

COMMUNAUTE FRANCAISE DE BELGIQUE
ACADEMIE UNIVERSITAIRE WALLONIE-EUROPE
FACULTE UNIVERSITAIRE DES SCIENCES AGRONOMIQUES DE GEMBOUX

**Mécanismes génétiques de l'embryogenèse chez *Phaseolus* et
application en hybridation interspécifique**

Souleymane SILUÉ

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

Promoteurs : Prof. Jean-Pierre BAUDOIN
Dr. Jean-Marie JACQUEMIN

Rapporteurs : Dr. Dominique MINGEOT
Prof. Guy MERGEAI

2009

SILUÉ Souleymane. (2009). Mécanismes génétiques de l'embryogenèse chez *Phaseolus* et application en hybridation interspécifique. (Thèse de doctorat). Gembloux Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques, 140 p., 11 tabl., 16 fig.

RÉSUMÉ

Notre travail qui s'inscrit dans le cadre général de l'étude du développement embryonnaire de *Phaseolus* a pour objectif principal d'isoler et de caractériser des gènes différemment exprimés chez les embryons en voie d'avortement, et donc nécessaires au développement normal des embryons. Des embryons en cours de dégénérescence issus des hybridations interspécifiques et de la mutagenèse induite ont été analysés. Des ADNc différemment exprimés chez ces embryons ont été identifiés par les techniques de l'Hybridation Soustractive Suppressive (HSS) et de la *dot blot*. Les hybridations interspécifiques ont été réalisées entre l'espèce *P. vulgaris* L. utilisée comme parent mâle et les espèces *P. coccineus* L. et *P. polyanthus* Greenm. utilisées comme parents femelles (formes sauvages et cultivées). La mutagenèse induite à l'Ethyl Méthyl Sulfonate (EMS) a été appliquée sur le génotype BAT93 de *P. vulgaris*, une variété améliorée du CIAT.

Dans les croisements *P. coccineus* x *P. vulgaris*, 938 hybridations ont été effectuées et le taux de gousses avortées au-delà de 8 JAP est d'environ 12%. Quatre gousses supposées hybrides ont été obtenues. Pour les croisements *P. polyanthus* x *P. vulgaris*, 733 hybridations ont été réalisées. Le taux de gousses avortées au-delà de 8 JAP est d'environ 18% et une seule gousse supposée hybride a été produite. Les caractères hybrides d'une plante de chacune des deux combinaisons interspécifiques ont été mis en évidence au moyen de caractères morphologiques des fleurs et des graines, mais aussi grâce à l'utilisation d'un marqueur moléculaire, le microsatellite BM160.

La mise en évidence et la caractérisation des embryons en voie d'avortement ont été effectuées à partir de matériels issus des hybridations interspécifiques et de la mutagenèse à l'Ethyl Méthyl Sulfonate (EMS). Les observations, faites sur des embryons extraits et sur des coupes histologiques d'ovules, révèlent des malformations au niveau du suspenseur et des cotylédons et des retards de croissance. Les plantes issues de la mutagenèse et produisant des graines avortant avant la maturité ont été croisées avec des plantes normales. L'analyse de la F2 effectuée sur 96 plantes révèle une proportion mendélienne 3:1 de plantes avec des graines normales et de plantes avec graines qui avortent. Ce résultat suggère un contrôle du caractère « avortement des graines » par une paire d'allèles récessifs.

La technique de l'HSS a permis d'isoler des fragments d'ADNs complémentaires différemment exprimés dans les graines en voie d'avortement. L'analyse des séquences de ces ADNc complémentaires montre qu'ils codent pour plusieurs protéines intervenant dans les développements cellulaire et embryonnaire. Les principales protéines sont le cytochrome P450, la myo-inositol 1-phosphate synthase, la peroxidase cationique, le voltage-dependent anion channel et la sucrose synthase. A l'exception du cytochrome P450, les niveaux d'expression des autres gènes sont plus faibles dans les graines en voie d'avortement issues de la mutagenèse par rapport aux graines normales.

Mots clés : *Phaseolus*, Développement embryonnaire, Avortement des embryons, Gènes de l'embryogenèse, Ethyl Méthyl Sulfonate (EMS), Hybridation Soustractive Suppressive (SSH).

SILUÉ Souleymane. (2009). Genetical mechanisms of *Phaseolus* embryogenesis and application in interspecific hybridization. (Thèse de doctorat). Gembloux, Belgium. Gembloux Agricultural University, 140 p., 11 tabl., 16 fig.

SUMMARY

The main objective of this study was to isolate and to characterize cDNAs differentially expressed in *Phaseolus* degenerating embryos. Aborting embryos from interspecific hybridizations and induced mutation were analysed. cDNAs differentially expressed in these embryos were isolated using the Suppressive Subtractive Hybridization (SSH) and the dot blot techniques. The interspecific hybridizations were performed between *P. vulgaris* L. used as male parent and *P. coccineus* L. and *P. polyanthus* Greenm. used as female parents (wild and cultivated forms). The induced mutation was performed with Ethyl Methyl Sulfonate (EMS) applied on the genotype BAT93 of *P. vulgaris*, a breeding line from CIAT.

A total number of 938 crosses *P. coccineus* x *P. vulgaris* and 733 crosses *P. polyanthus* x *P. vulgaris* were carried out. In the crosses *P. coccineus* x *P. vulgaris*, the rate of pod abortion after 8 days after pollination (DAP) is 12%. Four putative hybrid pods were obtained. The rate of pod abortion after 8 DAP in the crosses *P. polyanthus* x *P. vulgaris* is 18% and one putative hybrid pod was produced. The hybrid nature of one plant from each interspecific combination was confirmed using morphological characters of flowers and seeds and molecular marker (microsatellite BM160).

The isolation and the characterization of degenerating embryos were realised with materials from interspecific hybridizations and from chemical mutagenesis with EMS. The observations of these two materials revealed abnormalities mainly in suspensor and cotyledons; and the embryos failed to grow normally. Plants from mutagenesis which produce degenerating seeds were crossed with normal plants. Genetic analysis on 96 F2 plants revealed a 3:1 Mendel ratio of plants with normal seeds and plants with degenerating seeds. This result suggests the control of the seed abortion trait by a single recessive gene.

The SSH technique was used to isolate cDNAs fragments differentially expressed in aborting seeds. Analysis of the cDNAs sequences revealed that these cDNAs encode for proteins involved in cellular and embryonic development. The main proteins are cytochrome P450, myo-inositol 1-phosphate synthase, cationic peroxidase, voltage-dependent anion channel and sucrose synthase. All the genes showed a reduction of their expression in developing seeds of the mutagenized plants, compared to those observed in wild-type plants.

Keywords : *Phaseolus*, Embryonic development, Embryos abortion, Embryogenesis genes, Ethyl Methyl Sulfonate (EMS), Suppressive Subtractive Hybridization (SSH).

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 complètement 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 des modifications ultérieures.

Dédicaces

À la mémoire de mes parents Mariam OUATTARA (1934-1977) et Moussa SILUÉ (1930-16/10/2008).

Avec toute ma gratitude et ma reconnaissance à mon oncle Kadodiom SILUÉ.

À ma tendre très chère épouse Madoussou et à nos deux filles adorables Bintou et Khady pour leur affectueux soutien moral tout au long de ce doctorat.

REMERCIEMENTS

Au terme de ce parcours plein d'émotions de toute sorte que furent ces années d'études doctorales, je tiens à remercier tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réussite de ce travail.

Je voudrais avant tout à exprimer ma reconnaissance au Ministère Ivoirien de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique pour l'octroi de cette bourse d'étude qui m'a permis de réaliser ces recherches doctorales en Belgique. Je tiens aussi à remercier la Direction générale de l'Enseignement non obligatoire et de la Recherche scientifique (Ministère de la Communauté Française de Belgique) pour la bourse de voyage qui m'a permis de réaliser une partie importante de ce travail, criblage d'une population de haricot mutagénéisé à l'EMS, à l'université de Genève.

J'exprime toute ma reconnaissance à Monsieur le Professeur Jean Pierre BAUDOIN, promoteur, pour m'avoir donné les possibilités de réaliser cette recherche au sein de son unité, m'avoir guidé avec rigueur et un esprit critique pendant la réalisation de ce travail de recherche. Je remercie également Monsieur le Professeur André TOUSSAINT et tout le personnel de l'unité de Phytotechnie Tropicale et d'Horticulture. Que les docteurs Halima BENBOUZA, Daouda KOUADIO et Olivier KONAN et l'étudiante Eugénie BARIKISSOU trouvent ici l'expression de ma reconnaissance pour leurs conseils et leur soutien à la réalisation de ce travail.

Je remercie très sincèrement Monsieur le Docteur Jean Marie JACQUEMIN Co-promoteur, pour son encadrement, sa disponibilité ses conseils de tous les

jours. Je n'oublie pas également son assistant Yordan MUHOVSKI pour sa disponibilité et tout le personnel du département Biotechnologie du Centre wallon de Recherches agronomiques.

Que le Professeur Richard KETTMANN de l'unité de Biologie Cellulaire et Moléculaire soit remercié pour avoir permis la réalisation de la technique de la dot blot dans son unité.

Je tiens également à remercier Monsieur le Professeur William BROUGHTON, chef du Laboratoire de Biologie Moléculaire des Plantes Supérieures de l'Université de Genève, pour avoir accepté ma demande de stage sur la mutagenèse à l'EMS appliquée sur le génotype BAT93 de *Phaseolus vulgaris* au sein de son laboratoire. Bill, thank a lot for the opportunity you gave me to discover new fields. Ces remerciements vont également au Docteur Patricia LARIQUET et à tout le personnel du laboratoire. Pat, je te remercie pour les différentes critiques et suggestions pendant le déroulement de mon stage à Genève.

Mes remerciements sont également adressés au Docteur Dominique MINGEOT (CRA-W) et au Professeur Guy MERGEAI qui m'ont fait l'honneur de juger cette thèse. Je remercie également les membres du comité de thèse dont le professeur Patrick du JARDIN et le Docteur Hugo MAGEIN (CRA-W) pour leurs conseils et suggestions pendant la réalisation de ce travail.

Il m'est agréable de remercier les membres de la communauté musulmane de Gembloux, en particulier messieurs Abderrahman MAROUAN, Mohamed AABAD, Taofic ALABI et Ibourahema COULIBALY; et ceux de l'ASBL

L'OUVERTURE, en particulier messieurs Ibrahima COULIBALY, Abdoulaye SILUÉ, Souleymane Cissé, Arouna BAMBA, Issouf BAMBA et Yaya KONÉ pour leur soutien spirituel pendant mon séjour en Belgique.

Je remercie également les membres de l'association des étudiants ivoiriens en Belgique (ASETIB) et plus particulièrement ceux de la section de Gembloux pour la convivialité et la bonne humeur qui règnent au sein de cette association.

Enfin je voudrais dire un grand merci à mon épouse Madoussou DIABATE et nos deux filles Khady et Bintou pour leur patience et leur indéfectible soutien tout au long de ce parcours.

ABBREVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique
ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire
ADN-T : AND de transfert
AG: AGAMOUS
ARN : Acide ribonucléique
ARNm : Acide ribonucléique messenger
ARS : Agricultural Research Service
ATLTP: *Arabidopsis thaliana* LTP gene
ATML *Arabidopsis thaliana* meristem layer gene
ATP : Adénosine-triphosphate
BCMNV : Bean common mosaic necrosis virus
BCMV : Bean common mosaic virus
BEL: BELL1
BET : Bromure d'éthidium
BGYMV : Bean Golden Yellow Mosaic Virus
BLAST : Basic Local Alignment Search Tool
bp : Paire de base
BSA : Bovine Serum Albumine
CIAT : Centro Internacional de Agricultura Tropical
CYT: Cytochrome P450
DDBJ : DNA Data Bank of Japan
ddNTP didésoxynucléotide
dek :defective kernel
DEPC : Diethyl Pyrocarbonate
DNase: Désoxyribonucléase
Dnase: Désoxyribonucléase
dNTP: Désoxynucléotides triphosphate
dNTP : désoxynucléotide
EBI : European Bioinformatic Institute
EDTA : Acide Ethylène Diamine Tétracétique
emb : embryonic defective
EMBL : European Molecular Biology Laboratory

EMP: EMPTY PERICARP
EMS : Ethyl Methyl Sulfonate
EST : Expressed Sequence Tag
FUS: FUSCA
HAZ: rice PHD-FINGER gene
HD: homeodomain
HD-GL2: GLABRA2 HD
HD-ZIP: LEUCINE ZIPPER HD
HMM: high-molecular-mass
HSP: HEAT SHOCK PROTEIN
HSP: HEAT SHOCK PROTEINS
HSR HEAT SHOCK RESPONSE
ISH: *in situ* hybridization
KN: KNOX, KNOTTED
LANL : Los Alamos National Laboratory
LB : Luria Broth
LEC: LEAFY COTYLEDON
LMM: low-molecular-mass
LTP: LIPID TRANSFER PROTEIN
MIPS: myo-inositol 1-phosphate synthase
MZEPLTP: maize LTP gene
NCBI : National Center for Biotechnology Information
NIG : National Institute of Genetics
nsLTP: nonspecific LTP
OSH: rice homeobox gene
PAS: PASTICCINO
PCR : Polymerase Chain Reaction
PER: Cationic peroxidase
PGP : pregerminated pollen
PNY: PENNYWISE
RACE : rapid amplification of cDNAs ends
RNase : Ribonucléase
rsy: raspberry
RT-PCR : Reverse transcription-PCR

SAM: shoot apical meristem
SBH: SOYBEAN HOMEBOX
SDS : Sodium Dodécyl Sulfate
SMC: Structural Maintenance of Chromosome
SSC : Salt Sodium Citrate
SSH : Suppressive subtractive hybridization
STM: SHOOT MERISTEMLESS
sus : suspensor
SUS: sucrose synthase
TAE : Tampon Acétate EDTA
TARS : Tropical Agriculture Research Station
TE : Tris-EDTA
Ti : tumour inducing
TILLING : Targeting Induced Local Lesions IN Genomes
Tris : Tris (hydroxyméthyl)-méthylamine
TTN: TITAN
USDA : United States Departement of Agriculture
VDAC: Voltage-dependent anion channel
WUS: WUSHEL
ZMHOX: maize PHD-FINGER gene
ZMOCL: maize out cell layer gene

LISTE DES ARTICLES ET COMMUNICATIONS EN RAPPORT AVEC LA THESE

Publications

Silué S., Jacquemin J.M., Lariguet P., Pankhurst C., Broughton W.J., Baudoin J.P. Characterization of cDNAs isolated from *Phaseolus vulgaris* L. aborting seeds by suppression subtractive hybridization (SSH) technique. En préparation

Silué S., Jacquemin J.M., Lariguet P., Pankhurst C., Broughton W.J., Baudoin J.P. Histological studies of *Phaseolus vulgaris* L. aborting embryos from plants defective in seed development. En préparation

Silué S., Jacquemin J.M. & Baudoin J.P. Possibilité d'utilisation des mutations induites dans l'étude de l'embryogenèse chez le genre *Phaseolus*. Soumis à BASE

Silué S. Jacquemin J.M., Baudoin J.P. (2007) Genes Involved in *Phaseolus* Embryogenesis. *Genes, Genomes and Genomics* 1(2): 180-192

Baudoin J.P., **Silué S.**, Geerts P, Mergeai G., Jacquemin J.M., Toussaint A. (2004) Interspecific hybridization with *Phaseolus vulgaris* L.: Embryo development and its genetics. In: SG Pandalai (ed) Recent Research Developments in Genetics and Breeding (Vol I, Part II), Research Signpost, Trivandrum, Kerala, India, pp 349-364

Articles de recherche

Silué S., Jacquemin J.M., Lariguet P., Pankhurst C., Broughton W.J., Baudoin J.P. (2008). Characterization of *Phaseolus vulgaris* L. EMS mutants failing in seed development. *Bean Improvement Cooperative* **51**: 69 – 70.

Silué S., Jacquemin J.M., Baudoin J.P. (2007). Expression of some model plant embryogenesis genes in *Phaseolus* ovules. *Bean Improvement Cooperative* **50**: 15 – 16.

Silué S., Lariguet P., Pankhurst C., Jacquemin J.M., Broughton W.J., Baudoin J.P. (2006). Screening *Phaseolus vulgaris* L. EMS mutants to isolate plants which failed in seed development. *Bean Improvement Cooperative* **49**: 149 – 150.

Silué S., Muhovski Y., Jacquemin J.M., Baudoin J.P. (2005). Different expression levels of Lipid Transfer Protein gene during early stages of *Phaseolus coccineus* embryogenesis. *Bean Improvement Cooperative* **48**: 32 – 33.

Communications lors de congrès

Silué S., Jacquemin J.M., Lariguet P., Pankhurst C., Broughton W.J., Baudoin J.P. Characterization of *Phaseolus vulgaris* L. EMS mutants failing in seed development (Poster). Bean Improvement Cooperative fiftieth anniversary meeting, Madison (USA), 29 - 31 October 2007

Silué S., Lariguet P., Pankhurst C., Jacquemin J.M., Broughton W. J., Baudoin J.P. Analyse de mutants EMS de *Phaseolus vulgaris* L. en vue d'identifier des plantes affectées dans les gènes de l'embryogenèse (Communication). X^{ème} Journée Scientifique du Réseau BIOVEG (AUF), Constantine (Algérie), 08 - 11 May 2006

Silué S., Muhovski Y., Jacquemin J.M., Baudoin J.P. Identification and characterization of genes involved in *Phaseolus* embryogenesis (Communication). COST851, Functional Genomics of Gametic Embryogenesis, Copenhagen (Denmark), 27 - 28 May 2005

S. Silué, Muhovski Y., Jacquemin J.M., Baudoin J.P. Study of genes involved in *Phaseolus* embryogenesis (Communication). PHASEOMICS III congress, Geneva (Switzerland), 13 – 15 June 2004

Silué S., Jacquemin J.M., Toussaint A., Baudoin J.P. Etude de gènes impliqués dans l'embryogenèse de *Phaseolus* (Poster). IX^{ème} Journée Scientifique du Réseau BIOVEG (AUF), Lomé (Togo), 06 – 09 October 2004

Toussaint A., **Silué S.**, Geerts P., Mergeai G., Baudoin J.P. Etude de l'embryogenèse chez *Phaseolus* L. afin de surmonter les barrières d'incompatibilité chez les hybrides interspécifiques (Communication). IX^{ème} Journée Scientifique du Réseau BIOVEG (AUF), Lomé (Togo), 06 – 09 October 2004

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 Principales caractéristiques morphologiques et botaniques de <i>P. coccineus</i> , <i>P. polyanthus</i> et <i>P. costaricensis</i> comparées à <i>P. vulgaris</i>	5
Table 2 Phenotypic variation observed in <i>Arabidopsis</i> titan mutant seeds.....	42
Tableau 3 Matériel végétal utilisé et origine	58
Tableau 4 Composition de la solution nutritive apportée aux plantes	58
Tableau 5 Oligonucléotides utilisés pour la synthèse des adaptateurs et les PCR de la SSH..	62
Tableau 6 Nombre de gousses avortées à différents intervalles de temps après la pollinisation et nombre de gousses matures issues des croisements interspécifiques.....	66
Tableau 7 Caractéristiques des graines et des fleurs issues des génotypes parentaux et des hybrides F1	68
Tableau 8 Résultats des recherches d'homologie dans la base de données du NCBI.....	75
Tableau 9 Oligonucleotides used for suppression subtractive hybridization and for quantitative RT-PCR.....	89
Table 10 Number of clones sequenced from fragments obtained after SSH as showed in figure 14 and composition of each group of sequences.....	92
Table 11 BLAST analysis of SSH clones identified from <i>Phaseolus vulgaris</i> aborting seeds	93

LISTE DES FIGURES

- Figure 1 Principe de la technique SSH (Adapté de Ben, 2005) 13
- Figure 2 Principe de la méthode du *Dye primer* (amorce fluorescente) (Source : Monéger & Tagu, 2003) 17
- Figure 3 Matrices utilisées lors des alignements de séquences..... 19
- Figure 4 Alignment of deduced amino acid sequences of KNOX genes of *Zea mays* (Z_mays, KN1 X61308), *Pisum sativum* (P_sat, AF080104), *Orizy sativa* (O_sat, D16507), *Medicago truncatula* (M_trunc, AF308454), *Glycine max* (G_max, L13663) and *Arabidopsis thaliana* (A_tha, ATU14174)..... 28
- Figure 5 Caractéristiques d'embryons âgés de 20 jours. A : embryon issu d'autofécondation du génotype NI16 de *Phaseolus coccineus*, B et C : embryons issus d'hybridation avec le génotype NI637 de *P. vulgaris* présentant des anomalies au niveau des cotylédons (B) et un retard de croissance (C). (Barres = 250 µm) Photos : SILUÉ S. 67
- Figure 6 Caractéristiques des génotypes parentaux et des hybrides issus des croisements interspécifiques *P. polyanthus* x *P. vulgaris* (A) et *P. coccineus* x *P. vulgaris* (B). La couleur des fleurs, la taille et la couleur des graines des hybrides sont différentes de celles des génotypes parentaux. *P.v.* : *Phaseolus vulgaris*, *P.p.* : *Phaseolus polyanthus*, *P.c.* : *Phaseolus coccineus*. Photos : SILUÉ S. & TOUSSAINT A. 69
- Figure 7 Electrophorèse des fragments amplifiés par l'amorce BM160 sur l'ADN extrait des feuilles des plantes supposées hybrides interspécifiques *Phaseolus* et de leurs parents respectifs. 1 : plante du génotype maternel de *P. polyanthus* G35348 ; 2, 3, 4 : plantes supposées hybrides G35348 x G21245 ; 5 : plante du génotype paternel de *P. vulgaris* G21245 ; 6, 7 : plantes supposées hybrides NI889 x G21245 ; 8 : plante du génotype maternel de *P. coccineus* NI889. Fp et Fp' : fragments du parent G35348 ; Fv et Fv' : fragments du parent G21245 ; Fc et Fc' : fragments du parent NI889. Seuls les échantillons 3 (Fig. 6A) et 7 (Fig. 6B) caractérisés par la présence des fragments des différents parents sont des hybrides. Photo : SILUÉ S. & TOUSSAINT A. 70
- Figure 8 Pourcentage d'avortement des gousses au-delà de 8 jours après pollinisation des génotypes femelles NI889, NI16 et NI1111 de *P. coccineus* et G35348, NI1015 et NI1123 de *P. polyanthus* dans les croisements avec les génotypes NI637 et G21245 de *P. vulgaris*. Cumul représente le pourcentage des effectifs cumulés d'avortement des gousses avec les deux génotypes mâles. 71
- Figure 9 A : Caractéristiques des gousses de 20 jours issues de l'autofécondation du génotype NI16 de *P. coccineus* (gauche) et du croisement entre *P. coccineus* et *P. vulgaris* NI16 x

