulaires et cordiformes, l'embryon ne croît pas suffisamment et l'albumen liquide n'est pas correctement absorbé. L'avortement de l'embryon hybride survient rapidement. Il s'agit d'un retard du développement de l'embryon au détriment de l'albumen.

Ce décalage peut aussi s'expliquer par la composition physico-chimique de l'albumen. Lopes et Larkins (1993) puis Costa et al. (2004) pensent que la composition de l'albumen hybride limite l'expansion de l'embryon en réduisant la quantité d'eau et l'espace vital nécessaires à l'embryon hybride

dont le développement s'arrête généralement au stade globulaire.

Le développement histologique des embryons prédestinés à l'avortement ou avortés est identique chez les hybrides *P. coccineus* (♀) x *P. vulgaris*. Dans le cas où la fécondation a eu lieu, la cellule œuf se gonfle et l'on voit un ou deux noyaux au sein du sac embryonnaire initiant le développement de l'embryon. Par la suite, les divisions du proembryon se réduisent puis l'albumen nucléaire dégénère, ou bien les divisions de cet albumen s'arrêtent, entraînant ainsi le dépérissement du proembryon Figures 4 et 5. La croissance du proembryon et du suspenseur s'arrête, et la dégénérescence de ces structures est entamée. De nombreux embryons cessent de se développer à ce stade. La formation de l'albumen cellulaire le long des parois endothéliales vers le centre du sac embryonnaire peut avoir lieu et favoriser le maintien en vie puis la croissance de l'embryon hybride. Ce dernier aura alors un nombre important de cellules. Pour des raisons génétiques ou physiologiques ayant des implications histologiques, un nombre limité d'embryons dépasse cette étape alors que d'autres dégénèrent en même temps que l'albumen cellulaire.

Il est possible d'identifier les embryons malformés et retardés à partir du 3^{ème} JAP Figure 5. L'ovule dépérit complètement au bout de quelques jours dès l'apparition des premiers signes d'avortement. Le retard du développement de l'albumen par rapport à l'embryon hybride s'observe dès les premiers stades de développement des embryons, soit vers 3 à 6 JAP. Lorsque ce développement démarre par un défaut de cellularisation de l'albumen, on conclut à un manque d'alimentation de l'embryon hybride à travers l'albumen (Lester et Kang, 1998; Olsen et al., 1999; Bommert et Werr, 2001; Berger, 2003). Assez souvent, c'est la cause fondamentale d'avortement des embryons hybrides *P. coccineus* (♀) x *P. vulgaris* (Yeung et Meinke, 1993)

Étranglement de la jonction entre le suspenseur et l'embryon proprement dit

La figure 6 montre un embryon présentant un étranglement au niveau de la jonction entre le suspenseur et l'embryon proprement dit.

Les embryons hybrides *P. coccineus* (♀) x *P. vulgaris* subissent une influence maternelle caractérisée par la forme et la taille du suspenseur. Ce rétrécissement de la jonction entre les deux principales parties de l'embryon hybride de *Phaseolus* est absent chez les génotypes parentaux (Nguema et al., 2007) et il est moins marqué chez l'hybride réciproque *P. vulgaris* (♀) x *P. coccineus*. Cela suggère une difficulté de transit des nutriments entre le suspenseur et l'embryon proprement dit.

De manière générale, chez les embryons hybrides en cours d'avortement, l'ovule contient un petit embryon globulaire entouré d'albumen nucléaire pendant les 3 à 4 premiers jours suivant la pollinisation. Au-delà de ce délai, l'albumen reste nucléaire et la cellularisation ne débute que tardivement. Cet embryon involutif a un suspenseur hypertrophié Figure 6 dont le corps baigne dans l'albumen cellulaire. Par la suite, la croissance de l'embryon peut s'accélérer et l'albumen pariétal se solidifie graduellement en même temps que l'embryon change progressivement de forme. Certaines ébauches de méristèmes racinaires et caulinaires, ainsi que les cotylédons peuvent d'ailleurs apparaître.

Hypertrophie du suspenseur

La figure 7 illustre une coupe histologique d'un embryon présentant des cellules basales de suspenseur hypertrophiées chez les embryons hybrides *P. coccineus* (♀) x *P. vulgaris*.

