

Actes des Xèmes Journées Scientifiques du Réseau « Biotechnologies Végétales : Quelles biotechnologies pour une agriculture durable? », 8-11 Mai 2006, Constantine, Algérie, 29-30

Analyse de mutants EMS de *Phaseolus vulgaris* L. en vue d'identifier des plantes affectées dans les gènes de l'embryogenèse

S. Silué¹, P. Lariguet², C. Pankhurst², J.M. Jacquemin³, W. J. Broughton² & J. P. Baudoin¹

¹Faculté des Sciences Agronomiques de Gembloux, Unité de Phytotechnie Tropicale et d'Horticulture. 2 passage des Déportés, BE-5030 Gembloux, BELGIQUE.

²LBMPS, Université de Genève. 30 quai Ernest-Ansermet, 1211 Genève 4, SUISSE.

³CWRA, Chaussée de Charleroi, 234 BE-5030 Gembloux, BELGIQUE.

Introduction Dans le genre *Phaseolus*, les croisements *P. polyanthus* Greenm. (♀) x *P. vulgaris* L. et *P. coccineus* L. (♀) x *P. vulgaris* qui permettent une meilleure transmission des caractères désirés chez le haricot commun (*P. vulgaris*), se soldent par la dégénérescence des embryons hybrides dans 60% des cas au stade globulaire (Baudoin *et al.*, 2004). Afin d'étudier les gènes impliqués dans l'embryogenèse du haricot commun, une population de haricots mutagénisés à l'EMS (EthylMéthaneSulfonate) (Pankhurst & Broughton, 2004) a été analysée.

Matériel et méthodes 40 g de graines de la variété BAT93 de *P. vulgaris* ont été traités avec 180 mL d'EMS 30mM, sous agitation constante, à température ambiante et pendant toute une nuit (16 à 17 heures). Les graines ont été rincées à l'eau stérilisée et semées. Nous avons analysé les plantes M1 (première génération) et M2 (deuxième génération) en vue d'isoler des mutants M2 potentiellement affectés dans les gènes de l'embryogenèse. L'expression des gènes Lipid Transfer Protein (LTP) et Heat Shock Protein (HSP) au cours du développement de l'embryon de la variété originelle BAT93 de *P. vulgaris* a été étudiée par la technique de RT-PCR semi-quantitative. Les ARNs ont été extraits des ovules âgés de 1 à 10 jours. La Transcription Reverse a été réalisée avec le kit « ImProm-IITM Reverse Transcription System » de PROMEGA. Les concentrations des réactifs pour la PCR sont les suivantes : 2µL de RT, 1X de réaction Buffer, 2mM de MgCl₂, 0,2mM de dNTP, 1µM de chaque amorce, 0,5µL de Taq Polymerase. Le gène du facteur d'élongation de la translation 1α (EF-1α) a été utilisé comme témoin constitutif. Le programme PCR utilisé était le suivant : 94°C, 3 min ; (94°C, 30 sec ; 50°C, 45 sec ; 72°C, 1 min)x30 (40) ; 13°C.

Résultats et discussion Les graines M2 choisies étaient issues de plantes M1 qui ont produit moins de gousses matures et celles qui ont produit des gousses matures contenant un grand nombre de graines avortées. Sur 323 mutants M2 issus de 61 lignées M1, deux plantes M2 d'une première lignée (490) ont produit des gousses dont les ovules ne se développaient pas; tandis que les gousses de deux plantes d'une deuxième lignée (522) dégénéraient 15 à 25 jours après l'anthèse. Les embryons de la lignée M2522 s'arrêtaient de croître à différents stades d'évolution (cordiforme et cotylédonaire avec des malformations). Des croisements entre ces deux mutants et la variété originelle ont été réalisés en vue de la caractérisation génétique des mutants sélectionnés, par l'analyse des descendants F2. Il s'agira de voir si les phénotypes observés chez ces mutants sont dus à l'action d'un ou de plusieurs gènes, s'il s'agit de mutations dominantes, codominantes ou récessives. Des graines F1 ont été obtenues avec les 2 mutants lorsque BAT93 est le parent femelle. Seul le croisement réciproque avec M2490 comme parent femelle a produit des graines F1 matures.

Les transcrits de LTP sont plus abondants que ceux de HSP au cours du développement de l'embryon. Les LTP sont détectables après 20 cycles de PCR alors que les HSP sont difficilement détectables même après 30 cycles de PCR. On remarque aussi que les transcrits LTP qui sont moins abondants au début de l'embryogenèse, augmentent au cours du développement embryonnaire. (Fig. 1). Nous étudierons l'expression d'autres gènes de l'embryogenèse au cours du développement de l'embryon de *P. vulgaris*. L'expression des gènes les plus importants sera comparée à celle observée chez les mutants sélectionnés.

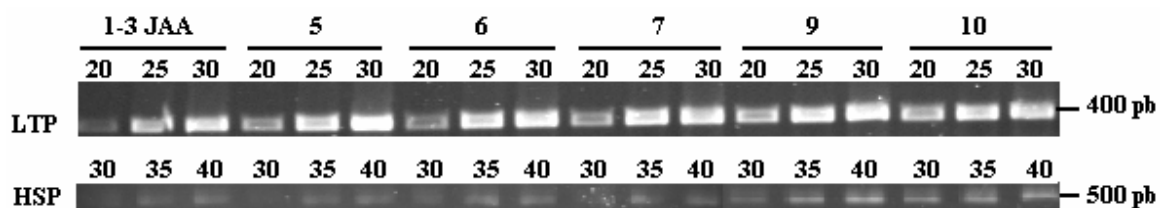


Fig. 1. Niveau des transcrits des gènes LTP et HSP au cours du développement de l'embryon chez *Phaseolus vulgaris*. JAA : Jours Après Anthèse.

Références bibliographiques

Baudoin J.-P., Silué S., Geerts P., Mergeai G. & Toussaint A. (2004). Interspecific hybridization with *Phaseolus vulgaris* L. : embryo development and its genetics. *Recent Res. Devel. Genet. Breeding* **1** : 349 – 364.

Pankhurst C. & W. J. Broughton (2004). Tilling the beans, Meeting Phaseomics III, Geneva, June 13-15, 2004.