NI637 (droit). La gousse issue du croisement présente des signes d'avortement. B : Gel d'agarose du produit PCR issu de la SSH. 1 : Produit PCR ; 2 : Marqueur de taille des fragments (paires de bases). Photos : SILUÉ S.....	72
Figure 10 Résultat du Dot Blot après 48 h d'exposition. Les spots numérotés de 1 à 13 présentant une forte intensité chez le « tester » par rapport au « driver » ont été choisis pour le séquençage. Photo : SILUÉ S.	73
Figure 11 Longitudinal sections of <i>Phaseolus vulgaris</i> BAT93 developing embryos at 0 (A and G), 3 (B and H), 5 (C and I), 7 (D and J), 10 (E and K) and 12 (F and L) days after anthesis (DAA). Sections A, B, C, D, E and F represent the wild-type samples while sections G, H, I, J, K and L represent the mutagenized samples. Excepted the samples at the anthesis where there is no difference, embryos from mutagenized samples are delayed in their growth. ac: apical cell, bc: basal cell, sus: suspensor, embp: embryo proper, c: cotyledon. Pictures : SILUÉ S.	83
Figure 12 Suspensor length (left y-axis) and ratios of suspensor length to embryo length (right y-axis) in wild-type and mutagenized samples during seed development. DAA: days after anthesis, E: embryo, M: mutagenized sample, S: suspensor, W: wild-type. Error bars represent the standard error of the mean (SEM).....	84
Figure 13 <i>Phaseolus vulgaris</i> embryos. A-E: embryos from mutagenized M2 plants stop growing at globular (A, 16 DAA), heart (B, 18 DAA) and cotyledon (C-E, 20 DAA) stages. F: a wild type embryo at cotyledon stage 20 DAA. Abnormal embryos show small size and merged cotyledons. Pictures: SILUÉ S.	90
Figure 14 Agarose gel of subtracted fragments from the SSH reaction. M : DNA molecular weight marker. Picture: SILUÉ S.....	91
Figure 15 RT-PCR analysis at 30 cycles. RNAs were extracted from wild-type (driver) and mutagenized (tester) samples developing seeds 3, 5, 7, 10 and 12 days after anthesis (DAA). PER: Cationic peroxidase, CYT: Cytochrome P450, MIPS: myo-inositol 1-phosphate synthase, VDAC: Voltage-dependent anion channel, SUS: sucrose synthase. Picture : SILUÉ S.....	94
Figure 16 RT-PCR products quantification at 30 cycles of PCR. The graph reflects the reduction factor of genes expression in mutagenized samples at 3, 5, 7, 10 and 12 DAA. PER: cationic peroxidase, CYT: cytochrome P450, MIPS: myo-inositol 1-phosphate synthase, VDAC: voltage-dependent anion channel, SUS: sucrose synthase, M: mutagenized samples, W: Wild-type samples. The values were normalized to the levels of 18S rRNA. Error bars represent the standard error (SE).	95

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE.....	
Introduction générale.....	1
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....	
Chapitre I : Généralités sur le haricot commun (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	3
1 Considérations sur la taxonomie, l'origine et l'aire de distribution du haricot commun.....	3
2 Considérations sur les pools géniques et les caractéristiques botaniques du haricot commun.....	3
3 Contraintes liées à la culture et à la productivité du haricot commun	4
3-1 Les maladies rencontrées chez le haricot commun.....	4
3-2 Les ravageurs	7
3-3 Les contraintes abiotiques.....	8
4 Les hybridations interspécifiques dans l'amélioration du haricot commun.....	9
Chapitre II : Généralités sur les techniques de biologie moléculaire et de bioinformatiques utilisées.....	12
1 Généralités et principe de l'Hybridation Soustractive Suppressiv (SSH).....	12
2 Dot blot.....	14
3 Séquençage des acides nucléiques	15
4 Analyse des séquences	17
Chapitre III : Genes involved in <i>Phaseolus</i> embryogenesis	21
Abstract	21
1 Introduction	22
2 Plant embryogenesis and gene expression	23
3 Homeobox genes	25
3-1 KNOX genes.....	27
3-2 BELL1 (BEL) genes	30
3-3 LEUCINE ZIPPER (HD-ZIP) genes	31
3-4 PHD-FINGER genes.....	31
3-5 GLABRA2 (HD-GL2) genes	32
3-6 WUSHEL (WUS) protein	33
4 Heat Shock Protein genes.....	33
5 Lipid Transfer Protein genes	35
6 Pasticcino (PAS) genes	37
7 Leafy cotyledon (LEC) genes	38

8 Titan (TTN) genes	40
9 Conclusion and prospects	41
Chapitre IV : Possibilité d'utilisation des mutations induites dans l'étude de l'embryogenèse	
chez le genre <i>Phaseolus</i>	44
1 Introduction	44
2 Rôle des mutations induites dans l'étude de l'embryogenèse chez les plantes modèles	44
2-1 Les mutations induites	44
2-1-1 La mutagenèse à l'EMS.....	45
2-1-2 La mutagenèse insertionnelle	46
2-2 Les mutants embryons chez <i>Arabidopsis thaliana</i>	47
2-3 Les mutants embryons chez <i>Zea mays</i>	48
2-3-1 Les mutants <i>dek</i>	49
2-3-2 les mutants <i>emb</i>	50
3 Application des mutations induites au haricot commun	51
4 Conclusions	52
EXPERIMENTATIONS	
Objectifs des essais.....	54
Chapitre V : Hybridations interspécifiques entre l'espèce récurrente <i>P. vulgaris</i> utilisée	
comme parent mâle et les espèces <i>P. coccineus</i> et <i>P. polyanthus</i> : caractérisation des	
hybrides interspécifiques et identification d'ADNc différemment exprimés dans les	
graines hybrides en voie d'avortement.....	56
1 Introduction	56
2 Matériel et méthodes	57
2-1 Matériel végétal et conditions de culture	57
2-2 Hybridations interspécifiques	58
2-3 Caractérisation des hybrides interspécifiques.....	59
2-4 Extraction des ARNs et synthèse des ADN complémentaires.....	60
2-5 Hybridation Soustractive Suppressive (SSH)	61
2-6 Clonage des produits d'amplification	62
2-7 Dot blot	62
2-8 Extraction de l'ADN plasmidique des clones d'intérêt (Minipréparation).....	63
2-9 Séquençage des clones d'intérêt	64
3 Résultats	64
3-1 Hybridations interspécifiques	64

3-1-1 Hybridations <i>P. coccineus</i> x <i>P. vulgaris</i>	65
3-1-2 Hybridations <i>P. polyanthus</i> x <i>P. vulgaris</i>	65
3-1-3 Caractéristiques des hybrides obtenus.....	66
3-2 Identification des ADNc différemment exprimés chez des graines hybrides interspécifiques NI16 x NI637 en voie d'avortement par rapport au génotype maternel NI16 de <i>P. coccineus</i>	71
4 Discussion	74
Chapitre VI : Histological studies of <i>Phaseolus vulgaris</i> L. aborting embryos from plants defective in seed development	78
1 Introduction	78
2 Materiel and methods	79
2-1 EMS mutagenesis and plant growth conditions.....	79
2-2 Histological studies.....	79
2-3 Genetic analysis	80
3 Results and discussion.....	80
3-1 Histological studies of embryo development of <i>Phaseolus vulgaris</i> EMS mutagenized plants deficient in seed development.....	80
3-2 Inheritance of the “seed abortion” trait.....	84
4 Conclusion and prospects.....	85
Chapitre VII : Characterization of cDNAs isolated from <i>Phaseolus vulgaris</i> L. aborting seeds by suppression subtractive hybridization (SSH) and quantitative RT-PCR techniques	86
1 Introduction	86
2 Material and methods	86
2-1 Plant material and growth conditions	86
2-2 RNA isolation and cDNA synthesis	87
2-3 Suppressive Subtractive Hybridization (SSH).....	87
2-4 Subtracted cDNAs cloning and sequencing.....	88
2-5 Quantitative RT-PCR.....	88
3 Results	89
3-1 Screening of M2 EMS mutagenized plants of <i>Phaseolus vulgaris</i>	89
3-2 SSH products and sequence analysis	91
3-3 Expression analysis of selected genes by semi-quantitative RT-PCR.....	94
4 Discussion	95
5 Conclusion and prospects.....	98

CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES	
Conclusions générales	99
Perspectives	103
RÉFÉRENCES	
Références	107
ANNEXES	
1 Liste des séquences d'ADN complémentaires différemment exprimées dans des graines hybrides <i>P. coccineus</i> x <i>P. vulgaris</i> (NI16xNI637) en voie d'avortement par rapport à des graines issues de l'autofécondation du génotype maternel NI16 de <i>P. coccineus</i>	141
2 Liste des séquences d'ADN complémentaires différemment exprimées dans des graines en voie d'avortement issue de la plante de deuxième génération sélectionnée suite à la mutagenèse à l'EMS du génotype BAT93 de <i>Phaseolus vulgaris</i> par rapport au génotype non muté	143
3 Liste des séquences nucléotidiques obtenues pendant cette thèse et soumises à la banque de gènes du NCBI	146

INTRODUCTION GENERALE

Introduction générale

Dans le genre *Phaseolus*, le haricot commun (*Phaseolus vulgaris* L.) est l'espèce économiquement la plus importante avec plus de 90 % de la production mondiale de haricot. Il constitue la principale légumineuse alimentaire de plus de 300 millions de personnes en Amérique latine et en Afrique Centrale et de l'Est (Godderis, 1995 ; Broughton *et al.*, 2003). La production mondiale en haricot sec en 2007 était estimée à 19,29 millions de tonnes. La surface totale consacrée à cette production représentait environ 26,92 millions d'hectares pour un rendement moyen de 0,72 t/ha. Le rendement moyen en Amérique du Nord et dans l'Union Européenne est de 1,63 t/ha et pour l'Afrique il n'est que de 0,59 t/ha (source : FAO, <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx>). Ce faible rendement dans les pays en développement est dû d'une part, aux contraintes biotiques et abiotiques de production auxquelles le haricot commun est très sensible, et d'autre part à l'absence de variétés résistantes ou tolérantes à ces contraintes au sein du pool génique primaire du haricot commun. En effet, plus de 200 agents pathogènes (fongiques, bactériens et viraux) sont connus chez le haricot commun et certains d'entre eux causent des pertes économiques considérables (Melotto *et al.*, 2000 ; Mahuku *et al.*, 2002 ; Caixeta *et al.*, 2003). Les facteurs abiotiques tels que les hautes températures, la sécheresse contribuent aussi à réduire les rendements du haricot (Sharma *et al.*, 2002 ; Bayuelo-Jiménez *et al.*, 2003 ; Rainey & Griffiths, 2005).

Dans les travaux d'amélioration variétale du haricot commun, les hybrides interspécifiques ont été exploités pour introduire des gènes utiles absents ou faiblement exprimés chez la légumineuse. Les croisements ont été réalisés surtout avec les deux espèces donneuses *P. coccineus* L. et *P. polyanthus* Greenm. phylétiquement les plus proches de *P. vulgaris*, et en les utilisant comme parents maternels afin de favoriser l'introgression des gènes utiles de ces deux taxons (Debouck & Smartt, 1995 ; Busogoro *et al.*, 1999 ; Baudoin, 2001). Malheureusement ces croisements mettent très souvent en évidence un avortement très précoce des embryons hybrides (Camarena & Baudoin, 1987 ; Debouck, 1999 ; Baudoin *et al.*, 2004). L'avortement des embryons hybrides est attribué en partie à des raisons nutritionnelles : les mauvais fonctionnements de l'albumen, du suspenseur et des tissus maternels entraîneraient une compétition entre l'albumen et l'embryon, d'une part, et entre le suspenseur et l'embryon, d'autre part. Ces différentes anomalies entravent l'alimentation normale de l'embryon hybride et le maintien d'un équilibre minéral et hormonal nécessaire au métabolisme de l'embryogenèse (Lecomte, 1997 ; Geerts *et al.*, 2002 ; Toussaint *et al.* 2004).

L'utilisation de l'embryoculture a permis la régénération de plantes hybrides issues de ces différents croisements. Les embryons hybrides mis en culture étaient âgés de 7 à 33 jours et avaient tous atteint le stade cordiforme tardif ou cotylédonaire (Alvarez *et al.*, 1981 ; Prendota, 1984 ; Camarena & Baudoin, 1987 ; Camarena, 1988).

Par ailleurs l'identification des gènes majeurs impliqués dans l'embryogenèse de *Phaseolus* permettrait d'avoir une meilleure compréhension de l'embryogenèse et du phénomène d'avortement des embryons. En effet le développement normal de l'embryon et des graines des plantes requiert l'expression de manière coordonnée et régulière de nombreux gènes depuis la première division du zygote jusqu'à la maturité des graines (McElver *et al.* 2001). Un défaut de régulation de ces gènes entraîne des modifications morphologiques et physiologiques dans le développement des graines. Ces modifications peuvent conduire à un arrêt total de croissance des graines et leur avortement avant la maturité (McElver *et al.*, 2001 ; Tzafrir *et al.*, 2004).

Notre travail s'inscrit dans le cadre général de l'étude de l'embryogenèse chez le genre *Phaseolus* et s'intéresse particulièrement à l'identification et à la caractérisation des gènes clés nécessaires au développement normal de l'embryon. Cette étude permettra de déterminer la nature et la fonction de ces gènes et d'avoir une meilleure compréhension du phénomène d'avortement des embryons *Phaseolus*.

Ce document s'articule autour de trois parties. La première partie qui est une synthèse bibliographique traite d'abord des généralités sur le haricot commun (*Phaseolus vulgaris*) et des principaux outils de biologie moléculaire utilisés pendant cette étude. Ensuite nous traitons de l'embryogenèse des plantes et de l'analyse de quelques gènes impliqués dans l'embryogenèse des plantes modèles. Cette première partie se termine par une réflexion sur la possibilité d'utiliser les mutations induites dans l'étude de l'embryogenèse de *Phaseolus*. La deuxième partie concerne le volet expérimental de ce travail dans laquelle nous exposons les différents résultats acquis sur les hybridations interspécifiques ; la caractérisation des embryons de *Phaseolus* en dégénérescence issus soit d'hybridations interspécifiques, soit de la mutagenèse à l'EMS ; l'identification d'ADNc différemment exprimés dans les graines en avortement. Dans la dernière partie de ce document nous rapportons les principales conclusions tirées de ce travail et émettons des réflexions pour la suite de cette étude.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I : Généralités sur le haricot commun (*Phaseolus vulgaris* L.)

1 Considérations sur la taxonomie, l'origine et l'aire de distribution du haricot commun

Le genre *Phaseolus* se classe dans la sous-tribu des *Phaseolinae*, tribu des *Phaseoleae*, famille des *Fabaceae* et ordre des Fabales. Au sein des *Phaseolinae* (à style barbu sous le stigmate), les deux genres *Phaseolus* et *Vigna* sont les plus importants et contiennent à eux seuls le plus grand nombre d'espèces cultivées comme légumineuses vivrières. La section *Phaseolus* du genre *Phaseolus* est la plus importante et regroupe notamment les cinq espèces cultivées : *P. acutifolius* A. Gray., *P. coccineus* L., *P. lunatus* L., *P. polyanthus* Greenm. et le haricot commun *P. vulgaris* L. Ce sont des plantes diploïdes de nombre chromosomique $2n = 22$ (Maréchal *et al.*, 1978 ; Baudoin *et al.*, 2002 ; Freytag & Debouck, 2002).

Le haricot commun et les haricots du genre *Phaseolus*, sont originaires d'Amérique centrale et d'Amérique du Sud. Le haricot commun a été domestiqué indépendamment en Amérique centrale (Mexique et Guatemala) et dans les Andes d'Amérique du Sud (principalement le Pérou) pendant plus de 5000 ans et ensuite transporté vers d'autres continents depuis le XVII^e siècle (Bernal & Graham, 2001). De nos jours, il a une importance considérable, en particulier en Amérique du Sud et en Afrique. L'espèce est bien établie dans de nombreux pays africains où elle a été introduite par les Portugais au XX^{ème} siècle, et c'est dans la région des Grands Lacs d'Afrique centrale que sa culture est la plus intensive (Wortmann *et al.*, 1998 ; Nyabyenda, 2005).

2 Considérations sur les pools géniques et les caractéristiques botaniques du haricot commun

Dans le genre *Phaseolus*, sur base de l'analyse du génome, des essais d'aptitude à la combinaison ont été conduits entre les divers taxons domestiqués et sauvages. Plusieurs paramètres tels que le taux de réussite des hybridations, le développement des embryons, l'appariement chromosomique à la méiose, la qualité pollinique, la croissance et la fertilité des hybrides F1, l'amplitude des disjonctions en F2, etc., ont été pris en considération lors de ces tests. Les résultats de ces tests ainsi que des analyses génomiques, botaniques et phytogéographiques ont permis de définir quatre pools géniques par rapport à l'espèce *Phaseolus vulgaris*. Le pool génique primaire comprend les variétés cultivées et sauvages du

haricot commun. Le pool secondaire est constitué des espèces *P. coccineus* L., *P. polyanthus* Greenm. et *P. costaricensis* Freytag et Debouck. Les espèces *P. acutifolius* A. Gray et *P. parviflorus* Freytag composent le pool génique tertiaire. Le quatrième pool génique comprend *P. lunatus* L., *P. angustissimus* A. Gray, et *P. filiformis* Piper (Freytag & Debouck, 1996 ; Fofana *et al.*, 1997 ; Maquet *et al.*, 1997 ; Singh, 2001).

Les principales caractéristiques morphologiques de *P. vulgaris* et des trois espèces constituant le pool génique secondaire de *P. vulgaris* sont résumées dans le tableau 1. Les trois espèces *P. vulgaris*, *P. polyanthus* et *P. coccineus* sont largement décrites par de nombreux auteurs (Maréchal *et al.*, 1978 ; Schmit & Baudoin, 1987 ; Delgado-Salinas, 1988). *P. costaricensis* qui est une espèce sauvage a été collectée par Debouck *et al.* (1989) au Costa Rica et décrite par Freytag & Debouck (1996).

3 Contraintes liées à la culture et à la productivité du haricot commun

Le haricot commun cultivé est extrêmement sensible aux maladies et aux ravageurs, ainsi qu'aux contraintes édaphiques particulièrement dans les régions tropicales (sols pauvres, températures et humidités relatives trop élevées, favorisant le développement des agents pathogènes) et on estime que plus de 50% de la production est perdue chaque année en Afrique tropicale. Ces maladies et ravageurs sont extrêmement variés. Des sources de résistances ont été identifiées aussi bien dans le pool génique primaire du haricot commun que dans les pools secondaires et tertiaires. Nous citons ici quelques unes de ces contraintes et quelques gènes de résistance isolés.

3-1 Les maladies rencontrées chez le haricot commun

La maladie des taches anguleuses des feuilles causée par *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferraris, est très présente dans les régions tropicales et subtropicales d'Amérique Centrale et du Sud, et en Afrique de l'Est et du Centre. C'est la plus importante et la plus répandue des contraintes biotiques qui affectent la production du haricot en Afrique (Wortmann *et al.*, 1998). Des espèces résistantes ont été identifiées dans la collection de *P. vulgaris* du CIAT et aussi à l'intérieur des espèces *P. coccineus* et *P. polyanthus* qui appartiennent au pool génique secondaire (Schwartz *et al.*, 1982 ; Mahuku *et al.*, 2004).

Tableau 1 Principales caractéristiques morphologiques et botaniques de *P. coccineus*, *P. polyanthus* et *P. costaricensis* comparées à *P. vulgaris*

Caractéristiques morphologiques	Espèces					
	<i>P. vulgaris</i>	<i>P. coccineus</i>		<i>P. polyanthus</i>		<i>P. costaricensis</i>
		Cultivé	Sauvage	Cultivé	Sauvage	
Plante						
Période végétative	annuelle	pérenne	pérenne	pluriannuelle	pérenne	pérenne
Système racinaire	superficielle fasciculé	tubéreux	tubéreux	épais et fibreux	épais et fibreux	fibreux non profond
Type de germination	épigée	hypogée	hypogée	épigée	épigée	épigée
Habitus de croissance	pseudo-déterminé nain à indéterminé volubile	pseudo-déterminé nain à indéterminé volubile	indéterminé volubile	indéterminé volubile	indéterminé volubile	indéterminé volubile
Inflorescence						
Racème (cm)	7 à 30	10 à 60	8 à 20	10 à 50	3 à 30	14 à 33
Pédoncule (cm)	5 à 15	10 à 35	7 à 14	4 à 15	1 à 15	11 à 18
Nbre d'insertions florales	1 à 10	2 à 35	2 à 14	5 à 40	2 à 20	8 à 30
Fleur						
Couleur	violette à blanche	écarlate, blanche ou rose	écarlate	blanche ou violette	violette foncé	rose fuchsia
Taille	moyenne	grande	grande à moyenne	grande	grande	grande
Position du stigmate	introrse	extrorse	extrorse	terminale introrse	terminale introrse	terminale extrorse
Forme de la bractéole	spatulée	ovale	ovale	linéaire lancéolée	linéaire lancéolée	ovale à allongée ovale
Taille de la bractéole	égale au calice	variable	variable	grande	moyenne à grande	grande
Ouverture des ailes	non ouvertes	non ouvertes	non ouvertes	ouvertes	ouvertes	ouvertes
Présence de poils à l'étendard	non	oui	oui	oui	oui	-
Mode de reproduction prépondérant	autogame	allogame	allogame	allogame	allogame	allogame
Gousse						
Forme	longue et mince	plus ou moins longue et large	linéaire	courte et large	courte et large	plus ou moins longue et large
Forme de la coupe transversale	ovale	comprimée	comprimée	comprimée	comprimée	comprimée
Nbre d'ovules par gousse	5 à 14	4 à 8	4 à 9	3 à 5	3 à 5	6 à 8
Graine						
Taille	moyenne à petite	grande	petite	grande	moyenne	moyenne
Hile	circulaire	elliptique allongé	elliptique allongé	ovale	ovale	allongé ovale
Poids de 100 graines (g)	20 à 50	90 à 120	4 à 21	50 à 80	22 à 26	18

(Adapté de Schmit, 1992 ; Baudoin *et al.*, 2002 ; Nyabyenda, 2005)

La rouille commune du haricot causée par *Uromyces appendiculatus* Pers., est une maladie importante dans les zones tempérées et tropicales. Au Brésil, les pertes de rendement liées à ce pathogène sont comprises entre 20 et 45% (Jesus Junior *et al.*, 2001). Le grand nombre de souches de l'agent pathogène de la rouille a amené les sélectionneurs à développer une résistance durable à la rouille du haricot en utilisant le pyramidage des gènes de résistance. Cette méthode consiste à réunir au sein d'une même variété plusieurs gènes de résistance ou de tolérance aux contraintes de production (Stavelly, 2000).