Les suspenseurs des embryons hybrides *P. coccineus* (♀) x *P. vulgaris* en voie d'avortement se caractérisent par leur déformation plus importante par rapport aux embryons parentaux et hybrides réciproques. Cette situation est visible dès 4 JAP, selon la combinaison génotypique.

Le développement du suspenseur est difficile à contrôler en raison de sa variabilité de taille et de forme, selon les génotypes et espèces (Nguema et al., 2007 & 2009). Le

nombre total de cellules qui le composent varie entre génotypes et combinaisons génotypiques. Cependant, les cellules basales semblent invariables dans leur forme et dimension pour les embryons hybrides *P. coccineus* (♀) x *P. vulgaris*, contrairement aux cellules de la partie supérieure du suspenseur. Chez ces embryons hybrides, les cellules basales du suspenseur demeurent volumineuses et restent en contact avec le tissu ovulaire dès le stade cordiforme. Elles y assurent la synthèse et l'approvisionnement de l'embryon en éléments nutritifs. Il est cependant nécessaire d'identifier et d'apprécier la nature des nutriments qui transitent par ce canal en dehors des hormones de croissance car les molécules de masse légère (les glucides) n'ont pas la même facilité de transfert que les molécules lipidiques ou protidiques (Hsu, 1979; Yeung et Clutter, 1979; Picciarelli et Alpi, 1986; Piaggese et al., 1989; Perata et al., 1990).

Selon Yeung et Meinke (1993), une bonne corrélation existe entre la demande nutritive et la morphologie du suspenseur. Les grands suspenseurs traduisent des exigences élevées en nutriments. Les cellules basales du suspenseur en contact direct avec les tissus maternels sont plus imposantes chez *P. coccineus* que chez *P. vulgaris*. On retrouve cette caractéristique chez les embryons hybrides *P. coccineus* (♀) x *P. vulgaris*. Ainsi une discordance dans le rythme d'absorption des éléments nutritifs par les embryons parentaux, peut induire des troubles de la coordination des processus de sécrétion et de dégradation, pour la nutrition de l'embryon hybride.

Conclusion

Les embryons avortent régulièrement avant la maturité et les signes d'avortement sont caractéristiques lors des croisements entre *P. coccineus* (♀) et *P. vulgaris*, quelque soit la combinaison génotypique considérée. Les interactions se manifestent entre l'embryon, le tissu ovulaire et l'albumen d'une part, puis entre l'embryon proprement dit et le suspenseur d'autre part. Elles

entraînent des difficultés d'alimentation de l'embryon hybride et sont les principaux responsables des avortements. Il est ainsi possible d'identifier les embryons malformés ou retardés dès le 3^{ème} jour après pollinisation malgré la différence de délai d'avortement des embryons d'une combinaison génotypique à une autre. Enfin, la présence d'un étranglement entre le suspenseur et l'embryon proprement dit limite les chances d'extraction de l'embryon hybride avec son suspenseur. De ce fait, il est important de tenir compte de ces délais et symptômes d'avortement avant d'envisager le recours à la culture *in vitro* pour le sauvetage des embryons hybrides *P. coccineus* (♀) x *P. vulgaris*.

RÉFÉRENCES

- Angeles B. 1986. Etude de l'utilisation du cytoplasme d'une forme sauvage de *P. coccineus* L. en vue de l'hybridation interspécifique des cultivars de cette espèce avec *P. vulgaris*. Faculté universitaire des Sciences agronomiques de Gembloux (Belgique), Thèse de Doctorat, p.185.
- Baud S, Boutin JP, Miquel M, Lepiniec L, Rochat C. 2002. An integrated overview of seed development in *Arabidopsis thaliana* ecotype WS. *Plant Physiol. Biochem.*, **40**: 151-160.
- Berger F. 2003. Endosperm: the cross road of development. *Plant Biology*, **6**: 42-50.
- Bommert P, Werr W. 2001. Gene expression patterns in the maize caryopsis: clues to decisions in embryo and endosperm development. *Gene*, **271**: 131-142.
- Brady T, Clutter ME. 1972. Cytolocalization of ribosomal cistrons in plant polytene chromosomes. *Journ. Cell. Biol.*, **53**: 827-832.
- Buishand 1956. The crossing of beans (*Phaseolus* sp.). *Euphytica*, **5**: 41-50.
- Chamberlin MA, Horner HT, Palmer RG. 1994. Early endosperm, embryo and ovule development in *Glycine max* (L.) Merr. *Int. Journ. of Plant Sci.*, **155**(4): 421-436.