L'antracnose du haricot est une maladie fongique des semences du haricot commun causée par *Colletotrichum lindemuthianum* Sacc. & Magn. que l'on retrouve sur toutes les aires de culture de *P. vulgaris* (Melotto *et al.*, 2000). La résistance génétique est la méthode la plus efficace de contrôler l'antracnose chez le haricot commun dans la mesure où des sources de résistance sont disponibles (Mahuku *et al.*, 2002).

La pourriture racinaire est causée par un complexe d'agents pathogènes véhiculés par le sol et qui appartiennent aux genres *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Pythium*, *Macrophomina*, *Thielaviopsis* et *Aphanomyces* (Abawi & Pastor-Corrales, 1990). La pourriture des racines est économiquement importante dans la plupart des régions de cultures du haricot, et surtout dans des régions caractérisées par une faible fertilité des sols (Snapp *et al.*, 2003). Améliorer les niveaux de résistance à la pourriture des racines est un élément clé de la réussite du développement de la tolérance à la sécheresse chez les haricots (Miklas *et al.*, 2006).

L'ascochytose du haricot est une importante maladie foliaire dont l'agent pathogène, *Phoma exigua* var. *diversispora* (Bubak) Boerema, sévit particulièrement dans les régions de moyennes et hautes altitudes d'Afrique Centrale et de l'Est, d'Amérique Centrale et du Sud. Les sources de résistance extrêmement rares dans le pool génique primaire du haricot commun sont présentes chez les espèces *P. coccineus* et *P. polyanthus* du pool secondaire (Schmit & Baudoin, 1987 ; Obando *et al.*, 1988).

La fonte des semis est causée par un champignon du nom de *Rhizoctonia solani* Kühn (ou *Thanatephorus cucumeris* (Franck) Donk). Quelques variétés de résistance modérée ont été identifiées chez le haricot commun (Rosas *et al.*, 2003) et chez les espèces *P. coccineus* et *P. acutifolius* (Takegami & Beaver, 2000).

La mosaïque commune du haricot (BCMV) et **la mosaïque nécrotique commune du haricot** (BCMNV) sont des maladies causées par des potyvirus les plus fréquemment observés et les plus néfastes au haricot commun dans le monde entier (Drijfhout, 1978; McKern *et al.*, 1992). La résistance génétique à ces deux potyvirus est contrôlée par une série de loci multi-alléliques indépendants (Kelly *et al.*, 2003 ; Mukeshimana *et al.*, 2005).

La mosaïque jaune dorée du haricot (BGYMV) est une maladie provoquée par des begomovirus et transmise par une mouche blanche *Bemisia tabaci* Glennadius. Les begomovirus interfèrent avec la production de la chlorophylle et affectent la photosynthèse provoquant ainsi un jaunissement intense du feuillage (chlorose) (Blair *et al.*, 1995). Plusieurs gènes de résistance à BGYMV ont été mis en évidence chez *P. coccineus* (Osorno *et al.*, 2003)

La bactériose à halo est causée par *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolica* (Burkh.) Dows. Elle est rencontrée surtout en zone de hautes altitudes, et est favorisée par des basses températures et des pluies abondantes (Nyabyenda, 2005). Neuf souches du pathogène ont été mises en évidence par Taylor *et al.*, (1996) dont la souche 6 est la plus virulente (Lamppa *et al.*, 2002).

La bactériose commune ou graisse du haricot est provoquée par *Xanthomonas campestris* pv *phaseoli* (Smith) Dye qui attaque principalement les feuilles et les gousses. Les sources de résistance identifiées appartiennent aux espèces *P. coccineus* et *P. acutifolius*, mais aussi au sein de l'espèce *P. vulgaris* (Miklas *et al.*, 1999 ; Miklas *et al.*, 2003).

3-2 Les ravageurs

Les mouches du haricot (*Ophiomyia phaseoli* Tryon et *O. spencerella* Greathead) sont des insectes très dommageables du haricot en Afrique et en Asie (Hillocks *et al.*, 2006). Les larves creusent des galeries au niveau des feuilles et des tiges. On trouve aussi des pupes noires ou brunes à la base de la tige et des racines. En cas d'attaque, les jeunes plantes qui sont les plus sensibles à cette mouche meurent, tandis que les plantes plus âgées souffrent de problèmes de croissance et d'une importante diminution de rendement (Nyabyenda, 2005). Des variétés tolérantes à ces insectes sont présentes chez *Phaseolus vulgaris* et également chez *P. coccineus* (Kornegay & Cardona, 1991).

Les cicadelles (*Empoasca* spp.) sont des parasites qui se nourrissent des tissus du phloème, transmettent des maladies virales et provoquent des retards de croissance au niveau de la plante. Les espèces les plus souvent rencontrées chez le haricot commun sont *E. fabae* Harris et *E. kraemeri* Ross & Moore (Miklas *et al.*, 2006). La résistance à *E. fabae* serait liée à la pubescence des feuilles où des poils crochus empêchent le développement des larves et des adultes (Pillemer & Tingey, 1976). Un autre mécanisme de résistance est de type antixénose, ce qui se traduit par le fait que les insectes s'alimentent de moins en moins de la plante (Kornegay *et al.*, 1989).

Les bruches *Zabrotes subfasciatus* Boheman et *Acanthoscelides obtectus* Say sont les principaux ravageurs du haricot stocké causant environ 13% de perte (Kornegay & Cardona, 1991). Une protéine spéciale, l'arcéline, présente dans les graines de certaines variétés sauvages du haricot commun du Mexique, confère une résistance aux bruches. Des sources de résistances ont été également découvertes chez les espèces telles que *P. acutifolius*, *P. costaricensis*, *P. lunatus* (Yamada *et al.*, 2005 ; Lioi *et al.*, 2007).

Le charançon du haricot (*Apion godmani* Wagner) est un insecte ravageur destructeur du haricot cultivé au Mexique et en Amérique centrale, dans les régions de hautes altitudes entre 800 et 2000 m. Les insectes colonisent les plantes au moment de la floraison, pondent des œufs dans les gousses en formation et les larves pénètrent dans les graines immatures. Les pertes de rendement qui peuvent être supérieures à 90% sont très variables et dépendent des conditions climatiques (Cardona & Kornegay, 1999 ; Blair *et al.*, 2006). Des sources de résistance ont été découvertes à l'intérieur de l'espèce *P. vulgaris* (Garza *et al.*, 2001) et notamment chez des variétés améliorées (Beebe *et al.*, 1993). Deux formes de mécanismes de résistance au charançon ont été mises en évidence : une forme impliquant une réaction d'hypersensibilité qui encapsule les sites de ponte, les œufs ou les larves d'insectes dans les tissus nécrosés ; et une autre qui affecte la préférence pour les sites de ponte (Garza *et al.*, 2001).

Les thrips sont des ravageurs qui peuvent causer de graves dommages aux plantes non seulement par l'alimentation des larves et des adultes, mais aussi grâce à leur capacité à transmettre des virus de maladies. L'espèce *Thrips palmi* Karny cause une perte d'environ 30% chez le haricot vert et toute la récolte peut être perdue chez les génotypes très sensibles (Rendon *et al.*, 2001). Quelques génotypes mésoaméricains du haricot commun à petites graines ont été identifiés comme partiellement résistants ou tolérants (Cardona *et al.*, 2002).

3-3 Les contraintes abiotiques

Le terme « stress abiotiques » est un terme général qui comprend de multiples contraintes telles que la chaleur, le froid, la sécheresse, l'excès de lumière, le rayonnement UV-B (rayonnement Ultra-violet de longueur d'onde moyenne entre 315 et 280 nm), l'excès d'eau, la salinité, les blessures occasionnées par les ravageurs et les pratiques culturales, l'exposition à l'ozone, et le choc osmotique ; on estime que 90% des terres arables sont soumises aux stress abiotiques (Dita *et al.*, 2006). Certaines de ces contraintes, telles que la sécheresse, les températures extrêmes et la haute salinité limiteraient fortement la productivité des cultures.

La sécheresse est l'un des principaux facteurs limitant la productivité des cultures dans le monde (Sharma & Lavanya, 2002) et les variétés ayant une forte tolérance à cette contrainte sont importantes pour le maintien d'un bon rendement dans les régions où les saisons sèches sont fréquentes. Environ 60% des haricots produits proviennent des régions soumises à un déficit hydrique. La sécheresse qui réduit de plus de 50% le rendement du haricot commun, est la deuxième contrainte affectant le rendement de cette espèce après les maladies (Teran & Singh, 2002 ; Martinez *et al.*, 2007).

La salinité du sol peut inhiber la croissance et le rendement du haricot à cause d'une toxicité et d'un déséquilibre ioniques, et d'une réduction du potentiel hydrique de la plante (Ashraf, 1997). Le haricot commun est extrêmement sensible à la salinité et on estime qu'environ 5 à 30% des zones de production du haricot sont affectées par la salinité du sol (CIAT, 1992).

Les hautes températures (> 30°C le jour et > 20°C la nuit) entraînent une réduction de rendement chez le haricot commun à cause d'une transpiration excessive de la plante (Rainey & Griffiths 2005).

Face à toutes ces contraintes biotiques et abiotiques de production du haricot commun cultivé, les chercheurs tentent depuis longtemps d'améliorer cette culture par l'introduction de gènes contrôlant la résistance et la tolérance. Ces sources de résistance et de tolérance sont recherchées aussi bien dans le pool génique primaire de *Phaseolus vulgaris* en utilisant les variétés sauvages, que dans les pools géniques secondaires et tertiaires. Ce transfert de résistance vers le haricot commun cultivé se fait par les hybridations intra et interspécifiques.

4 Les hybridations interspécifiques dans l'amélioration du haricot commun

D'une manière générale, l'hybridation interspécifique vise à introduire au sein du génotype d'une plante cultivée des gènes nouveaux appartenant à une autre espèce (Allard, 1960 ; Lacadena, 1977). Les hybridations interspécifiques sont intéressantes en ce sens qu'elles offrent des possibilités de créer une large variabilité génétique renfermant plusieurs caractères de l'espèce receveuse, le ou les caractères de l'espèce donneuse et parfois de nouveaux caractères inattendus (Katanga, 1989). L'introduction de caractères utiles, absents ou faiblement exprimés dans le pool génique primaire de l'espèce cultivée du haricot commun est l'objet essentiel d'un programme d'hybridation interspécifique dans le genre *Phaseolus* (Baudoin *et al.*, 1992). Les génotypes les plus utilisés appartiennent aux espèces *P. coccineus*,

P. polyanthus et *P. acutifolius* (Mejia-Jimenez *et al.*, 1994 ; Camarena & Baudoin, 1987 ; Busogoro *et al.*, 1999 ; Mahuku *et al.*, 2003).

Les croisements réalisés au sein du complexe d'espèces *P. vulgaris* – *P. polyanthus* – *P. coccineus* ont permis de mieux appréhender les problèmes liés à l'introggression de caractères intéressants chez *P. vulgaris*. On constate que les croisements utilisant *P. vulgaris* comme parent femelle sont relativement faciles à réaliser, mais se soldent dans les générations futures par une perte progressive des caractères des parents mâles (*P. coccineus* et *P. polyanthus*). 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 utilisés (Camarena & Baudoin 1987 ; Baudoin *et al.*, 1992). Cet avortement se produit pour des raisons essentiellement nutritionnelles : le mauvais fonctionnement de l'albumen, du suspenseur et des tissus maternels entrave en effet l'alimentation normale de l'embryon et le maintien d'un équilibre minéral et hormonal nécessaire au métabolisme de l'embryogenèse (Lecomte, 1997). Camarena & Baudoin (1987) ont obtenu plus de 40 % de réussite dans les croisements *P. vulgaris* (♀) x *P. polyanthus*, alors que l'obtention des hybrides réciproques *P. coccineus* (♀) x *P. vulgaris* et *P. polyanthus* (♀) x *P. vulgaris* nécessite soit l'aide de l'embryoculture, soit l'utilisation de populations sauvages de *P. coccineus* comme cytoplasme compatible. En effet, Nassar (1978) obtient un taux de réussite de 34,8 % chez le croisement *P. vulgaris* (♀) x *P. coccineus* et 1,2 % dans le croisement réciproque. Cette même tendance est observée avec Angeles (1986) qui obtient un taux de 11,3 % chez le croisement *P. vulgaris* (♀) x *P. coccineus* subsp. *purpurascens* contre 8,3 % dans le croisement réciproque. Ce dernier n'a cependant pas donné de graines viables. De même Camarena (1988) a obtenu 14,3 % de réussite pour le croisement *P. vulgaris* (♀) x *P. polyanthus* en utilisant comme parents des génotypes cultivés des deux espèces. Dans le croisement réciproque, aucune gousse mûre n'a été récoltée. Cependant, le recours à l'embryoculture a permis la régénération de trois plantes hybrides. Les travaux de Baudoin *et al.* (2004) et Nzungize (2005) ont montré que les taux de rétention des gousses hybrides au-delà de 8 jours étaient de 18,6% pour les croisements *P. polyanthus* (♀) x *P. vulgaris*, et de 14,7% pour les croisements *P. coccineus* (♀) x *P. vulgaris* et une plante hybride a été obtenue pour chaque type de croisement.

Tous ces résultats nous montrent que l'essentiel des barrières d'incompatibilité entre le haricot commun et les espèces *P. coccineus* et *P. polyanthus* lors des hybridations survient après la fécondation au stade postzygotique. Ces barrières dépendent aussi des génotypes utilisés lors des croisements. Les hybridations interspécifiques ont permis d'améliorer le

haricot commun par l'apport de gènes de résistance et/ou de tolérance vis-à-vis des contraintes biotiques et abiotiques ; par l'amélioration de caractères agronomiques tels que la maturité précoce, la productivité, l'habitus de croissance, la couleur de la graine, etc. (Baudoin *et al.*, 1995 ; Busogoro *et al.*, 1999 ; Mahuku *et al.*, 2002).

Chapitre II : Généralités sur les techniques de biologie moléculaire et de bioinformatiques utilisées

Dans le but d'identifier des gènes clés de l'embryogenèse, nous avons utilisé différentes techniques de biologie moléculaire et de bioinformatique. Après l'extraction des ARN et synthèse des ADNc, nous avons d'abord utilisé la technique de l'Hybridation Soustractive Suppressive (SSH) afin d'isoler des fragments d'ADNc potentiellement spécifiques aux graines en voie d'avortement. La technique *dot blot* a ensuite permis la purification de la population d'ADNc des faux-positifs. Les fragments ainsi obtenus ont été séquencés par la méthode de Sanger et analysés via le site du NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

1 Généralités et principe de l'Hybridation Soustractive Suppressive (SSH)

C'est une technique de criblage différentiel utilisée pour comparer deux matériels biologiques donnés en déterminant les ARN messagers propres à chacun d'eux et en éliminant les ARNm qu'ils ont en commun. Comme la plupart des techniques de soustraction, on désigne par le terme de « tester » l'échantillon d'intérêt et par le terme de « driver » l'échantillon témoin auquel est comparé le « tester » (Fig. 1) (Bruyninx *et al.*, 1998 ; Grenier, 2003). L'échantillon d'intérêt dans notre cas est issu des graines de *Phaseolus* en cours d'avortement.

Après extraction et rétro-transcription des ARNm issus des 2 échantillons à comparer et digestion des ADNc avec une enzyme générant des bouts francs (RsaI dans notre cas), l'ADNc d'intérêt « tester » est séparé en 2 fractions égales auxquelles sont ajoutés deux adaptateurs différents. Deux hybridations sont alors réalisées. Lors de la 1ère hybridation (1), les ADNc à soustraire « driver » sont ajoutés en excès à chaque fraction d'ADNc « tester ». Après dénaturation et renaturation, plusieurs possibilités se présentent: les brins complémentaires des gènes présents dans les deux conditions (« tester » et « driver ») peuvent s'hybrider ensemble (formes c1 et c2), reformer les homoduplex initiaux (formes b1, b2, d1 et d2) ou rester en simplex (formes a1, a2, d1 et d2). Selon l'origine du brin d'ADNc, chacune des formes possède ou non des adaptateurs aux extrémités. Les simplex de type 'a' sont particulièrement intéressants : ils sont enrichis en séquences différentiellement exprimées (les gènes communs aux deux conditions créant des hétéroduplex de type 'c') et ils sont présents à la même concentration même pour des gènes plus ou moins exprimés. Au cours de la seconde hybridation (2), les 2 fractions de tester sont mélangées sans dénaturation préalable. Un excès d'ADNc « driver » préalablement dénaturé est ajouté au mélange. Une nouvelle forme

d'homoduplex (forme e), portant un adaptateur différent à chaque bout, peut se former. Après élongation des extrémités de chaque complexe à l'aide d'une première PCR avec des amorces spécifiques des adaptateurs (3), une deuxième PCR est effectuée à l'aide d'amorces spécifiques des parties internes des adaptateurs (4). A l'issue de cette PCR, les fragments de type 'b' ne seront pas amplifiés du fait de la présence d'adaptateurs identiques aux deux extrémités. Seuls les hétéroduplex 'e', correspondant aux séquences préférentiellement exprimées dans les conditions d'intérêt sont amplifiés exponentiellement. C'est l'effet suppressif de la PCR qui permet d'éliminer les fragments non spécifiques de l'échantillon « tester ». (Ben, 2005 ; Grenier, 2003).

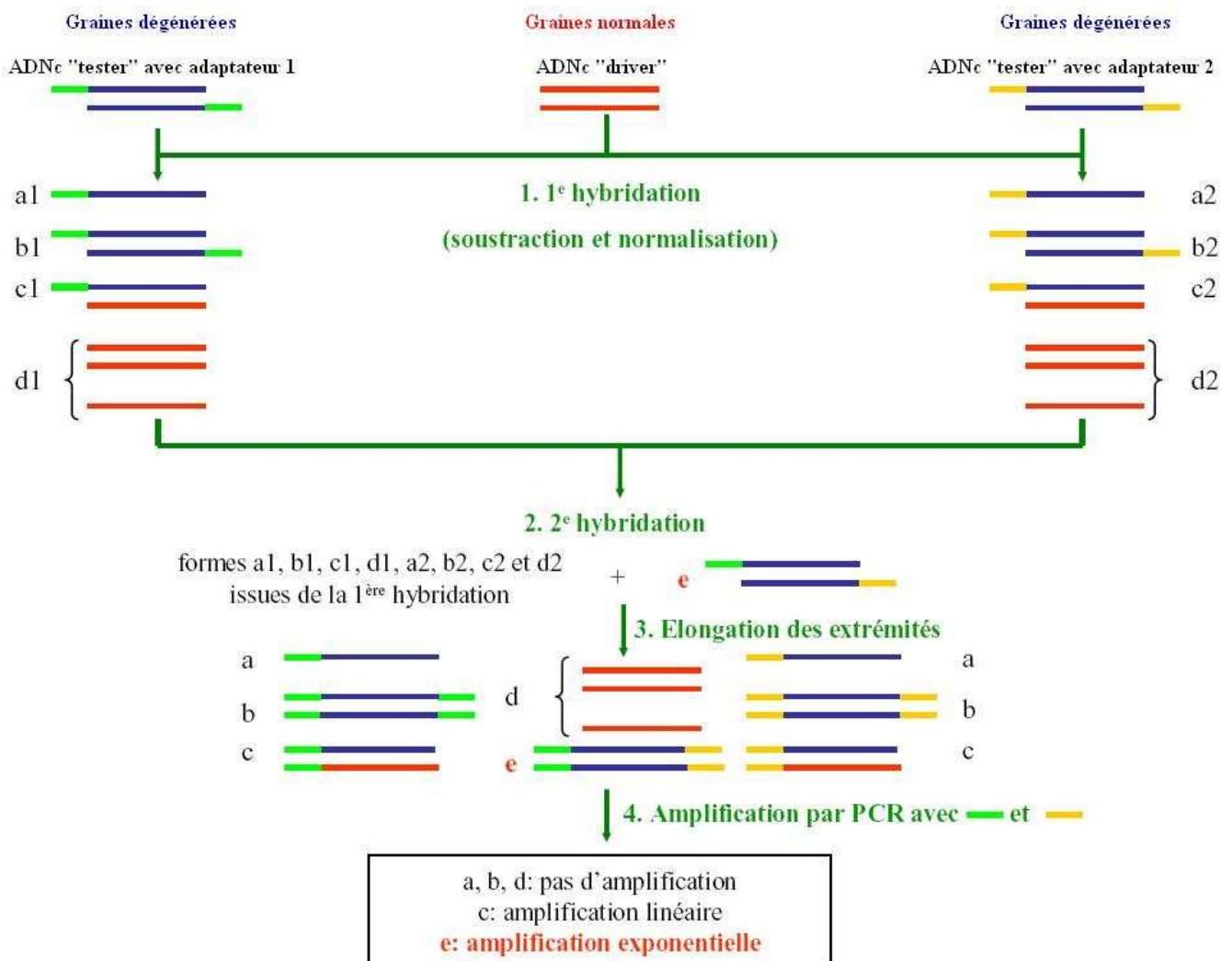


Figure 1 Principe de la technique SSH (Adapté de Ben, 2005)

2 Dot blot

La technique de la SSH permet d'isoler une population d'ADNc en principe spécifiques à la condition « tester ». Mais cette population peut contenir des faux-positifs. Afin de purifier cette population d'ADNc pour ne conserver que les ADNc spécifiques à la condition « tester », la technique de l'hybridation sur tache ou *dot-blot* peut être utilisée. C'est une technique d'hybridation moléculaire qui repose sur les propriétés physico-chimiques des acides nucléiques : la complémentarité des bases constitutives de l'ADN (A/T, G/C) et de l'ARN (A/U, G/C) ; la réversibilité du processus de séparation des deux brins d'une molécule d'ADN (dénaturation) et de réassociation des deux brins (renaturation) (Damier & Tagu, 2003). L'acide nucléique doit être extrait et immobilisé sur un support comme le nylon ou la nitrocellulose. L'hybridation moléculaire permet de repérer ou de rechercher une molécule d'ADN ou d'ARN spécifique dans une population hétérogène. Le principe est de marquer par un traceur radioactif ou chimique la séquence d'ADN connue et purifiée que l'on veut repérer dans une population. Ce fragment monocaténaire constitue la sonde. Les molécules cibles rendues monocaténaires (par dénaturation à 100°C) sont au préalable fixées sur une membrane d'hybridation en nylon ou en nitrocellulose. La sonde monocaténaire et la cible dénaturée (fixée sur membrane), donc également monocaténaire, sont mises en contact dans une solution dans des conditions permettant une hybridation. Lorsque la molécule sonde reconnaît son homologue dans la population de molécules cibles, il y a hybridation et l'hybride devient marqué par la présence de la sonde. Des lavages appropriés des membranes permettent d'éliminer alors toute hybridation non spécifique et de ne garder que les hybrides sonde/cible recherchés. Dans le cas d'un marquage radioactif, les hybrides sont repérés en plaçant la membrane au contact soit d'un film autoradiographique qui est ensuite développé comme un film photographique, soit d'un écran autoradiographique dont les signaux sont révélés par numérisation. Dans le cadre d'un marquage chimique, l'hybride moléculaire est souvent révélé par un test colorimétrique sur membrane. Dans le cadre du *dot-blot*, la sonde est constituée d'ADN alors que la cible peut être soit de l'ADN monocaténaire, soit de l'ARN. A la différence des techniques d'hybridation moléculaire de type *Southern blot* ou *Northern blot*, les acides nucléiques cibles ne sont pas séparés par électrophorèse. Ils sont directement déposés sur une membrane d'hybridation à une concentration connue sous forme de points (*dot*). Après hybridation entre la sonde et la cible, l'intensité de la tache radioactive obtenue reflète la concentration de l'acide nucléique étudié (sonde) parmi les acides nucléiques cibles (Damier & Tagu, 2003 ; Barbosa *et al.*, 2004).

3 Séquençage des acides nucléiques

Le séquençage de génomes consiste à identifier, base par base, le code génétique contenu dans une molécule d'ADN. Il existe plusieurs méthodes de séquençage, mais nous ne décrivons que les deux premières méthodes de base : la méthode chimique (Maxam & Gilbert, 1977) et la méthode enzymatique dite méthode de Sanger (Sanger *et al.*, 1977) (Pevzner, 2006).

La méthode chimique (Maxam & Gilbert, 1977) utilise des échantillons d'ADN double brin et ne nécessite donc pas le clonage de l'ADN dans un vecteur pour produire de l'ADN simple brin. Cette méthode est basée sur une dégradation chimique de l'ADN et utilise les réactivités différentes des quatre bases A, T, G et C, pour réaliser des coupures sélectives. En reconstituant l'ordre des coupures, on peut remonter à la séquence des nucléotides de l'ADN correspondant. On peut décomposer ce séquençage chimique en six étapes successives à savoir (i) Marquage : les extrémités des deux brins d'ADN à séquencer sont marquées par un traceur radioactif (^{32}P). Cette réaction se fait en général au moyen d'ATP radioactif et de polynucléotide kinase ; (ii) Isolement du fragment d'ADN à séquencer : celui-ci est séparé au moyen d'une électrophorèse sur un gel de polyacrylamide. Le fragment d'ADN est découpé du gel et récupéré par diffusion ; (iii) Séparation de brins : les deux brins de chaque fragment d'ADN sont séparés par dénaturation thermique, puis purifiés par une nouvelle électrophorèse ; (iv) Modifications chimiques spécifiques : les ADN simple-brin sont soumis à des réactions chimiques spécifiques des différents types de base. Maxam & Gilbert (1977) ont mis au point plusieurs types de réactions spécifiques, effectuées en parallèle sur une fraction de chaque brin d'ADN marqué : par exemple une pour les G (alkylation par le diméthyle sulfate), une pour les G et les A (dépurination), une pour les C et une pour les C et les T (hydrolyse alcaline). Ces différentes réactions sont effectuées dans des conditions très spécifiques, de sorte qu'en moyenne chaque molécule d'ADN n'est pas modifiée ou ne porte qu'une modification ; (v) Coupure : après ces réactions, l'ADN est clivé au niveau de la modification par réaction avec une base, la pipéridine ; (vi) Analyse : pour chaque fragment, les produits des différentes réactions sont séparés par électrophorèse et analysés pour reconstituer la séquence de l'ADN. La méthode de Maxam & Gilbert (1977) nécessite des réactifs chimiques toxiques et reste limitée quant à la taille des fragments d'ADN qu'elle permet d'analyser (<250 nucléotides) et est moins facile à automatiser (El Fahime & Ennaji, 2007).

L'autre méthode de séquençage, celle de Sanger est basée sur l'interruption de la synthèse enzymatique d'un brin d'ADN complémentaire (arrêt d'élongation). L'ADN à séquencer est cloné et de nombreuses molécules d'ADN simple brin sont produites. Une courte amorce d'oligonucléotides (synthétisée chimiquement) est ajoutée à l'ADN. Le point de fixation de l'amorce sert de point de départ pour la synthèse du brin complémentaire. La polymérase est alors ajoutée et le mélange est reparti dans 4 tubes différents. Les 4 nucléotides normaux dATP, dCTP, dGTP et dTTP dont un doit être marqué (radioactif ou fluorescent) et une faible concentration de 4 nucléotides analogues est ajoutée dans chacun des tubes. Les analogues sont des didésoxynucléotides (ddNTP) qui sont identiques aux nucléotides normaux sauf que les groupes hydroxyles (OH) des riboses sont remplacés par des hydrogènes (H). La polymérase ne peut pas distinguer ce substrat des nucléotides normaux. La synthèse du brin d'ADN complémentaire est initiée au niveau de l'amorce. L'intégration d'un didésoxynucléotide dans le brin synthétisé entraîne l'arrêt de l'élongation en raison de l'absence du groupement OH, nécessaire à l'extension. Les 4 incubations contiennent donc un mélange de molécules partiellement synthétisées d'ADN double brin marqué. La longueur des fragments d'ADN varie en fonction du point d'intégration du didésoxynucléotide. Comme cette intégration est aléatoire, l'ensemble des molécules dans un mélange représente l'ensemble des positions pour une base particulière. Les 4 mélanges sont analysés simultanément sur un gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes. Les bandes sont révélées par autoradiographie (cas des nucléotides radioactifs) ou par fluorescence (cas des nucléotides fluorescents) et la séquence est lue directement sur le gel (El Fahime & Ennaji, 2007 ; Monéger & Tagu, 2003).

La lecture des gels peut être automatique. Dans ce cas, le marquage des nucléotides se fait à l'aide de marqueurs fluorescents. Lors de la migration du gel, les échantillons sont détectés à leur sortie par un laser qui identifie la molécule marquée. Une adaptation de la technique de Sanger consiste à marquer l'amorce utilisée dans la réaction de séquence par un fluorophore (*Dye primer*, Fig. 2). La réaction est réalisée dans 4 tubes séparés, chacun contenant l'amorce couplée à un fluorophore en présence d'un ddNTP particulier correspondant. L'ADN polymérase utilisée pour la réaction est thermostable et la polymérisation se fait dans une machine de type PCR avec des cycles comprenant 3 étapes : dénaturation, hybridation et extension. En fin de réaction, les fragments d'ADN dénaturés sont séparés sur un gel de polyacrylamide ou une matrice d'électrophorèse capillaire. Les fragments d'ADN sont analysés automatiquement à la sortie du gel par un système laser permettant d'identifier le fluorophore (Monéger & Tagu, 2003).

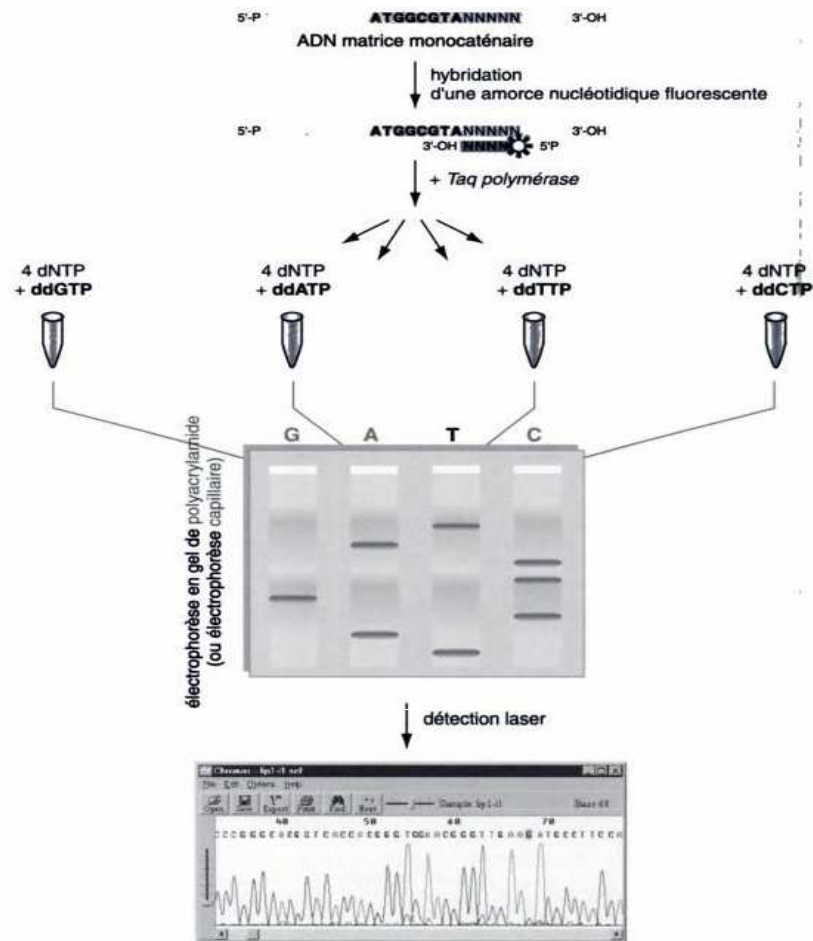


Figure 2 Principe de la méthode du *Dye primer* (amorce fluorescente) (Source : Monéger & Tagu, 2003)

Les résultats sont transférés sur un ordinateur et un programme informatique permet d'avoir accès au chromatogramme correspondant à la séquence (Monéger & Tagu, 2003 ; El Fahime & Ennaji, 2007).

4 Analyse des séquences

Quand on a cloné et séquencé un ou plusieurs gènes/cDNA, la première étape est souvent une recherche dans les bases de données publiques pour savoir si les séquences sont déjà connues (mutations éventuelles), si des séquences proches existent et quelles sont les informations déjà connues sur ces séquences similaires. On peut également souhaiter trouver toutes les séquences d'une même famille et rechercher toutes les séquences qui contiennent un motif donné. Pour cela, on utilise des programmes d'alignement de séquences et le programme

d'alignement le plus utilisé par les biologistes est le logiciel BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, Altschul *et al.*, 1990 ; 1997) du NCBI. Son principe de fonctionnement est le suivant : on entre la séquence étudiée et BLAST l'aligne contre l'ensemble des séquences contenues dans la base de séquences sélectionnée. Le logiciel nous donne en sortie les séquences ayant une certaine homologie avec la séquence de départ. Ces homologues peuvent être classés en orthologues et en paralogues. Deux protéines sont dites orthologues si elles appartiennent à la même famille fonctionnelle mais trouvées dans des organismes différents. Deux protéines sont dites paralogues si elles appartiennent à la même famille fonctionnelle et trouvées au sein d'un même organisme (Pearson & Lipman, 1988).

Il existe plusieurs programmes BLAST possibles dont les principaux sont : BLASTN qui compare une séquence de nucléotides soumise à une base de données de séquences de nucléotides ; BLASTP qui compare une séquence de protéine soumise à une base de données de séquences de protéines ; BLASTX qui compare une séquence de nucléotides soumise après traduction dans toutes les phases de lecture à une base de séquences de protéines. Cette option peut servir aussi à trouver les produits de traductions possibles d'une séquence de nucléotides inconnue ; TBLASTN qui compare une séquence de protéine soumise à une base de données de séquences de nucléotides traduites dynamiquement dans toutes les 6 phases de lecture ; TBLASTX qui compare les traductions dans 6 phases d'une séquence de nucléotides soumise à une base de données de traductions dans 6 phases de séquences de nucléotides.

Il existe actuellement trois banques généralistes principales, publiquement accessibles via internet. EMBL -European Molecular Biology Laboratory- est créé en 1980 à Heidelberg en Allemagne et est gérée par L'EBI -European Bioinformatic Institute- (Baker *et al.*, 2000). GenBank est mise en place aux Etats-Unis en 1979 au LANL -Los Alamos National Laboratory- et est gérée depuis 1992 par le NCBI -National Center for Biotechnology Information- à Bethesda (Benson *et al.*, 2000). La DDBJ -DNA Data Bank of Japan- est une banque qui a débuté son activité en 1984. Elle est gérée par le NIG -National Institute of Genetics- à Mishima (Tateno *et al.*, 2000).

Pour qualifier et quantifier la similitude entre séquences, un score est calculé. Ce score résulte de la somme des scores élémentaires calculés sur chacune des positions en vis à vis des deux séquences dans leur appariement optimal. C'est le nombre total de "bons appariements" pénalisé par le nombre de "mésappariements". Un mésappariement peut être la substitution d'un caractère par un autre (mutation) ou l'introduction d'un "gap" (trou, indel). Le gap permet d'optimiser l'alignement entre les deux séquences, donc de faire coïncider le maximum de caractères communs. Biologiquement, le gap matérialise alors une insertion (ou une délétion).

Le score élémentaire est un élément d'une matrice (Fig. 3) de scores qui rend compte de tous les états possibles en fonction de l'alphabet utilisé dans la description des séquences.

	A	C	G	T
A	1	0	0	0
C	0	1	0	0
G	0	0	1	0
T	0	0	0	1

Matrice unitaire

	A	C	G	T
A	3	0	1	0
C	0	3	0	1
G	1	0	3	0
T	0	1	0	3

Matrice avec 3 scores possibles : 3 pour l'identité, 1 pour la transition et 0 pour la transversion

Figure 3 Matrices utilisées lors des alignements de séquences

Ainsi, pour les acides nucléiques, la matrice unitaire est principalement employée. Elle rend compte de l'identité des résidus pour chacune des positions de la comparaison, on parle ainsi de bonne ou de mauvaise association. Ce critère qui permet déjà d'établir des ressemblances ne suffit pas toujours pour révéler au mieux les similitudes entre séquences. Très rapidement, on s'est aperçu qu'une insertion ou une délétion d'une ou plusieurs bases pouvait améliorer le score d'une comparaison et ainsi faire davantage ressortir les zones identiques ou très proches. Ces brèches, appelées gap, que l'on impose aux séquences sont évidemment pénalisantes dans le calcul du score. Si l'on considère que le score donne le rapprochement entre deux séquences, on peut résumer celui-ci par l'équation suivante : $\text{Score} = \sum se - \sum sp$, où « se » est un score élémentaire, « sp » une pénalité d'insertion ou de délétion et « Σ » la somme. Le score est fonction de la longueur de la zone de similitude que l'on considère : plus la longueur est grande, plus le score est élevé. Le calcul peut-être nuancé en donnant plus ou moins d'importance aux pénalités et aux associations possibles entre résidus. Ainsi, le poids d'une insertion peut être plus ou moins fort par rapport à une mauvaise association. Par conséquent, on pourra privilégier une situation plutôt qu'une autre, c'est-à-dire avoir des comparaisons de séquences avec peu ou beaucoup d'insertions-délétions (States *et al.*, 1991). Le résultat de BLAST classe des résultats de similitude en fonction d'un indice de significativité appelée *E-value* (valeur attendue), le résultat le plus significatif étant le premier de la liste. D'autre part la *E-value* ne mesure pas directement la distance en termes d'évolution entre deux séquences homologues. La *E-value* mesure la probabilité que le score observé soit dû au hasard. De façon formelle, la *E-value* est le nombre d'alignements différents ayant le

même degré de similitude, et que l'on peut espérer trouver par hasard, s'il n'existait pas de vraie séquence similaire dans la base de données (Gibrat & Marin, 2004 ; Gibson & Muse, 2004). Une *E-value* élevée (5 ou 10) indique que l'alignement est probablement dû au hasard et que la séquence requête a été alignée avec une séquence qui ne lui est pas apparentée dans la banque de données. Des *E-values* de 0,1 ou 0,05 sont utilisées typiquement comme valeurs seuils lors des recherches dans des banques de données de séquences. Le recours à une *E-value* élevée lors d'une recherche dans une banque de données permet de trouver des correspondances plus éloignées mais augmente le taux d'alignements équivoques (Gibas & Jambeck, 2002). La *E-value* dépend d'une façon importante de la longueur des deux séquences comparées. Ainsi, si l'on compare deux petites séquences ayant 90% de résidus conservés et deux autres beaucoup plus grandes ayant 30% de résidus conservés on peut très bien avoir des *E-values* voisines bien que l'on puisse penser que les deux séquences ayant 90% de résidus conservés sont plus proches que les deux séquences ayant 30% de résidus identiques (Gibson & Muse, 2004).

Chapitre III : Genes involved in *Phaseolus* embryogenesis

Ce chapitre fut l'objet d'un article publié dans la revue *Genes, Genomes and Genomics* 1 (2), 180-192 (2007)

Invited Review

Souleymane Silué¹, Jean-Marie Jacquemin² and Jean-Pierre Baudoin¹

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

² Centre Wallon de Recherches Agronomiques, Département de Biotechnologie Chaussée de Charleroi, 234 BE-5030 Gembloux, Belgium

E-mail: baudoin.j@fsagx.ac.be

Abstract

Within the genus *Phaseolus*, the common bean, *Phaseolus vulgaris* L., is the most important species widely distributed in the world and occupies more than 90% of production areas sown to *Phaseolus* species. Interspecific hybridization in the genus *Phaseolus*, with the aim to introgress desired traits to the common bean, leads to the abortion of immature embryos usually at the globular or early heart-shaped developmental stages. Plant zygotic embryogenesis is controlled by many genes and malfunction of these genes can disrupt embryo formation. In this paper, we reviewed some of these genes i.e. *KNOX*, *BELLI*, *LEUCINE ZIPPER*, *PHD-FINGER*, *GLABRA2*, *WUSHEL*, *HEAT SHOCK PROTEIN*, *LIPID TRANSFER PROTEIN*, *PASTICCINO*, *LEAFY COTYLEDON* and *TITAN*, from model plants such as *Arabidopsis thaliana*, *Zea mays*, *Oryza sativa*, *Medicago truncatula*, *Solanum lycopersicum*. This study helps us to identify the genes involved in *Phaseolus* embryogenesis and to verify their expression in ovules at different steps of embryos development.

Keywords: common bean, embryo abortion, embryo development, genes, model plants

1 Introduction

The common bean, *Phaseolus vulgaris* L., is the most important species widely distributed in the world and occupies more than 90% of production areas sown to *Phaseolus* species (Baudoin *et al.* 2001). Its dry seeds are a major component in the diet of human populations in Latin America, as well in Central and East Africa. Legumes usefully complement cereal seeds in the nutritional value of daily diet, mainly because of their protein and amino acid contents. *P. vulgaris* is adapted to several cropping systems, particularly in association with other food crops like maize, sorghum or pearl millet. In tropical regions, the common bean is characterized by low and unstable seed yield. This is mainly due to the susceptibility of this crop to numerous pests and diseases: more than 200 pathogens have been reported attacking beans, some of them causing considerable economic losses (Graham and Ranalli 1997; Singh 1999). Another constraint limiting yield is the lack of improved varieties tolerant to abiotic stresses (poor soil, high temperature, drought, etc.). Agronomists and breeders have not found sufficient genetic variability within the primary gene pool of *P. vulgaris*. However, the alien gene pools offer very good breeding potentialities (Debouck and Smartt 1995; Debouck 1999; Baudoin 2001; Broughton *et al.* 2003). This is particularly the case of the two species *P. coccineus* L. and *P. polyanthus* Greenm., which show interesting traits not, or only poorly, expressed in the primary gene pool of *P. vulgaris*, such as resistance to two diseases Ascochyta blight and *Bean Golden Yellow Mosaic Virus* (BGYMV). Ascochyta blight is caused by *Phoma exigua* Desmaz. var. *diversispora* (Bubak) Boerema and prevails in highland areas. The symptoms include black or brown concentric lesions on leaves and pods, as well as collapsed and black nodes, petioles, and stems (Schwartz *et al.* 1981; Hanson *et al.* 1993). BGYMV is economically important in Latin America, and is caused by a geminivirus transmitted by whiteflies of the genus *Bemisia*. Disease symptoms include intense yellowing, mosaic, stunting, and distortion of leaves and pods (Markham *et al.* 1994; Bracero *et al.* 2003). The extensive genetic variability of the pathogens requires the constant development of new resistant cultivars in common bean. Breeders take benefit of the interspecific hybridizations between the recurrent species, *P. vulgaris*, and the two donor species: *P. coccineus* and *P. polyanthus*, belonging to the secondary gene pool of the common bean. Indeed, different sources of resistance to these two diseases have been identified among these two donor species (Hanson *et al.* 1993; Bianchini 1999; Beaver *et al.* 2005). In addition, other desired traits can be found from these two taxa, such as cold tolerance, long multi-nodded

inflorescences, and thick stems (Camarena 1988; Schmit & Baudoin 1992; Baudoin *et al.* 2001).