- Costa LM, Gutiérrez-Marcos JF, Dickinson HG. 2004. More than a yolk: the short life and complex times of the plant endosperm. *Plant Science*, **9**(10): 507-514.
- Esau K. 1965. *Plant Anatomy* (2nd Edition). J. Wiley & Sons: New York.
- Geerts P, Toussaint A, Mergeai G, Baudoin JP. 2002. Study of the early abortion in reciprocal crosses between *Phaseolus vulgaris* L. and *Phaseolus polyanthus* Greenm. *BASE*, **6**(2): 109-119.
- Gutmann M. 1995. Improved staining procedures for photographic documentation of phenolic deposits in semithin sections of plant tissue. *Journal of Microscopy*, **179**: 277-281.
- Hsu FC. 1979. Abscisic acid accumulation in developing seeds of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiol.*, **63**: 552-556.
- Lecomte B, Longly B, Crabbe J, Baudoin JP. 1998. Etude comparative du développement de l'ovule chez deux espèces de *Phaseolus* : *P. polyanthus* et *P. vulgaris*. *BASE*, **2**(1): 77-84.
- Lester RN, Kang JH. 1998. Embryo and endosperm function and failure in *Solanum* species and hybrids. *Annals of Botany*, **82**: 445-453.
- Lopes A, Larkins BA. 1993. Endosperm origin, development, and function. *The Plant Cell*, **5**: 1383-1399.
- Mawson BT, Steghaus AK, Yeung EC. 1994. Structural development and respiratory activity of the funiculus during bean seed (*Phaseolus vulgaris* L.) maturation. *Annals of botany*, **74**: 587-594.
- Nguema NP, Toussaint A, Baudoin JP. 2007. Embryogenèse précoce comparative lors des croisements entre *Phaseolus coccineus* L. et *Phaseolus vulgaris* L. *BASE*, **11**(2): 97-107.
- Nguema NP, Toussaint A, Baudoin JP. 2009. Development of HY1 hybrid embryos between a cultivar of *Phaseolus vulgaris* L and a wild genotype of *P. coccineus* L. *Int. Journ. Biol. Chem. Sci.*, **3**(1): 20-26.
- Olsen OA, Linnestad C, Nichols SE. 1999. Developmental biology of the cereal endosperm. *Elsevier Science*, **4**(7): 1360-1385.
- Otoul E, Le Marchand G. 1974. Contribution à l'étude de l'influence de l'équilibre minéral sur la composition en aminoacides de *P. vulgaris* L. *Bull. Rech. Agron. Gembloux*, **9**(1) : 72-93.
- Perata P, Picciarelli P, Alpi A. 1990. Pattern of variations in abscisic acid content in suspensors, embryos, and integuments of developing *Phaseolus coccineus* seeds. *Plant Physiol.*, **94**: 1776-1780.
- Piaggese A, Picciarelli P, Lorenzi R, Alpi A. 1989. Gibberellins in embryo-suspensor of *Phaseolus coccineus* seeds at the heart stage of embryo development. *Plant Physiol.*, **91**: 362-366.
- Picciarelli P, Alpi A. 1986. Gibberellins in suspensors of *Phaseolus coccineus* L. Seeds. *Plant Physiol.*, **82**: 298-300.
- Ruzin SE. 1999. *Plant microtechnique and microscopy*. Oxford University Press. USA, Cover design, p. 322.
- Toussaint A, Geerts P, Clément F, Mergeai G, Baudoin JP. 2002. Régénération de *Phaseolus vulgaris* L. et *P. polyanthus* Greenm. à partir d'embryons immatures en vue de leur hybridation interspécifique. VIII^{èmes} Journées Scientifiques - AUF. Marrakech (Maroc).
- Walbot V, Brady T, Clutter M, Sussex I. 1972. Macromolecular synthesis during plant embryogeny: rates of RNA synthesis in *Phaseolus coccineus* embryos and suspensors. *Develop. Biol.*, **29**: 104-111.
- Yeung EC, Clutter ME. 1979. Embryogeny of *Phaseolus coccineus*: the ultrastructure and development of the suspensor. *Can. J. Bot.*, **57** : 120-136.
- Yeung EC, Meinke DW. 1993. Embryogenesis in Angiosperms: Development of the suspensor. *The Plant Cell*, **5** : 1371-1381.