In the interspecific hybridizations between *P. vulgaris* and the two donor species, the use of *P. vulgaris* as a female parent increases the percentage of successful hybrids but, unfortunately, the presence of *P. vulgaris* cytoplasm provokes a quick reversal to the recurrent species, at the expense of the donor species (Baudoin 2001). Reciprocal crosses, a condition favouring the introgression of desired genes to the common bean, avoid the reversal process showed above, but are more difficult to succeed. Indeed, these crosses lead to abortion of immature embryos, usually at the globular or early heart-shaped developmental stages, with most embryos aborting 3-8 days after pollination, 79% for the crosses *P. polyanthus* × *P. vulgaris* and 84% for the crosses *P. coccineus* × *P. vulgaris* during trials conducted under greenhouse in Gembloux Agricultural University (Baudoin *et al.* 2004). Early interspecific embryo abortion is attributed to several factors such as nutritional barriers related to a deficient endosperm or suspensor development, endothelium proliferation and, in some extent, hypertrophy of the vascular elements (Lecomte 1997; Geerts 2001; Toussaint *et al.* 2004). Plant zygotic embryogenesis is controlled by many genes and their malfunction can disrupt interspecific embryos formation. Transcripts of these genes can be localized in the embryo proper, in endosperm or in maternal tissues around the embryo (Raghavan 1997).

In this paper, we review some of these genes involved in model plants embryogenesis, such as *KNOX*, *BELLI* (*BEL*), *LEUCINE ZIPPER* (*HD-ZIP*), *PHD-FINGER*, *GLABRA2* (*HD-GL2*), *WUSHEL* (*WUS*), *HEAT SHOCK PROTEIN* (*HSP*), *LIPID TRANSFER PROTEIN* (*LTP*), *PASTICCINO* (*PAS*), *LEAFY COTYLEDON* (*LEC*) and *TITAN* (*TTN*) genes. Alignment and comparison of the sequences from different species help us to design DNA primers targeting conserved domains of these genes, to isolate related genomic sequences from *Phaseolus* by PCR, and to verify the expression of these genes at different steps of *Phaseolus* embryos development.

2 Plant embryogenesis and gene expression

Fertilization and embryogenesis are the first stages in the development of new life in both animals and plants. In early dicot embryogenesis, cell division occurs regularly. The first transverse division is asymmetric, which gives rise to one smaller apical cell and one larger basal cell. The smaller apical cell will form most of the embryo proper, and the larger basal cell will develop into the suspensor. The suspensor anchors the embryo to the endosperm and

serves as a conduit for nutrients and growth factors for the developing embryo. The smaller apical cell (the embryo proper) divides longitudinally twice and transversely once, and results in an eight-cell embryo (Goldberg *et al.* 1994; Laux and Jürgens 1997; Rademacher and Weijers 2007). Early embryogenesis in monocots differs from that of dicots mainly in the two following ways: first, cell division occurs randomly; and second, the protodermal cell layer is not morphologically formed until the embryo size reaches more than 100 μm in length (more than 200 cells). This means that the period leading up to organ differentiation, including protoderm differentiation, is much longer than that in dicots. Further cell divisions lead to the globular stage. The three basic tissue systems (dermal, ground, and vascular) can be recognized at this point based on characteristic cell division patterns. The globular shape of the embryo is then lost as the cotyledons (embryonic leaves) begin to form. The formation of two cotyledons in dicots gives the embryo a heart-shaped appearance, while in monocots only a single cotyledon forms. Upright cotyledons can give the embryo a torpedo shape, and at this time the suspensor is degenerating while the shoot apical meristem and root apical meristem (SAM and RAM) are established. At this stage, embryogenesis is arrested, the mature seed dries and remains dormant until germination. The meristems will give rise to the adult structures of the plant upon germination (Steeves and Sussex 1989; Harada 1997; Laux and Jürgens 1997; Weijers and Jürgens 2005).

In higher plants the embryo passes through four developmental stages after fertilization (Umehara *et al.* 2007). The globular stage is the pattern formation, in which the axis of the plant body is defined, tissue layers organized, and earliest organs established. The heart stage is the cell diversification and specification phase, in which cell types such as the suspensor, provascular tissue, shoot and root meristems are defined. The torpedo stage is growth and morphogenesis, in which cells become expanded. During the last process, the embryo enters into maturation, in which cell division is completed, embryo storage reserves as proteins, starch, and lipids accumulate and the embryo acquires dormancy and desiccation. The first three stages occur concurrently in the developing embryo and are also known as early embryogenesis, while maturation is a distinct process that begins later in embryogenesis (West and Harada 1993; Harada 1997; Berleth and Chatfield 2002). The plant body is the basis of the future plant, controls the three next phases and consists of two superimposed patterns: apical-basal pattern along the main axis of the plant, and radial pattern of concentrically arranged tissue systems.

Seed development in higher plants such as *Arabidopsis* requires coordinated differentiation of the embryo proper, suspensor, endosperm tissue, and seed coat. Plant embryos are

morphologically simple, but molecularly complex. Many genes must be expressed as the zygote divides in a regulated manner, completes morphogenesis, and differentiates into a mature embryo capable of surviving desiccation and producing a viable plant (McElver *et al.* 2001). Interactions between these components have been explored in part through the analysis of embryo-defective mutants in *Arabidopsis* (Meinke 1995). These recessive mutants have been recovered either by screening immature siliques for abnormal seeds (Meinke 1994) or by screening at the seedling stage for defects indicative of a disruption of normal embryogenesis (Jürgens *et al.* 1994) or through forward genetic screens of T-DNA insertion lines (McElver *et al.* 2001). These genes show temporal as well as spatial patterns of gene expression during seed development. The stage-specific cDNAs have been used as markers of cell differentiation and to follow the normal development of the embryos (Jofuku and Goldberg 1989; Elster *et al.* 2000; Bommert and Werr 2001). Gene products identified to date include a wide array of metabolic enzymes (Lukowitz *et al.* 2001), transcription factors (Lotan *et al.* 1998), chloroplast and mitochondrial proteins (Apuya *et al.* 2001), and proteins required for vesicle trafficking (Rojo *et al.* 2001). From the frequency at which embryo-lethal mutants appear in *Arabidopsis*, many genes are required for normal embryogenesis; however, only ten percent of them affect pattern formation in embryogenesis. A vast number of genes represented by embryo-lethal mutants may be required for normal embryogenesis, but they may not be master regulators of the process (Howell 1998). However Franzmann *et al.* (1995) and McElver *et al.* (2001) identified and analyzed a large number of embryo-lethal mutants in *Arabidopsis*. They estimated that 750 genes can be easily mutated to give an embryo lethal phenotype. On the other side, Tzafrir *et al.* (2004) showed that 250 genes control distinct phenotypes and are essential to have a normal phenotype during *Arabidopsis* seed development.

In the next sections, some of these genes involved in plant embryogenesis are discussed. Focus is made on their characteristics, roles and expression patterns during plant embryogenesis, as well on their relationships.

3 Homeobox genes

Homeotic genes are important regulatory genes in the specification of cell fate and body plan at the early stage of embryogenesis in higher organisms (Gehring and Hiromi 1986; Yang *et al.* 2002). Initially identified in *Drosophila* (McGinnis *et al.* 1984) as a single gene mutation capable of altering the identity of complex morphological structures, homeotic genes have

been isolated and characterized from a wide range of animal and plant species (Chasan 1992; Gehring 1992). A common feature of many homeotic genes of both plants and animals is a conserved nucleotide sequence known as the homeobox which encodes the homeodomain (HD). The HD consists of an approximately 60 amino acids with a helix-turn-helix structure conferring a specific DNA binding function (Kissinger *et al.* 1990).

Plant homeoboxes were discovered at the beginning of the nineties, and the first family of homeobox genes reported in plant species was *KNOX* (*KNOTTED1*-like homeobox), isolated from maize, which is involved in leaf development (Vollbercht *et al.* 1991). Subsequent to the cloning of the *KNI* gene from maize, using library screening with previously identified gene or degenerate oligonucleotides deduced from HDs as probes or primers, differential screening, mutant based cloning, etc., many plant homeobox genes have been isolated from various plant species: *Arabidopsis* (Carabelli *et al.* 1993; Söderman *et al.* 1999; Western and Haughn 1999; Hanson *et al.* 2001; Johannesson *et al.* 2001), parsley (Korfhage *et al.* 1994), rice (Sato *et al.* 1996; Sato *et al.* 1998; Postma-Haarsma *et al.* 1999; Sentoku *et al.* 1999; Ito *et al.* 2002; Yang *et al.* 2002), apple (Watillon *et al.* 1997; Dong *et al.* 2000), wheat (Takumi *et al.* 2000), soybean (Ma *et al.* 1994; Moon *et al.* 1996), tomato (Tornero *et al.* 1996), tobacco (Nishimura *et al.* 1999, 2000), Norway spruce (Sundas-Larsson *et al.* 1998; Hjortswang *et al.* 2002; Ingouff *et al.* 2003), *Phaleonopsis* (Nadeau *et al.* 1996).

Based on amino acid sequence similarities within the homeodomain and the presence of additional distinctive domains outside the HD, plant homeobox genes can be grouped into several families (Chan *et al.* 1998; Ito *et al.* 2002a): the homeodomain *LEUCINE ZIPPER* (*HD-ZIP*) family characterized by a leucine zipper dimerization motif adjacent to the homeodomain (Söderman *et al.* 1999; Tang *et al.* 2001), the plant homeodomain *FINGER* (*PHD-FINGER*) family distinguished by a conserved cysteine-rich motif (Überlacker *et al.* 1996; Yang *et al.* 2003), the family of *Arabidopsis* *GLABRA2*-like (*HD-GL2*, known as *HD-ZIP IV*) proteins (Lu *et al.* 1996; Ito *et al.* 2002b), the family of maize *KNOX* proteins (Vollbercht *et al.* 1991; Bowman and Eshed 2000), the family of *BELLI* (*BEL*) HD protein (Dong *et al.* 2000; Becker *et al.* 2002), and the family of *WUSHEL* (*WUS*) HD protein (Brand *et al.* 2002; Haecker *et al.* 2004). Within each family, several defined groups can be distinguished, each comprising proteins from different species (including monocot and dicot). The involvement of homeobox genes in plant embryogenesis has been reported in several studies (Schena and Davis 1992; Ma *et al.* 1994; Sato *et al.* 1996; Ito *et al.* 2002a, 2002b; Haecker *et al.* 2004). In order to follow the normal development of the embryo proper, such genes are often used as molecular markers to study their cellular expression pattern during

embryogenesis in wild-type and mutant embryos, using different techniques such as *in situ* hybridization, cDNA libraries screening, southern and northern blots analysis, RT-PCR reactions. Plant homeobox genes, by analogy of the functional roles of animal homeobox genes, have been expected to encode transcriptional regulators that mediate important developmental processes during embryogenesis (Sato *et al.* 1998; Dong *et al.* 2000; Elster *et al.* 2000; Bommert and Werr 2001; Yang *et al.* 2002).

3-1 KNOX genes

As specified above, *KNOX* genes have been the first homeobox gene family identified in plant species and is the most extensively characterized gene family. These genes have been shown to be involved in meristem formation and maintenance in maize, rice and barley among the monocots (Kerstetter *et al.* 1997; Bowman and Eshed 2000). Studies revealed that the shoot apical meristem (SAM) is formed during embryogenesis, and after seed germination it continuously generates various organs and tissues, such as leaves, stems and flowers, throughout plant life (Steeves and Sussex 1989; Vollbrecht *et al.* 2000; Hake *et al.* 2004; Belles-Boix *et al.* 2006). Based on comparative analysis of the *KNOX* HD, this family has been subdivided into class 1 and class 2 which are 73-89% and 55-58% identical to maize *KN1* respectively. Figure 4 shows the alignment of deduced amino acid sequences of *KNOX* genes from maize (Vollbrecht *et al.* 1991), pea (Hofer *et al.* 2001), rice (Matsuoka *et al.* 1993), *Medicago truncatula* (Koltai *et al.* 2001), soybean (Ma *et al.* 1994) and *Arabidopsis thaliana* (Lincoln *et al.* 1994). The class 1 genes studied are mainly expressed in the SAM but not in lateral primordia, and some loss-of-function mutations affect meristem formation and/or maintenance. Two locations of expression patterns of the class 1 genes in the SAM have been identified: at the center of the meristem dome and at the base of leaf primordia (Reiser *et al.* 2000). Furthermore, all class 1 genes analyzed caused dramatic alteration of leaf morphology when ectopically expressed (Hake *et al.* 1995; Long *et al.* 1996). These results indicate that the class 1 genes play important roles in SAM. In contrast, the class 2 genes studied show more diverse expressions and are found not only in the SAM but also in differentiated organs such as roots, leaves and flowers. Ectopic expression of class 2 genes does not cause altered morphology (Serikawa *et al.* 1996, 1997; Sentoku *et al.* 1998).

```

M_trunc : NSTNNNNHYTNC--NNNTSSIMLQNH---QNTPLGLGYFFMD-----NINNHGSSSSSSSSSVKSKIMAHPHYHRL : 137
P_sat   : NSTNNNN-HYTN---NNNSNNTMLONHHTTQNTPLGLGYFFMD-----NHNHNGASSSSSSSAVKAKIMAHPHYHRL : 127
G_max   : NSTGTPSIMLHN---NHNHNNKTDDDNN---NNTPLGLGYFFMESHDDHHHHGNNNNNGSSSSSSSSAVKAKIMAHPHYHRL : 137
O_sat   : LTLNLTAAAA-----VGNPVLQLANG-----SLLDACGKAK-----EASASAS-YAPDVEAIKAKIISHPHYSSL : 117
Z_mays  : LTLNLTVAATGNS--GGSGNPVLQLANG-----GLLDACVKAK-----EPSSSSP-YAGDVEAIKAKIISHPHYSSL : 117
A_thal  : QTEHCNFRSDHDQPNNNNNPSVKSEASSSRINHYSMLMRAIHNTQ-----EANNNNNDNVSDVEAMKAKIISHPHYSSL : 147

```

```

M_trunc : LEAYINCQKVGAPSEVVARLEEEACATAVRMGG--DAVESGCLGEDPALDQFMEAYCEMLTKYEQELSKPLKEAMLFQRIE : 216
P_sat   : LEAYINCQKVGAPSEVVTRELEACASAVRMGG--DAVESGCGIGEDPALDQFMEAYCEMLTKYEQELSKPLKEAMLFQRIE : 206
G_max   : LAAYVNCQKVGAPSEVVARLEEEACASAATMAGGDAAS--SSCIGEDPALDQFMEAYCEMLTKYEQELSKPLKEAMLFQRIE : 218
O_sat   : LAAYLDCQKVGAPPEVAARLT-EVAQDLELR-QRTALGVLGAATEPELDQFMEAYHEMLVKYREELTRPQEAMPELRRVE : 196
Z_mays  : LEAYLDCQKVGAPPEVVARLT-EIAQEVPEAR-QRTALGGLAAATEPELDQFMEAYHEMLVKFREELTRPQEAMPELRRVE : 196
A_thal  : LEAYLDCQKIGAPPEVVDRLT-EARQDFEARQRSTPSVSASSRDEPELDQFMEAYCEMLTKYREELTRPQEAMPELRRVE : 227

```

KNOX Domain

```

M_trunc : VQFKNLTVSSSSDNIACSEGGDRNGSSEEDHVDLYNN----MIDPQAEEDRLKGLLRKYSGYLGSLSKQEFMKRKKKGL : 292
P_sat   : VQFKNLTVSSSSDNIACNEGGDRNGSSEEDQVDLYNN----MIDPQAEEDRLKGLLRKYSGYLGSLSKQEFMKRKKKGL : 282
G_max   : CQFKNLTVSS--DFASNEGGDRNGSSEED-VDLHN----MIDPQAEEDRLKGLLRKYSGYLGSLSKQEFMKRKKKGL : 290
O_sat   : TQLNLTLSISGRSLRNILSS----GSSEEDQEG-SGGETELPEIDAHGVDQELKHHLLKYSGYLSSLSKQELSKKKKKGL : 271
Z_mays  : SOLNSLISGRSLRNILSS----GSSEEDQEG-SGGETELPEVDAHGVDQELKHHLLKYSGYLSSLSKQELSKKKKKGL : 271
A_thal  : SOLSMICQSPHILNPNPDGKSDNMGSSEEDQEGENNSGGETELPEIDPRAEEDRLKHHLLKYSGYLSSLSKQELSKKKKKGL : 308

```

ELK Domain

```

M_trunc : PKEARQQLLEWWSRHYKWPYPSESQKLALABSTGLDQKQINNWFINQRKRHWKPSDDMQFVVMDBSHPHYMDNVLTNSV : 373
P_sat   : PKEARQQLLEWWSRHYKWPYPSESQKLALABSTGLDQKQINNWFINQRKRHWKPSDDMQFVVMDBSHPHYMDNVLTNSV : 363
G_max   : PKEARQQLLEWWSRHYKWPYPSESQKLALABSTGLDQKQINNWFINQRKRHWKPSDDMQFVVMDBSHPHYMDNVLTNSV : 371
O_sat   : PKDARQQLLEWWSRHYKWPYPSESQKVALABSTGLDLKQINNWFINQRKRHWKPSDDMQFVVMDBYHPTNAAAFYMDGHE : 352
Z_mays  : PKEARQQLLEWWSRHYKWPYPSETQKVALABSTGLDLKQINNWFINQRKRHWKPSDDMHLLMMDGYHTN--AFYMDGHE : 350
A_thal  : PKEARQQLLEWWSRHYKWPYPSESEKVALABSTGLDQKQINNWFINQRKRHWKPSDDMQFVVMDBLQHPHHAALYMDGHE : 389

```

HomeoDomain

```

M_trunc : MDLSNTML~ : 381
P_sat   : MDLSNTML~ : 371
G_max   : MDLSHEML~ : 379
O_sat   : NDGGLYRLG~ : 361
Z_mays  : NDGGLYRLG~ : 359
A_thal  : GDG-PYRLGP : 398

```

Figure 4 Alignment of deduced amino acid sequences of KNOX genes of *Zea mays* (Z_mays, KN1 X61308), *Pisum sativum* (P_sat, AF080104), *Orizy sativa* (O_sat, D16507), *Medicago truncatula* (M_trunc, AF308454), *Glycine max* (G_max, L13663) and *Arabidopsis thaliana* (A_tha, ATU14174).

The first plant homeobox gene shown to be involved in embryogenesis was *SHOOT MERISTEMLESS (STM)* isolated from *Arabidopsis thaliana* (Long *et al.* 1996; Groß-Hardt and Laux 2003). Embryos of *stm* mutants lack the capacity to form a shoot meristem, whereas other embryonic organs, for example cotyledons, hypocotyl and radicle, develop normally. *STM* belongs to class 1 of the *KNOX* gene family and is expressed in the SAM during embryogenesis (Tsiantis and Hay 2003; Hay *et al.* 2004; Belles-Boix *et al.* 2006). The *KNOX* gene *SOYBEAN HOMEBOX1 (SBHI)* is expressed during soybean somatic embryogenesis (Ma *et al.* 1994). The deduced *SBHI* protein shares a high amino acid identity with maize *KN1* protein (47.00% overall and 87.50% for the homeodomain). The expression of *SBHI* is development- and tissue-specific. The transcript of *SBHI* was present in early-stage somatic embryos, increased prior to cotyledon formation and decreased thereafter. *SBHI* was weakly expressed in soybean stems and hypocotyls but was not detected in other plant tissues and nonembryogenic materials. In rice, members of the *KNOX* gene family are differentially

expressed during embryogenesis. Sato *et al.* (1996) examined the spatial and temporal expression patterns of rice homeobox gene, *OSHI*, during rice embryogenesis. They showed that *OSHI* expression was first detected in a specific ventral region of globular embryo. This indicates that the cellular differentiation at the gene expression level has already occurred at this stage and it is plausible that *OSHI* may play an important role in the cellular differentiation preceding organ formation. Considering the possibility that the putative *in vivo* function of *OSHI* is a *trans*-acting factor, *OSHI* may function as a regulator switching on and off the developmental program of embryonic cells located in a specific region. With the advancement of embryonic maturation, the expression level of *OSHI* is reduced. The down-regulation of *OSHI* expression at later stages suggests that its primary function resides in the early embryogenesis. This result also suggests a possibility that the main function of *OSHI* in embryo is to establish cellular identity in the ventral region at the globular stage. Once the ventral identity is established then, the organogenesis is started; *OSHI* may finish its function early during embryogenesis with a decrease in its expression level. Sentoku *et al.* (1999) showed that all or some of the rice *OSH* homeobox genes may be involved in regionalization of the shoot area and/or the establishment of the SAM itself before shoot formation occurring early in embryogenesis. After shoot formation, however, the functions of the homeobox genes appear to differ. Some of these genes may maintain SAM activity in an indeterminate condition through continuous expression in the SAM, whereas others may be involved in pattern formation of the segmental units of the plant body and/or internodes development. Pre-patterning of specific cells by the expression of homeobox genes before morphological organ formation is the same as in organ formation during animal embryogenesis. Even though the body structures of plants and animals are quite different, there may be some common mechanisms in organ establishment and development in terms of homeobox function. Comparing the pattern expression of *KNOX* (*KN1*) gene in maize wild-type and mutant embryos, Bommert & Werr (2001) detected no *KN1* transcripts in *emb**-8518 and *emb**-8521 embryos between 15 and 30 DAP. *KN1* amplicons are detected in wild-type embryos, but are missing in the two mutants. These results revealed that both mutants are arrested before establishment of a functional SAM. Recently, Belmonte *et al.* (2007) pointed out that *HBK3*, a *KNOX* class I gene, improves the development of Norway spruce (*Picea abies*) somatic embryos. Indeed, in lines overexpressing *HBK3* (*HBK3-S*), somatic immature embryos showed enlarged embryogenic heads and were able to produce fully developed cotyledonary embryos at higher frequency. Furthermore, *HBK3-S* embryos had enlarged shoot apical meristems (SAMs). Lines in which *HBK3* was down-regulated (*HBK3-A*) had reduced

ability to produce immature somatic embryos and were not able to complete the whole maturation process. Overall, these data confirm the importance of *KNOX* genes during development.

3-2 BELL1 (BEL) genes

The BEL family is another plant homeobox gene family that is closely related to the *KNOX* genes (Bürglin 1997; Chan *et al.* 1998; Becker *et al.* 2002). *BEL* transcription factors are essential for inflorescence and fruit development (Dong *et al.* 2000; Byrne *et al.* 2003; Roeder *et al.* 2003; Smith and Hake 2003; Bao *et al.* 2004; Bhatt *et al.* 2004; Smith *et al.* 2004). Based on genetic studies, an *Arabidopsis* *BEL* gene *PENNYWISE* (*PNY*) is involved in regulating early internode patterning events and is also necessary for replum development during fruit maturation (Byrne *et al.* 2003; Roeder *et al.* 2003; Smith and Hake 2003; Bao *et al.* 2004; Bhatt *et al.* 2004; Kanrar *et al.* 2006). Genetic analysis of *BEL* in *Arabidopsis* showed that expression of this transcription factor regulated the development of ovule integument. The loss-of-function phenotype of *bel* mutant ovules indicates that determination of integument initiation and organ identity is controlled by expression of the *BEL* homeobox gene. *BEL* appears to interpret positional information and control morphogenesis of the integuments through the regulation of genes within the chalazal domain (Robinson-Beers *et al.* 1992). In *bel* mutant ovules, the inner integument fails to form, the outer integument develops abnormally, and the embryo sac arrests at a late stage of megagametogenesis. During later stages of ovule development, cells of the outer integument of a *bel* ovule sometimes develop into a carpel-like structure with stigmatic papillae and second-order ovules. The frequency of carpel-like structures was highest when plants were grown under conditions that normally induced flowering and was correlated with ectopic expression in the ovule of *AGAMOUS* (*AG*), an organ-identity gene required for carpel formation (Modrusan *et al.* 1994). The *BEL* gene family was identified in several plants such as tomato (Ron *et al.* 2001, Direct Submission, accession number: AF375964), potato (Chen *et al.* 2003), *Arabidopsis* (Reiser *et al.* 1995), apple (Dong *et al.* 2000), barley (Muller *et al.* 2001) and *Gnetum gnemon* (Becker *et al.* 2002).

3-3 LEUCINE ZIPPER (HD-ZIP) genes

HD-ZIP protein can be divided into three classes by their sequence similarity of the HD and the presence or absence of some motifs outside of the HD. The functions of the *HD-ZIP* proteins have been investigated and studies have revealed that these proteins do not have a common function, even in the same subclass. The class I and class II proteins are primarily involved in signal transduction pathways in response to various environmental stimuli (Hanson *et al.* 2001; Ito *et al.* 2002). The class III proteins play a role in initiation and function of the shoot apical meristem (SAM) as well as in initiation of axillary SAMs and their functions appear to be critical for the formation of an embryonic SAM (Emery *et al.* 2003; Prigge *et al.* 2005). In relation with their role in SAM establishment, *HD-ZIP* class III proteins are initially expressed throughout the proembryo but their expression later becomes restricted to a central apical position (Emery *et al.* 2003; Prigge *et al.* 2005; Floyd *et al.* 2006).

3-4 PHD-FINGER genes

The *PHD-FINGER* homeobox genes encode proteins with the zinc-finger domain, named the PHD-FINGER domain, a cysteine-rich region in the N-terminal region of the homeodomain. The HD is at C-terminal region, as in the case of *KNOX* genes (Ito *et al.* 2002; Ito *et al.* 2004). Some proteins of this family have two homeodomains together with the PHD-FINGER domain. In maize, *PHD-FINGER* genes are mainly expressed in meristematic cells and are restricted to the early developmental stage of embryogenesis (Klinge *et al.* 1996; Ito *et al.* 2002). Deletion of the PHD-FINGER domain from the *PHD-FINGER* protein of *Arabidopsis* causes severe disturbances in DNA binding (Schindler *et al.* 1993). Overexpression of *ZMHOX1*, a maize *PHD-FINGER* gene, in tobacco lead to several developmental defects such as dwarfism, adventitious shoot formation (due to the loss of apical dominance), and homeotic transformations of floral organs (Uberlacker *et al.* 1996). *PHD-FINGER* proteins are thought to function in certain developmental process in maize by controlling expression of target genes (Comelli *et al.* 1999; Ito *et al.* 2004). Ito *et al.* (2004) showed that *HAZI*, a rice *PHD-FINGER* protein isolate from three days old embryos, was similar in its entire amino acid sequence to *ZMHOX1a* (52% identity) and *ZMHOX1b* (50% identity), *PHD-FINGER* proteins of maize. But overexpression of *HAZI* does not affect the phenotype either in tobacco or in rice (Ito *et al.* 2004). These authors also demonstrated that *HAZI* was expressed at a higher level in the outer layers of a developing globular embryo (3 DAP) than in the inner

parts. At 4 and 5 DAPs, the expression of *HAZI* was concentrated at the ventral part of an embryo. Recently, it was proved that *Arabidopsis* contain 14 members of this family gene. All members of this family are expressed predominantly or exclusively in floral tissue, indicating a likely regulatory role during floral development (Tan and Irish 2006).

3-5 GLABRA2 (HD-GL2) genes

The analysis of the *HD-GL2* protein region adjacent to the homeodomain reveals the presence of a truncated leucine zipper-like segment at the same position as the *HD-ZIP* proteins. Due to these similarities, *GLABRA2*-like proteins are sometimes included in class IV of the HD-ZIP family (Di Cristina *et al.* 1996), while others have considered it as a separate family, since its components have characteristic features that differentiate them from the HD-ZIP family (Lu *et al.* 1996; Palena *et al.* 1997; Chan *et al.* 1998). This homeobox gene family encodes a protein required for normal trichome and root hair development. From the fertilization to the eight cell stage of embryogenesis, the *Arabidopsis ATML1* gene, which is a member of *HD-GL2* homeobox gene family, is expressed uniformly in the embryo proper. The expression of *ATML1* is then restricted to the outer cell layer belonging to the protoderm (Lu *et al.* 1996). Based on this expression pattern, *ATML1* is considered to be a good molecular marker for the protoderm and also for radial pattern formations. Since protoderm differentiation takes place at a very early stage (16- to 32-cell stage), it appears that the radial pattern formation, the protoderm differentiation and the protoderm-specific *ATML1* mRNA accumulation occur simultaneously in *Arabidopsis* embryogenesis. The same observations were shown in rice with *ROCI*, a GL2-type homeobox gene (Rice outermost cell-specific gene1). *ROCI* is specifically expressed in the protoderm (epidermis) and this expression is established shortly after fertilization, much earlier than protoderm differentiation (Yang *et al.* 2002). The maize *HD-GL2* genes *ZMOCL1*, *ZMOCL3*, *ZMOCL4* and *ZMOCL5* essentially exhibit the L1/protoderm/epidermis-specific expression patterns during early embryogenesis and in meristematic regions or young organ primordia at later stages (Ingram *et al.* 1999; Ingram *et al.* 2000). These observations show that the transcripts of *HD-GL2* genes are restricted to epidermal tissues or their precursor cells (Yang *et al.* 2002). The *GLABRA2* may represent a unique family of homeobox genes that specialize in control of lateral patterning in embryos and maintaining cell-layer identity in meristematic regions (Chan *et al.* 1998). *GLABRA2* gene was also involved in the control of seed oil accumulation in *Arabidopsis* (Shen *et al.* 2006).

3-6 WUSHEL (WUS) protein

A *WUS* gene was first characterized in *Arabidopsis* by Laux *et al.* (1996). The homeodomain of *WUS* gene has two and four additional amino acids in the loop between helix I and helix II and the turn between helix II and helix III, respectively. *WUS* proteins were initially considered to play important roles in the specification of the stem cells in the shoot apical meristem of developing embryos (Laux *et al.* 1996; Kieffer *et al.* 2006). In the mature embryo of *Arabidopsis wus* mutant, shoot apical meristem organization is aberrant with only a few vacuolated cells. After germination, the shoot apical meristem is terminated prematurely as a flat enlarged apex. In the shoot apical meristem of the *wus* mutant, the stem cells appear to undergo differentiation, instead of maintaining a pluripotent state in the functional shoot apical meristem (Laux *et al.* 1996). Further studies showed also that these genes were involved in the specification and the maintenance of the stem cells in the root apical meristem, by a mechanism similar to that in the shoot apical meristem (Kamiya *et al.* 2003; Haecker *et al.* 2004). The rice *WUS* gene was found to be specifically expressed in the central cells of the root. During embryogenesis and crown root formation, rice *WUS* gene expression is observed prior to the morphological differentiation of the root. This expression pattern was different between radicle and crown root formation during the process of the root apical meristem development (Kamiya *et al.* 2003).

4 Heat Shock Protein genes

The *HEAT SHOCK RESPONSE (HSR)* is an evolutionarily conserved reaction to elevated temperatures (heat shock or heat stress) that is essential to the survival of eukaryotic cells and organisms. Indeed severe heat stress induces alterations in the conformation of cellular proteins, and leads to protein denaturation or aggregation and cell death. In response to increased temperature, the transcription and translation of many cellular proteins are repressed or arrested, whereas the expression of a small subset of specialized *HEAT SHOCK PROTEINS (HSPs)* is increased preferentially. The *HSPs* are molecular chaperonins that regulate protein homeostasis and membrane fluidity and ultimately prevent or delay cell death during heat stress. Most plant tissues and cells are competent to induce the HSR during thermal stress. However, two stages in the plant life cycle, pollen germination and early embryogenesis (i.e. before cotyledon formation), are notable for their inability to invoke the full *HSR*. As a result, these tissues are especially sensitive to thermal stress (Schöfl *et al.* 1998; Fu *et al.* 2002). The *HSPs* are usually divided into high-molecular-mass (HMM)

proteins of more than 30 kDa and low-molecular-mass (LMM) protein of about 17 to 30 kDa (Lindquist and Craig 1988; Vierling 1991). In contrast to animal systems, plants synthesize more LMM *HSPs* than HMM *HSPs*. The plant LMM *HSPs* superfamily is unusually complex, consisting of at least six gene families based on DNA sequence analysis, immunological cross-reactivity, and intracellular localization; proteins encoded by the different LMM *HSPs* gene families are targeted to different cellular compartments, including the cytosol, chloroplasts, mitochondria, and endoplasmic reticulum (ER) (Waters *et al.* 1996). Plants LMM *HSPs* are represented by over 45 complete protein coding sequences including sequences from many different angiosperms, and a gymnosperm, *Pseudotsuga menziesii* (Tranbarger and Misra 1995). These sequences comprise four gene families encoding proteins localized in the cytosol (classes I and II), the chloroplast and the ER. A fifth class of *smHSPs* gene encoding a protein localized in mitochondria has been identified from *Pisum sativum* (Lenne and Douce 1994). A potential sixth class of LMM *HSPs* is represented by a single cDNA from *Glycine max* (LaFayette *et al.* 1996; Waters *et al.* 1996).

In addition to being part of the heat shock response, some plant LMM *HSPs* genes have been shown to be expressed at normal growth temperatures during zygotic embryogenesis. Expression of heat-shock genes occurs during embryogenesis from somatic cells, microspores, and developing pollen in alfalfa and tobacco (Gyôrgyey *et al.* 1991; Zarsky *et al.* 1995). Changes in concentrations of artificial phytohormones, heat shock, and starvation are known to induce somatic or microspore embryogenesis. Despite these largely different conditions, microspore-derived embryos from tobacco and somatic embryos from alfalfa express LMM *HSPs* during the globular and heart stages but not during the following torpedo stage. These data raise the question of whether heat-shock gene expression during early somatic embryogenesis is a general phenomenon that is also relevant to zygotic embryogenesis. In zygotic embryos, expression of *HEAT-SHOCK* genes occurs during the maturation stage of the seed, when cell division has ceased and seeds become tolerant to desiccation. In sunflower, expression of class II LMM *HSPs* seems to parallel roughly storage protein and lipid accumulation, whereas expression of class I coincides with seed desiccation (Coca *et al.* 1994). It has been proposed that *HSPs* are important for desiccation tolerance of the embryo or are required for germination upon rehydration. Similar to other plants, *Arabidopsis thaliana* accumulates a specific set of *HSPs* (*ATHSP17.4* and *ATHSP17.6*) during seed maturation, whereas *ATHSP18.2* is not expressed (Wehmeyer *et al.* 1996). The expression of subsets of *HEAT-SHOCK* genes during gametogenesis and embryogenesis suggests that the developmentally expressed *HSPs* play certain functions that may differ to

some extent from those required for coping with environmentally stressed vegetative tissue. Furthermore, these findings may indicate differences in the signal transduction pathway (Schöffl *et al.* 1998). Helm and Abernethy (1990) showed the presence of LMM *HSPs* mRNAs during wheat embryos development in normal condition. They concluded that the expression of these LMM *HSPs* is a normal part of wheat embryo development, and is not a consequence of heat stress experienced by the parental plants during embryogenesis. Fu *et al.* (2002) studied the expression of *HSPs* during a maize mutant embryo development. A recessive mutation at the locus *EMPTY PERICARP2 (EMP2)* led to dramatically increased expression of heat shock genes, retarded embryo development, and early-stage abortion of embryogenesis. The developmental timing of *emp2* mutant embryo lethality was correlated with the initial ability of maize kernels to invoke the *HSR*. The developmental retardation of *emp2* mutant kernels before the *HSR* suggests an additional role for *EMP2* during embryo development distinct from the *HSR*.

5 Lipid Transfer Protein genes

LIPID-TRANSFER PROTEINS (LTPs) facilitate the transfer of lipids between membranes. The binding of lipids to *LTPs* can be both specific and nonspecific. The nonspecific lipid transfer proteins (*nsLTPs*; Rueckert and Schmidt 1990) have an affinity for a variety of hydrophobic molecules, such as monoacylated and diacylated lipid molecules including fatty acids (Han *et al.* 2001), fatty acyl CoA (Lerche *et al.* 1997), lyso-phosphatidylcholine (Charvolin *et al.* 1999), and phosphatidylglycerol (Sodano *et al.* 1997). They have been isolated from a diverse range of organisms, from bacteria and yeast to higher plants and animals (Rueckert and Schmidt 1990; Smolenaars *et al.* 2007). Plant nonspecific *LIPID TRANSFER PROTEINS (nsLTPs)* were first isolated from spinach leaves (Kader *et al.* 1984) and then have been isolated from rice, wheat, barley, maize, peaches, and apricots (Hollenbach *et al.* 1997; Poznanski *et al.* 1999; Han *et al.* 2001; Pons *et al.* 2003). *nsLTPs* are widely distributed and form a superfamily of related proteins subdivided into two families: *nsLTP1* (~9 kDa) and *nsLTP2* (~7 kDa; Kader 1996). Both families are multigenic, and more than 150 sequences of plant *nsLTPs* are listed in data bases. The presence of multiple members of the *nsLTP* family may be a consequence of gene duplications and subsequent sequence variation, while those residues crucial to function are conserved (Vignols *et al.* 1997; Clark and Bohnert 1999). Although the nucleotide and amino acid sequences have

considerable divergences, several features are highly conserved in the encoded *nsLTPs*, including eight cysteine residues to form four disulphide bonds (Kader 1996).

nsLTPs were originally assumed to participate in phospholipid transfer between membranes, membrane biogenesis, modification of the lipid composition of a membrane, and in the function of membrane-bound enzymes using lipids as substrates (Kader *et al.* 1982; Arondel and Kader 1990; Wirtz 1991; Kader 1996). However, observations demonstrated that *LTPs* are extracellularly located and secreted (Sterk *et al.* 1991; Tsuboi *et al.* 1992; Coutos *et al.* 1993; Thoma *et al.* 1993). These findings suggest *LTPs* involvement in other roles such as cutin formation (Meijer *et al.* 1993; Hendriks *et al.* 1994; Pyee and Kolattukudy 1995), embryogenesis (Sterk *et al.* 1991; Thoma *et al.* 1994; Kader 1997), defense reactions against pathogens (Molina *et al.* 1993; Garcia-Olmedo *et al.* 1995), and adaptation of plants to environmental and abiotic changes (Jung *et al.* 2003; Wu *et al.* 2004). In addition, several members of the *nsLTP* family have been identified as relevant allergens in plant foods and pollens. Their high resistance to heat treatment, chemical denaturation and enzymatic digestion has been related with the induction by these allergens of severe symptoms in many patients (De Oliveira and Gomes 2007; Salcedo *et al.* 2007).

The expression pattern of *nsLTPs* is complex, characterized by strong developmental and tissue specificity with distinct patterns of expression for the different genes. For example, strong cell specificity, mainly in epidermal cells, has been observed in both maize seedlings (Sossountzov *et al.* 1991) and carrot embryos (Sterk *et al.* 1991). However, in rape seedlings, a *nsLTP* gene was found to be expressed in the entire cotyledon (Soufleri *et al.* 1996). In contrast, another *nsLTP* gene is specifically expressed in the tapetal cell layer in rape seed (Foster *et al.* 1992) and *Lilium henryi* (Crossley *et al.* 1995). Recent studies on embryogenesis were based on the position-specific expression of an *nsLTP* gene from *Arabidopsis* named *ATLTP1*. This gene is highly expressed in embryo protoderm, which is the precursor of the plant epidermis. The expression of the gene was studied in several *Arabidopsis* mutant embryos (*knolle*, *keule* and *gnom*) in which the mutation affects the formation of the apical-basal and radial axes. Using *in situ* hybridization, as well as by following *ATLTP1* promoter- β -glucuronidase transgene expression, it was observed that pattern formation in the embryo is reflected in the position-specific expression of this *LTP* gene (Vroemen *et al.* 1996). It was also found that *ATLTP1* is expressed in the outer cell layer of *Arabidopsis raspberry* embryos, which are morphologically arrested at the first stage (globular) of their formation (Yadegari *et al.* 1994). Together, these observations suggest that cell differentiation is uncoupled from

morphogenesis during embryo development. The studies also show the utility of *nsLTP* genes as tissue-specific markers in mutant embryos.

In *P. vulgaris*, *nsLTP* (*PVLTP*) gene was induced by water deficit and ABA treatment. The deduced protein presents similarity with *LTPs* from different plants, showing the highest identity (57%) with maize *nsLTP*, *MZEPLTP* (Colmenero-Flores *et al.* 1997). Under water deficit conditions, the experiments showed that the *PVLTP* transcript accumulates mainly in the aerial regions of the plant (stems and leaves) while its accumulation is very low in stressed roots. This organ-specific expression can also be observed in well irrigated plants where mRNA can be detected in stems and leaves but not in roots. Such specific expression can be that of a gene whose product responds to the need for a higher impermeabilization of the plant surface (epidermal regions) in order to decrease water loss, particularly under water-limiting conditions.

6 Pasticcino (PAS) genes

The growth and differentiation of higher plants is also greatly dependent on environmental stimuli, such as light and temperature, and on endogenous factors, such as phytohormones. For instance, cell division and proliferation, controls of which are essential for proper plant development, are tightly regulated by cytokinin and auxin. Cytokinins (CKs) were originally identified by their ability to stimulate division and sustained tobacco pith cell growth when added in combination with auxin (Davies 1995). Cytokinins have an important role in various physiological processes and were one of the first plant hormones to be isolated. Since their discovery, numerous reports have demonstrated that cytokinins are implicated in a wide variety of plant growth and development processes including cell division, organ formation and regeneration, apical dominance, vascular development, nutrient mobility, and senescence (Noodén 1988; Estruch *et al.* 1991; Mok 1994; Schmulling 2002).

The *PASTICCINO* (*PAS*) genes, which are involved in the control of cell division, proliferation and differentiation, are required for normal organization of the apical region in the embryo. *Pasticcino* mutants, which belong to three complementation groups (*pas1*, *pas2*, *pas3*), were isolated in the progeny of independent ethyl methane sulfonate and T-DNA mutagenized *A. thaliana* plants. These mutants show a range of severe developmental defects throughout the growth stages: embryo formation is altered at the heart stage when cotyledon primordia are initiated; cotyledons do not form correctly, leading to a flat apex; seedlings possess short, thick hypocotyls and misshaped cotyledons; and mature plants are

characterized by abnormal compact rosettes with multiple shoots. Irregular root development is also observed and consists of short primary root and no or very rare secondary root formation. *pas* mutants show altered response to exogenous cytokinin but are not affected in cytokinin biosynthesis (Faure *et al.* 1998; Bellec *et al.* 2002).

The *A. thaliana pas1* mutants were identified due to their abnormal seedling phenotypes. The mutants have more cell layers in the cotyledons and hypocotyls than wild type, a characteristic which is exaggerated by hyper proliferation when the seedlings are grown in the presence of exogenous cytokinins. The *pas1* phenotype is complex; these mutants have altered embryo development, shorter primary roots and reduced elongation of lateral roots compared to wild type, short bushy compact rosettes, and infertile flowers. The predicted protein sequence encoded by the PAS1 gene is similar to those of the FK506-binding protein (FKBP) class of immunophilins (Faure *et al.* 1998; Vittorioso *et al.* 1998). The cytokinin induction of primary cytokinin response markers *ARR1* and *ARR6* is enhanced and prolonged in *pas* mutants, suggesting that *PAS* functions to repress the cytokinin response. Finally, down-regulation of the primary auxin response genes *IAA4* and *IAA1* in *pas* mutants suggests an alteration in auxin response (Harrar *et al.* 2003). Mutants of the *Arabidopsis* gene *PAS2* develop abnormal shoot phenotypes from slow tumor-like cell proliferation. In absence of cytokinins, *pas2* mutant development is severely altered with an abnormal embryo development leading to embryos with short and large hypocotyl and very reduced round cotyledons (Faure *et al.* 1998). After germination, both hypocotyl and cotyledons failed to develop normally, leading to seedlings with short and wide hypocotyl and reduced finger-shaped cotyledons. *pas2* cotyledons showed a complete loss of bilateral symmetry. Drastic *pas2* defects are detectable in embryogenesis at the heart stage for the first time and are later manifested mainly in shoot while root is only retarded in its growth (Haberer *et al.* 2002). A striking feature of *pas2* adult plants was the occurrence of spontaneous fusion between organs such as leaves, stems, flowers, or siliques (Bellec *et al.* 2002). *pas3* like *pas1* mutant displayed variable phenotypes such as one or no cotyledons. Seven days after germination, this mutant has shorter primary root than in the wild type and the other *pas* mutants, and also show rare secondary roots (Faure *et al.* 1998).

7 Leafy cotyledon (LEC) genes

Arabidopsis Leafy Cotyledon (LEC) genes are central regulators of embryogenesis that play key roles in processes that occur during both the morphogenesis and maturation phases. *LEC*

genes are defined by mutations at three loci: *LEC1*, *LEC2*, and *FUSCA3* (*FUS3*) that have major effects on embryo development. All three mRNA have been found to be expressed only in embryos (Lotan *et al.* 1998; Nambara *et al.* 2000; Baumbusch *et al.* 2004; Baumbusch 2006). *LEC1* and *LEC2* were shown to regulate the expression level of the third one, *FUS3* during seed filling (Wang *et al.* 2007). On the other hand, *LEC* genes are regulator factors involved in oil accumulation during seed maturation (Baud *et al.* 2007; Wang *et al.* 2007). During the morphogenesis phase, the *LEC* genes are required to maintain suspensor cell identity. In *lec* mutants, the suspensor which in *Arabidopsis* normally consists of a single file of cells, undergoes abnormal cell divisions, resulting in a structure that is several cell layers wide. In some genotypes, the abnormal suspensor continues to proliferate and gives rise to a secondary embryo. Another early function of the *LEC* genes is the specification of cotyledon identity. The adaxial surfaces of *lec* mutant cotyledons have trichomes, a leaf trait in *Arabidopsis*, and the anatomy of some *lec* mutant cotyledons is intermediate between cotyledons and leaves. These observations suggest that in the absence of *LEC* gene activity cotyledons are incompletely specified and revert partially to leaf-like organ (Lotan *et al.* 1998; West *et al.* 1994; Harada 2001; Kwong *et al.* 2003; Lee *et al.* 2003; Kagaya *et al.* 2005). The *LEC1* gene encodes a transcription factor. mRNA accumulation resulting from this gene starts from preglobular to cotyledon stage, is limited to seed development, and is high during seed maturation. *FUS3* transcripts accumulation was observed during mid-embryogenesis (West *et al.* 1994; Lotan *et al.* 1998; Baumbusch *et al.* 2004; Baumbusch 2006). *LEC2* quickly and directly activates the expression of seed specific genes such as *S3 OLEOSIN* (*S3*) and *AT2S3 ALBUMIN*. In a second phase, it triggers the accumulation of the three regulatory genes leading to another increase of the level of *S3* and *AT2S3* mRNAs. Interestingly, this induction led to the accumulation of seed specific triacylglycerols in leaves (Mendoza *et al.* 2005).

lec mutants of *Arabidopsis* are unable to distinguish between embryonic and vegetative patterns of plant development. *lec* mutations exhibit morphological characteristics such as altered cotyledon morphology, desiccation intolerance and occasional vivipary. The *fus3* mutation in *Arabidopsis* affects several aspects of embryogenesis, provoking a *lec*-like phenotype with ectopic trichomes, desiccation intolerance and precocious germination (Meinke 1992; West *et al.* 1994; Nambara *et al.* 2000).

8 Titan (TTN) genes

The *TITAN* (*TTN*) genes encode chromosome scaffold proteins of the condensing and cohesion classes named *STRUCTURAL MAINTENANCE OF CHROMOSOME* (*SMC*) proteins (condensins and cohesins) required for chromosome function at mitosis. They are conserved in most prokaryotes and all eukaryotes examined and play essential roles in networks that are responsible for sister chromatid cohesion, chromosome condensation, dosage compensation and recombination repair (Michaelis *et al.* 1997; Lieb *et al.* 1998; Liu *et al.* 2002; Tzafrir *et al.* 2002; Liu and Makaroff 2006). *SMC* proteins perform essential functions during embryo and endosperm development. At least nine different genes controlling titan phenotype have been identified; *TTN* genes played a direct role in either cell cycle control or the structural mechanics of mitosis (Liu and Meinke 1998; Liu *et al.* 2002; Tzafrir *et al.* 2002).

The *titan* mutants of *Arabidopsis* exhibit striking defects in seed development. These mutants are defective in karyokinesis and the defining feature is the presence of abnormal endosperm with giant polyploid nuclei which is up to 100 times larger than the wild-type, during early stages of seed development. Embryo development is arrested shortly after fertilization in most *ttn* mutants and in some cases is accompanied by dramatic cell enlargement. Mutant embryos differ in cell size, morphology and viability, depending on the locus involved (Liu and Meinke 1998; McElver *et al.* 2000; Liu *et al.* 2002; Tzafrir *et al.* 2002).

Liu and Meinke (1998) discussed three *titan* mutants with related but distinct phenotypes in *Arabidopsis*. Chromosome condensation has been observed in all *titan* mutants, while mitotic figures have only been seen in *titan3*. Development of *titan1* and *titan2* embryos is arrested at the 1-2 cell stage, whereas *titan3* can produce fertile homozygous mutant plants. The *ttn1* phenotype includes extraordinary enlargement of nuclei in the embryo and endosperm, similar enlargement of cells in the arrested embryo, and a disruption of endosperm nuclear migration to the chalazal end of the seed. Defects in *ttn2* are limited to early embryonic lethality and enlargement of endosperm nuclei. Embryo development in *ttn3* is surprisingly normal but is accompanied by the formation of giant endosperm nuclei early in development and the appearance of aberrant mitotic figures with numerous condensed chromosomes. Another unique feature of the *ttn3* phenotype is cellularization of the mutant endosperm late in development.

The *ttn4* mutant identified by Wu (1999) resembles *ttn2* in phenotype and appears to encode plant-specific proteins of unknown function. The *ttn5* mutant is most similar to *ttn1* except

that migration of endosperm nuclei is not disrupted (McElver *et al.* 2000). The *ttn6* (Tzafrir *et al.* 2002) embryo cells often appeared rounded and disorganized. Endosperm cellularization was also disrupted. Defects visible at the heart stage of normal development included: increased size and reduced number of endosperm nuclei and nucleoli; and developmental arrest of the embryo proper. Endosperm nuclear enlargement was similar to that observed with other *titans* (Liu and Meinke 1998; McElver *et al.* 2000). Embryo proper and endosperm nucleolus size increases after the heart stage. A number of small nucleoli with a diameter of 5 to 6 μm were also found in the mutant endosperm, and their size remained constant between the heart and cotyledon stages. This variability in nuclear size within a single seed is a common feature of *titan* mutants. Most *ttn6* seeds at the heart stage contained between 20 and 50 endosperm nuclei. This number did not increase later in development and remained far below the number found in wild-type seeds. Therefore, endosperm nuclear division is completed at about the same time in mutant and wild-type seeds (Tzafrir *et al.* 2002). *TTN9* with a *titan* endosperm phenotype encodes a novel plant-specific protein of unknown function. The *ttn9* embryo, which contained at most four small cells, was typical of this class and resembled the cohesin (*ttn7* and *ttn8*) knockouts. *TTN9* appears to be a single copy gene that is expressed in siliques based on EST data (Liu *et al.* 2002; Tzafrir *et al.* 2002). The Table 2 summarizes some distinguishing features observed in *titan* mutant seeds.

9 Conclusion and prospects

Some major genes playing an important role in plant embryogenesis were described. Mutations in these genes affect normal development of plant embryos. After alignment of mRNA coding sequences from each gene family in the model plant, DNA primers were designed to target conserved domains of these genes and to identify related genomic sequences in *Phaseolus* (results not shown). Expression of the genes involved in embryogenesis was studied from mRNA extracted from *Phaseolus* ovules. RT-PCR reactions revealed several bands from all the described genes, with the exception of *KNOX* genes; and also showed different accumulation levels of *LTP* gene during *Phaseolus* embryo development.

Table 2 Phenotypic variation observed in *Arabidopsis* titan mutant seeds

Mutants	Endosperm phenotype		Embryo phenotype			References
	Nuclear size	Nuclear migration	Nuclear size	Cell morphology	Embryo viability	
<i>titan1</i>	Giant (~ 60µm, observed in 72.5% of seeds)	Absent	Giant	Giant	Inviable small embryos with only one or few large cells	Liu and Meinke 1998
<i>titan2</i>	Giant	Present	Normal	Aborted	Inviable embryos composed of several small cells	Tzafrir <i>et al.</i> 2002
<i>titan3</i>	Giant	Present	Normal	Normal	Viable	
<i>titan4</i>	Giant, observed in 75% of seeds of seeds observed					Tzafrir <i>et al.</i> 2002
<i>titan5</i>	Giant (~ 23.5µm)	Present		Giant, can exceed 150µm in diameter		McElver <i>et al.</i> 2000
<i>titan6</i>	Giant, (~ 21µm, observed in 77.20% of seeds)			(~ 56.5µm)	Arrested at the preglobular/globular stage	Tzafrir <i>et al.</i> 2002
<i>titan7</i>	Giant, observed in 77% of seeds					Liu <i>et al.</i> 2002
<i>titan8</i>	Giant, observed in 88% of seeds					
<i>titan9</i>	Giant, observed in 73% of seeds					Tzafrir <i>et al.</i> 2002

Wild-type seeds have 150 to 300 endosperm nuclei at the developmental heart stage. Normal nucleolus size is 4 µm in diameter. Normal embryo cell diameter is 8 µm.

In the following steps of our investigation, *Phaseolus* amplified fragments from RT-PCR will be extracted from agarose and inserted into the pCR2.1 vector plasmid. Ligated fragments will be sequenced with LICOR System (IR2, DNA Analyzer). BLASTN sequence homology analyses will be performed by using the BLAST network. Gene sequences with high homologies and unknown in *Phaseolus* will be submitted to NCBI for registration.

On the other side, mutants deficient in seed development were isolated from an ethyl methane sulphonate (EMS)-induced mutant collection of common bean (*Phaseolus vulgaris* cv BAT93) from the University of Geneva (Switzerland) (Pankhurst *et al.* 2004). Seeds of these mutants aborted within 15 to 25 days after anthesis. These mutants will be used to study the expression of embryogenesis genes described above by RT-PCR and to isolate major genes involved in seed development by Suppression Subtractive Hybridization (SSH) technique (Diatchenko *et al.* 1996; Marena *et al.* 2004). This method is based on the construction of subtracted cDNA libraries that allow the identification and isolation of differentially expressed transcript. SSH will allow isolating different cDNAs between degenerated seeds of mutants and normal seeds of wild type. Isolated cDNAs will be sequenced and analysed with BLAST network service.

We mentioned that immature embryos from the crosses *P. polyanthus* (as female) x *P. vulgaris* and *P. coccineus* (as female) x *P. vulgaris* aborted usually at the globular or early heart-shaped developmental stages. SSH technique will be used to isolate specific genes involved in embryo abortion, and to analyze allele sequences of these genes in the different collections of *P. vulgaris*, *P. polyanthus* and *P. coccineus* genotypes. This type of analysis will allow to understand better some gene disruption occurring during *Phaseolus* hybrid embryo development and device the most efficient ways to overcome post-zygotic barriers in this genus.

Chapitre IV : Possibilité d'utilisation des mutations induites dans l'étude de l'embryogenèse chez le genre *Phaseolus*

1 Introduction

L'étude de l'embryogenèse de *Phaseolus* par l'identification des gènes essentiels au développement normal de l'embryon permettrait d'avoir une meilleure compréhension du processus de l'embryogenèse d'une part et du phénomène d'avortement des embryons d'autre part. Comme cela s'est fait chez des plantes modèles (Devic, 1995 ; McElver *et al.*, 2001 ; Tzafrir *et al.*, 2004 ; Vernoud *et al.*, 2005), les mutations induites pourraient être utilisées chez *Phaseolus* pour identifier les gènes majeurs intervenant dans l'embryogenèse.

L'objet de ce chapitre est de montrer la possibilité d'utiliser les mutations induites pour l'étude de l'embryogenèse chez *Phaseolus*. Nous présentons d'abord une définition des mutations induites et les caractéristiques des types de mutations utilisées chez les plantes modèles pour l'identification des gènes de l'embryogenèse. Ensuite, quelques cas d'études réalisées chez deux plantes modèles, *Arabidopsis thaliana* (L.) Heyhn. (dicotylédone) et *Zea mays* L. (monocotylédone), sont présentés. Dans la dernière partie, nous montrons quelques exemples d'utilisation des mutations induites chez le haricot commun et la possibilité de les utiliser dans l'étude de l'embryogenèse.

2 Rôle des mutations induites dans l'étude de l'embryogenèse chez les plantes modèles

2-1 Les mutations induites

Les mutations induites sont provoquées par l'action d'agents mutagènes afin de créer et d'augmenter la variabilité au sein d'une population. D'une façon générale, les mutations entraînent des modifications dans n'importe quelle région de l'ADN. Ces modifications se caractérisent soit par des gains ou des pertes de fonction. L'exploitation des mutants permet de localiser et d'identifier des gènes touchés et de déterminer leur fonction biologique (Meunier, 2005).

Les agents mutagènes sont des produits chimiques ou facteurs physiques et leurs actions sont aléatoires puisque n'importe quelle partie du génome, n'importe quel gène peut subir une

modification (Morère & Pujol, 2003). Il existe une spécificité des agents mutagènes dans la mesure où, pour un agent mutagène donné, certains changements de séquence sont privilégiés par rapport aux autres changements possibles. La mutagenèse peut se réaliser aussi par insertion d'éléments étrangers (ADN-T ou transposons) dans le génome d'un organisme, il s'agit de la mutagenèse insertionnelle (Parinov *et al.*, 2000 ; McElver *et al.*, 2001).

La grande majorité des connaissances actuelles concernant le programme génétique de l'embryogenèse des végétaux supérieurs provient de l'étude de mutants. Des mutants affectant le développement embryonnaire ont été identifiés chez les plantes modèles *Arabidopsis thaliana* et *Zea mays*, ayant subi différents types de mutagenèse (chimique, insertionnelle ou physique) (Martienssen, 1998 ; Parinov, Sundaresan, 2000 ; Lisch, 2002 ; Kamiya *et al.*, 2003 ; van Enckevort *et al.*, 2005 ; Till *et al.*, 2007). Les agents mutagènes les plus utilisés sont l'Ethyl Méthyl Sulfonate (EMS) pour la mutagenèse chimique, l'ADN-T et les transposons pour la mutagenèse insertionnelle (McElver *et al.*, 2001 ; Vernoud *et al.*, 2005 ; van Enckevort *et al.*, 2005).

2-1-1 La mutagenèse à l'EMS

L'EMS est un agent mutagène qui induit des mutations ponctuelles dans n'importe quelle région de l'ADN. Cette technique a l'avantage d'être utilisable sur tous les organismes, ne nécessite pas d'introduction d'ADN étranger et minimise les efforts nécessaires pour trouver une mutation : une collection de 10000 plantes d'*Arabidopsis thaliana* serait suffisante pour identifier une mutation avec un seul couple d'amorces (Granier & Bauchez, 2001). L'EMS qui est un agent alkylant favorise les transitions de type G/C → A/T. Pratiquement, les graines sont trempées dans 20-100 mM d'EMS pendant 10 à 20 heures. Elles sont ensuite rincées à l'eau stérilisée et semées. Un tel traitement permet d'obtenir 30 à 40% de graines qui germent et donnent des plantes fertiles. Ce pourcentage est fonction de l'espèce, de la concentration de l'EMS et de la durée d'incubation des graines dans l'EMS (Zhu *et al.*, 1995 ; Koornneef 2002). Puisque chaque cellule de l'embryon est mutée indépendamment des autres cellules, les individus de première génération (M1) issus des graines mutagénisées sont des plantes chimériques ; ils ont des parties de tissu mutées qui proviennent d'une unique cellule embryonnaire. En outre, chaque partie mutée est hétérozygote pour n'importe quelle mutation. Les mutations présentes dans les cellules germinales sont transmises à la deuxième génération (M2) par autofécondation et le criblage pour la sélection de phénotypes d'intérêt se fait au niveau de celle-ci grâce à la présence de mutations homozygotes (Henikoff & Comai, 2003).

Suivant Caldwell *et al.* (2004) une population de mutants EMS (généralement les populations issues de mutagenèse chimique) permet à la fois une analyse de génétique directe (par le criblage d'individus pour la recherche de phénotypes d'intérêt) et une analyse de génétique inverse (par la recherche de gènes spécifiques mutés au sein de la population pour un caractère donné). Comme méthode de génétique inverse, la méthode du TILLING (Targeting Induced Local Lesions IN Genomes) est utilisée pour l'identification des gènes mis en cause chez les mutants EMS (McCallum *et al.*, 2000). Cette méthode combine l'efficacité de la mutagenèse à l'EMS avec la possibilité de détection des mésappariements créés par les mutations, à la suite d'une PCR. Les ADNs d'une collection de plantes mutagénisées de deuxième génération sont regroupés par lots, amplifiés par PCR à l'aide d'amorces spécifiques des gènes d'intérêt qui sont marquées différemment. Les produits PCR sont ensuite dénaturés par chauffage et refroidis pour permettre la formation d'hétéroduplex entre les amplicons ayant une mutation et ceux n'en contenant pas. Les mésappariements des hétéroduplex sont détectés par l'enzyme Cel1 qui coupe spécifiquement l'ADN à cet endroit et entraîne la création de fragments de taille différente. Les produits de la digestion enzymatique sont séparés sur gel de polyacrylamide dénaturant. Le marquage des extrémités, grâce aux amorces fluorescentes utilisées lors de la PCR, permet, outre la détermination de la position du fragment dans le gel, son orientation. La position de la mutation déterminera la distance de migration des fragments sur un gel d'électrophorèse (Greene *et al.*, 2003 ; Till *et al.*, 2007 ; Cooper *et al.*, 2008).

2-1-2 La mutagenèse insertionnelle

La mutagenèse insertionnelle correspond à l'interruption d'un gène par l'insertion au hasard au sein ou à proximité de celui-ci d'un fragment d'ADN. Elle peut-être obtenue par la manipulation d'éléments mobiles (transposons) ou par la transformation de plantes par *Agrobacterium tumefaciens* qui intègre une partie (ADN de transfert ou ADN-T) de son plasmide infectieux Ti (tumeur inducing) dans le génome de la plante hôte (Pereira, 2000 ; Caboche, 2006). Les transposons sont des éléments d'ADN qui peuvent se déplacer d'un endroit à un autre sur un même brin d'ADN ou sur un autre brin. Pour faire de la transposition, un transposon a besoin d'enzymes spéciales telles une intégrase ou une transposase. C'est habituellement le transposon lui-même qui code pour ces protéines. Les transposons ont été les premiers agents insertionnels mutagènes utilisés chez le maïs puis chez les autres espèces. La haute fréquence de réversion de la mutation qui en résulte permet de confirmer qu'elle est

induite par le transposon. L'ADN-T a été utilisé comme mutagène dès la fin des années 80 (Feldmann & Marks, 1987 ; Bechtuld *et al.*, 1993). Chez *Arabidopsis*, qui ne possède pas de transposons endogènes ayant une activité permettant de faire de la mutagenèse insertionnelle, l'ADN-T a été utilisé préférentiellement aux transposons (Granier & Bauchez, 2001). Les seuls éléments nécessaires pour le transfert sont des répétitions de 24 paires de bases, les séquences bordures, qui délimitent la région à transférer. Un des avantages majeurs des mutants d'insertion, est la possibilité de repérer le gène interrompu dans la mesure où l'ADN inséré est connu. On parle de gène étiqueté. La génétique inverse à grande échelle a ainsi pu se développer grâce à l'utilisation de la technique PCR qui permet de détecter un événement d'insertion dans des lots d'ADN à l'aide d'une amorce spécifique du gène d'intérêt d'une part, et d'une amorce spécifique de l'élément d'insertion d'autre part (Granier & Bauchez, 2001).

2-2 Les mutants embryons chez *Arabidopsis thaliana*

Chez *Arabidopsis*, plusieurs mutants affectés au niveau de différents événements de l'embryogenèse ont été isolés par mutagenèse chimique à l'EMS (Lukowitz *et al.*, 2004), par insertion d'ADN-T (Devic *et al.*, 1996, McElver *et al.*, 2001) ou par transposon tagging (étiquetage par transposon) (Altmann *et al.*, 1995 ; Kuromori *et al.*, 2004). Deux stratégies complémentaires, basées sur le criblage phénotypique de siliques immatures (Meinke, 1985) et de plantules en germination (Jürgens *et al.*, 1991), ont été employées afin d'isoler des mutants altérés au niveau de la phase d'embryogenèse précoce. En fonction des données issues de ces deux approches de mutagenèse, différentes estimations du nombre de gènes essentiels au développement de la graine ont été effectuées. McElver *et al.* (2001) et Tzafrir *et al.* (2003) ont analysé un grand nombre de mutants embryon-létaux chez *Arabidopsis*. Ils ont estimé qu'environ 750 gènes étaient indispensables pour coordonner les différents aspects du développement embryonnaire. Dans une autre étude, Tzafrir *et al.* (2004) ont montré que les mutations au niveau de 250 de ces gènes entraînent des phénotypes embryon-létaux chez *Arabidopsis*. Récemment, le nombre de gènes responsables de mutants embryon-létaux a été estimé à un peu plus de 550. Plus de 88% de ces mutants sont issus de la mutagenèse insertionnelle (principalement avec du T-DNA) et près de 10% sont issus de la mutagenèse chimique à l'EMS (Source : www.seedgenes.org, consulté en octobre 2008).

Les anomalies répertoriées chez les embryons mutants sont de trois types selon qu'elles touchent la polarité apico-basale, l'organisation radiale ou les étapes post-embryonnaires (Ducieux, 2002).

L'axe apico-basal, qui constitue l'axe principal de croissance des racines et des pousses végétatives après la germination, est le plus précoce à s'établir, les premiers signes de polarité selon cet axe étant observables dès la première division du zygote. Les altérations de cet axe donnent des plantules incomplètes. Chez les mutants *gurke*, la partie supérieure de la plantule est affectée ; les mutants étant réduits à l'hypocotyle et à la racine sans cotylédons ni méristème apical. Chez les mutants *monopteros*, à l'inverse, la plantule n'a pas d'hypocotyle, ni de racines, mais le sommet de la plantule est normal. Tout cela est dû à des divisions anormales des cellules centrales. Les mutations dans le gène FACKEL affectent l'hypocotyle et donnent une plantule ayant les cotylédons rattachés à la racine. Les mutations dans le gène GNOM (EMB30) provoquent la disparition des parties apicale et basale de l'embryon (Jang *et al.*, 2000 ; Weijers *et al.*, 2005).

Le patron radial de l'embryon est composé de 3 tissus de base : le protoderme (précurseur de l'épiderme), le parenchyme et le tissu vasculaire. Les altérations de l'organisation radiale sont des mutations qui affectent la distribution et l'organisation des trois tissus cités ci-dessus. La mutation du gène KNOLLE, par exemple, donne un embryon de forme mal définie, dont la disposition des tissus est profondément perturbée. Dans le cas du gène KEULE, les cotylédons sont réduits et la couche superficielle est irrégulière, ce qui indique des anomalies de constitution de la couche épidermique (Sanderfoot *et al.*, 2000 ; Assaad *et al.*, 2001).

Pour les anomalies post-embryonnaires, les gènes LEAFY COTYLEDON ou FUSCA sont en particulier impliqués dans les processus de mise en réserve et d'entrée en dormance, donc dans la maturation de l'embryon (Kwong *et al.*, 2003 ; Kagaya *et al.*, 2005).

2-3 Les mutants embryons chez *Zea mays*

Chez le maïs, les mutants du développement embryonnaire ont été obtenus soit par mutagenèse à l'EMS, soit par mutagenèse de transposition (Lisch, 2002 ; Till *et al.*, 2004 ; Vernoud *et al.*, 2005). Deux classes de mutants ont été identifiées : les mutants *dek* (defective kernel : grain altéré) (Neuffer & Sheridan, 1980 ; Scanlon *et al.*, 1994) altérés simultanément au niveau de l'embryon et de l'albumen, et les mutants *emb* (embryonic defective) pour lesquels seul l'embryon est affecté. Parmi ces derniers, les mutations concernent soit la mise

en place du patron embryonnaire, soit la croissance cellulaire ou le métabolisme (Clark & Sheridan, 1991).

2-3-1 Les mutants *dek*

Les mutations *dek* sont récessives et constituent la majeure partie des mutants du développement embryonnaire. Dans le cas des mutations *dek*, où l'albumen et l'embryon sont affectés, l'embryon peut être non viable ou donner une plantule anormale via l'embryoculture. Des études menées sur environ 200 mutants *dek* ont montré que : les mutations *dek* surviennent sur au moins 17 des 20 chromosomes du maïs ; l'embryon est généralement plus affecté que l'albumen ; la croissance de la majorité des embryons mutants est bloquée au stade cotylédonaire ou après ce stade ; plus de la moitié des embryons peuvent être sauvés en culture *in vitro* (Scanlon *et al.*, 1994 ; Vernoud *et al.*, 2005).

Les mutants *empty pericarp (emp)* appartiennent à la classe des mutants *dek* et représentent environ 10% des mutants *dek*. Chez les mutants *emp*, les graines sont caractérisées par un volume très réduit de l'albumen, qui n'est visible que 12 jours après pollinisation (JAP) ; ces graines sont dépourvues de péricarpe. Une étude histologique révèle un développement partiel des domaines de l'albumen et les embryons semblent freinés dans leur croissance, tandis que leur morphogénèse n'est pas affectée (Dolfini *et al.*, 2007). Chez le mutant *emp2*, les embryons avortent après le stade coléoptilaire. Leur apex est dépourvu de la forme typique tunica-carpus et donc incapable de former la première feuille (Scanlon *et al.*, 1997 ; Fu *et al.*, 2002). Le séquençage du gène EMP2 montre qu'il code pour une protéine ayant une forte homologie avec la protéine Heat Shock Binding Protein (HSBP1), qui est un régulateur négatif de la réponse au choc thermique chez le maïs (Fu *et al.*, 2002). Les mutants *emp2*, sont donc issus d'une insertion dans le gène codant pour la protéine HSBP1. La culture *in vitro* des embryons *emp2* à 12, 14, 16, 18 et 20 JAP n'a pas permis la régénération de plantules, indiquant que l'avortement des embryons chez les mutants n'est pas dû à une carence nutritionnelle (Scanlon *et al.*, 1997 ; Fu *et al.*, 2002).

Les mutants *longcell* sont aussi des mutants *dek*. L'albumen est aussi réduit en volume, mais les embryons avortent au stade coléoptilaire jeune, leur morphogénèse est très affectée et leur apex n'est pas formé. Les cellules chez les embryons *longcell* sont tubulaires, anormalement grandes et l'accumulation des molécules de réserve est réduite. Les gènes qui sont normalement exprimés seulement après la germination, s'expriment au cours du

développement de la graine chez les mutants *longcell*. Comme les mutants *emp2*, la culture *in vitro* des embryons *longcell* ne permet pas de régénérer des plantules (Bastida *et al.*, 2006).

2-3-2 les mutants *emb*

Chez les mutants *emb* chez qui seulement l'embryon est affecté, l'arrêt de croissance de l'embryon peut se produire lors de chacune des grandes périodes du développement embryonnaire du maïs (Vernoud *et al.*, 2005) et les mutants ont été répartis en trois groupes (Clark & Sheridan, 1991 ; Ma & Dooner, 2004). Chez un premier groupe, les embryons s'arrêtent de croître pendant les premiers stades (proembryo à transition, entre 3 et 6 JAP). Chez un deuxième groupe, la croissance des embryons est bloquée au cours des étapes intermédiaires du développement embryonnaire (du stade coléoptilaire au stade cotylédonaire, entre 7 et 12 JAP). Chez le troisième groupe de mutants *emb*, la croissance des embryons s'arrête au delà du stade cotylédonaire.

Chez les mutants *emb8516*, les anomalies apparaissent au niveau de l'embryon dès le stade transition (6 JAP). Les jeunes embryons mutants sont caractérisés par des protubérances (semblables à des embryons) à l'extrémité du suspenseur, aboutissant finalement à des structures de forme irrégulière et de taille variable. L'absence d'un cotylédon ou d'un coléoptile témoigne de l'absence de morphogénèse à l'extrémité supérieure de l'embryon. La caractérisation du gène mis en cause montre qu'il code pour une protéine ayant une forte homologie avec la protéine L35 de la grande sous-unité des ribosomes plastidiaux. Cette protéine est codée par le gène *ZmPRPL35-1* du maïs (Heckel *et al.*, 1999 ; Ma & Dooner, 2004 ; Magnard *et al.*, 2004). Les mutants *emb8516* seraient donc issus d'une mutation dans le gène *ZmPRPL35-1*.

Chez les mutants *emb*-7191-1*, *emb*-7182* et *emb*-7192*, les embryons sont caractérisés par une absence de morphogénèse associée à des divisions cellulaires anarchiques. L'arrêt de croissance des embryons est dû à une prolifération anormale du suspenseur. Les embryons ont été extraits chez ces mutants et mis en culture sur un milieu MS. Chez les mutants *emb*-7191-1* dont les embryons sont mis en culture 12 JAP, certains embryons forment une racine primaire normale, mais l'apex n'est pas produit ; tandis que d'autres embryons forment des plantules albinos. La croissance et le développement des mutants sont très lents, comparés à ceux des plantules normales. Après 15 jours de culture *in vitro*, pendant que le coléoptile et la première feuille sont différenciés chez ces mutants, les plantules normales ont atteint le stade deux feuilles. Les embryons des mutants *emb*-7182* ne peuvent être cultivés que 14 JAP et

75% de ces embryons germent et donnent des plantules albinos frêles. Leur croissance est également retardée comparée à celle des plantules normales après 10 jours de culture. Enfin les embryons mutants *emb*-7192*, mis en culture 12 JAP germent tous et les plantules atteignent 10 cm de hauteur après 20 jours de culture malgré leur croissance lente, comparée à celle des plantules normales (Consonni *et al.*, 2003).

Ces exemples de mutants *emb* du maïs mis en culture montrent que l'avortement des embryons chez ces derniers est dû en partie à une déficience nutritionnelle puisqu'une partie de ces embryons se développent en plantules via la culture *in vitro*. En outre, les plantules régénérées montrent que les mutations *emb* sont fréquemment associées à l'albinisme et à un retard de croissance ; cela est peut être lié à l'apex des embryons *emb* qui est soit non fonctionnel ou incapable de produire un appareil photosynthétique efficace.

3 Application des mutations induites au haricot commun

Chez le haricot commun, les mutations induites sont utilisées avec succès soit dans la recherche de variétés performantes au niveau du rendement et de la résistance et/ou de la tolérance aux contraintes biotiques et abiotiques ; soit dans l'étude de processus biologiques tels que la nodulation, la floraison, les mécanismes de résistance aux maladies et aux ravageurs, l'embryogenèse, etc. (Maluszynski *et al.*, 2000 ; Park & Buttery, 2006).

En raison de la difficulté de mettre au point un protocole de transformation du haricot commun et donc l'impossibilité de développer des techniques de mutagenèse insertionnelle par transposon ou ADN-T, la mutagenèse chimique à l'EMS a été la plus fructueuse pour les expériences menées dans différents laboratoires (Davis *et al.* 1988 ; Gautam *et al.* 1998 ; Park & Buttery, 2006 ; Pankhurst *et al.* 2004 ; Brink & Belay, 2006). Le processus biologique le plus étudié à travers ces mutations induites chez le haricot commun est la nodulation. En effet plusieurs mutants de ce processus ont été isolés, allant des mutants qui ne forment pas de nodules, à ceux dont les nodules ne sont pas fonctionnels et donc incapables de fixer l'azote atmosphérique (Pedalino *et al.*, 1992 ; Pankhurst *et al.*, 2004 ; Park & Buttery, 2006).

Un projet de TILLING a été initié chez *P. vulgaris* sur la base de la mutagenèse à l'EMS ; c'est une collaboration entre l'Université de Genève (Suisse) et les structures de recherche de l'USDA/ARS/TARS (United States Department of Agriculture / Agricultural Research Service / Tropical Agriculture Research Station, Mayagüez, Puerto Rico), et du CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia). Le génotype BAT93 d'origine mésoaméricaine et résistant à plusieurs maladies (Broughton *et al.*, 2003) a servi de matériel

biologique. Sur la base des études menées chez l'espèce *Lotus japonicus* L. (Perry *et al.*, 2003), il faudrait environ 5000 lignées ou familles (c'est-à-dire un ensemble de plantes issues d'une plante de première génération M1 obtenue après mutagenèse des graines) mutantes pour arriver à la saturation du génome de BAT93 avec la mutagenèse à l'EMS. A ce jour près de 1500 familles M2 ont été produites ; après analyse de 348 familles M2, 10% des mutants étaient déficients dans la formation des nodules (Gepts *et al.*, 2008).

Une autre étude a été menée sur une partie de la population de plantes de BAT93 issues de la mutagenèse. Ce travail est le fruit d'une collaboration entre l'Unité de Phytotechnie Tropicale et d'Horticulture de la Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux, et le Laboratoire de Biologie Moléculaire des Plantes Supérieures de l'Université de Genève. Cette étude avait pour objet de sélectionner des plantes déficientes dans la formation de graines matures, afin d'isoler des embryons qui avortent avant la maturité. Sur un total de 365 plantes M2 issues de 60 familles, deux plantes d'une même famille (522) ont présenté cette anomalie recherchée : leurs embryons n'arrivent pas à maturité. Les phénotypes présentés par les embryons sont les mêmes chez les deux plantes : ils sont de petite taille, possèdent souvent un cotylédon surnuméraire ou des cotylédons fusionnés et un suspenseur qui présente parfois des protubérances, aboutissant à un avortement systématique (Silué *et al.*, 2006). Les plantes d'intérêts sont actuellement utilisées à l'Unité de la Faculté de Gembloux pour les études sur l'embryogenèse et les gènes impliqués dans le développement normal de l'embryon.

4 Conclusions

La mutagenèse induite est utilisée chez plusieurs espèces végétales pour l'étude de processus biologiques tels que la formation des nodules, la fixation de l'azote atmosphérique par les nodules, et l'embryogenèse. Chez les plantes modèles *Arabidopsis thaliana* et *Zea mays*, la mutagenèse insertionnelle (ADN-T ou transposon) et la mutagenèse chimique à l'EMS sont les techniques de mutagenèse les plus utilisées dans l'étude de l'embryogenèse. Ces techniques couplées à la génétique directe et la génétique inverse ont permis d'identifier de nombreux gènes indispensables au bon déroulement de l'embryogenèse chez les plantes. Trois types de mutants embryonnaires ont été répertoriés chez *A. thaliana* : les mutants affectés dans la polarité apico-basale, ceux dans l'organisation radiale et les mutants affectés dans les événements post-embryonnaires. Chez *Z. mays* par contre deux classes de mutants ont été identifiés : les mutants *dek* altérés au niveau de l'embryon et de l'albumen, et les mutants *emb* pour lesquels seul l'embryon est affecté.

Chez *Phaseolus vulgaris*, la mutagenèse à l'EMS a permis la constitution de nombreuses populations de plantes mutagénisées. Suite à cette mutagenèse sur des graines du génotype BAT93 de *P. vulgaris*, des plantes de deuxième génération M2 déficientes dans la formation de graines matures ont été isolées. Les graines se forment normalement. Mais au cours de leur développement, on constate une dégénérescence progressive qui aboutit finalement à l'avortement de ces graines avant la maturité.

Nous pouvons donc dire que la mutagenèse à l'EMS est un bon outil pour l'induction de mutation dans les génomes des organismes vivants. A l'image des autres espèces (*A. thaliana*, *Z. mays*, *L. japonicus*, etc.) chez qui la mutagenèse à l'EMS est utilisée avec succès dans l'étude de l'embryogenèse, cette méthode peut être exploitée dans la mise en évidence des gènes importants pour le développement normal de l'embryon chez *Phaseolus*.

EXPERIMENTATIONS

Objectifs des essais

Comme nous l'avons mentionné précédemment, notre travail s'inscrit dans le cadre général de l'étude de l'embryogenèse chez le genre *Phaseolus* et s'intéresse particulièrement à l'identification et à la caractérisation des gènes clés nécessaires au développement normal de l'embryon. En d'autres termes, l'objectif principal de notre travail est d'isoler et de caractériser des transcrits différemment exprimés chez les embryons en voie d'avortement par rapport aux embryons normaux afin de mettre en évidence des gènes importants et nécessaires au déroulement normal de l'embryogenèse. Pour atteindre cet objectif, nous devons disposer d'embryons en cours de dégénérescence. L'obtention de tels embryons peut se faire à travers les hybridations interspécifiques ou encore par l'utilisation des mutations induites. Ainsi, les objectifs spécifiques sont d'une part d'isoler et de caractériser des embryons de *Phaseolus* en cours d'avortement ; et d'autre part de mettre en évidence des ADNc différemment exprimés chez ces embryons en cours de dégénérescence. Dans notre travail, pour l'identification des gènes indispensables au déroulement normal de l'embryogenèse de *Phaseolus*, nous avons utilisé deux sources d'embryons en voie d'avortement : les uns issus des hybridations interspécifiques entre le génotype NI16 de l'espèce *P. coccineus* utilisé comme parent femelle et le génotype NI637 de *P. vulgaris* utilisé comme parent mâle ; et les autres issus de plantes provenant de la mutagenèse induite à l'Ethyl Méthyl Sulfonate (EMS) appliquée sur le génotype BAT93 de *P. vulgaris*.

Cette partie expérimentale comporte trois essais.

Dans le premier essai, nous rendons compte d'abord des résultats des hybridations interspécifiques réalisés entre différents génotypes de *Phaseolus*. Des embryons hybrides en cours d'avortement ont été isolés et caractérisés par observation au binoculaire ; les plantes hybrides interspécifiques obtenues ont également été caractérisées morphologiquement et à l'aide d'un marqueur microsatellite. Ensuite, nous présentons les résultats du séquençage de fragments d'ADN différemment exprimés dans des graines en voie d'avortement issues d'hybridations interspécifiques par rapport à des graines normales issues d'autofécondation.

Le deuxième essai concerne l'identification et la caractérisation des plantes qui produisent des graines avortant avant la maturité suite à la mutagenèse chimique à l'EMS. Une étude histologique comparative du développement des embryons de ces plantes d'intérêt issues de la mutagenèse par rapport aux embryons normaux du témoin originel BAT93 a été d'abord réalisée. Des croisements ont été effectués entre les plantes d'intérêt et les plantes normales

afin d'étudier le déterminisme génétique de cette dégénérescence embryonnaire par l'analyse de la descendance F2.

Le troisième essai concerne la caractérisation moléculaire de ces plantes d'intérêt issues de la mutagenèse, par l'identification de fragments de gènes différemment exprimés dans les graines en voie d'avortement. Le séquençage de ces fragments et leur comparaison dans les banques de gènes ont donné un aperçu de leur identité et de leur fonction.

Chapitre V : Hybridations interspécifiques entre l'espèce récurrente *P. vulgaris* utilisée comme parent mâle et les espèces *P. coccineus* et *P. polyanthus* : caractérisation des hybrides interspécifiques et identification d'ADNc différemment exprimés dans les graines hybrides en voie d'avortement

1 Introduction

L'utilisation des hybridations interspécifiques dans le genre *Phaseolus* a pour but de transférer les gènes de résistance et de tolérance aux contraintes biotiques et abiotiques chez l'espèce récurrente *P. vulgaris* chez qui ces gènes sont absents ou faiblement exprimés. Les travaux d'hybridation que nous avons menés poursuivent deux objectifs :

- identifier des génotypes parentaux compatibles qui permettent un développement des embryons hybrides jusqu'au stade cordiforme au moins lors des croisements interspécifiques. Cette situation correspond à des embryons de *Phaseolus* âgés de 8 jours. Les embryons qui ont atteint le stade cordiforme se prêtent plus facilement à la culture *in vitro* et à la régénération de plantes (Camarena & Baudoin, 1987 ; Lecomte *et al.*, 1998 ; Geerts *et al.*, 2002) ;
- isoler des transcrits différemment exprimés chez des graines issues des hybridations interspécifiques et en cours de dégénérescence.

Pour atteindre ces objectifs, nous avons d'abord réalisé des hybridations interspécifiques entre différents génotypes de l'espèce récurrente *P. vulgaris* et ceux des deux autres espèces donneuses *P. coccineus* et *P. polyanthus*. Suite à ces hybridations entre différents génotypes, nous avons poursuivi les travaux avec le génotype NI16 de *P. coccineus* et le génotype NI637 de *P. vulgaris*. Nous avons ensuite isolé des ADNc différemment exprimés dans des graines issues du croisement NI16 x NI637 et en cours d'avortement, par comparaison à des graines normales issues de l'autofécondation du génotype femelle NI16 qui a servi de témoin. Cette caractérisation est effectuée à l'aide des techniques de l'Hybridation Soustractive Suppressives (SSH) et du Dot Blot.

2 Matériel et méthodes

2-1 Matériel végétal et conditions de culture

L'origine et le type biologique des génotypes des espèces *P. vulgaris* L., *P. polyanthus* Greenm. et *P. coccineus* L. utilisés sont donnés dans le tableau 3. Ces différents génotypes ont été retenus pour plusieurs critères tels que l'abondance de la floraison, le bon comportement au cours des hybridations interspécifiques lors des travaux antérieurs (délai d'avortement post zygotique relativement long) et surtout une résistance des génotypes de *P. polyanthus* et *P. coccineus* à diverses maladies destructrices du haricot commun *P. vulgaris* (Camarena, 1988 ; Baudoin *et al.*, 1992 ; Lecomte, 1997 ; Geerts, 2001).

Pour permettre une germination plus rapide, les semences sont d'abord scarifiées et mises en pré-germination dans des boîtes de Pétri, à l'obscurité dans une enceinte climatisée où la température constante est de 26°C. Lorsque la germination est effective, à l'apparition de la gemmule et de quelques racines, les semences sont mises dans des pots contenant du terreau et disposées soit dans des chambres de culture, soit dans des serres. Le substrat est composé de 80% de terreau, de 15% de tourbe, de 5% de sable de Rhin et de 5 à 6 g d'engrais organique. Lorsque les plantules se sont normalement développées, c'est-à-dire avec présence du système racinaire et apparition des premières feuilles, elles sont transférées dans de grands sachets en polyéthylène (3 L) contenant le même substrat que les pots et mises en chambres de cultures ou dans les serres.

Les conditions climatiques dans les chambres de culture sont les suivantes : une température jour/nuit de 24/20°C, une humidité relative d'environ 75%, une photopériode jour/nuit de 12h/12h et une intensité lumineuse d'environ 170 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Cette mesure est effectuée à 60 cm de la vitre séparant les plantes des lampes de 400 Watt. Dans les serres les expérimentations ont été menées entre les mois de Septembre et d'Avril des années 2003, 2004 et 2005 où les températures moyennes jour/nuit étaient de 21/16,5°C avec une humidité relative moyenne d'environ 80%. Un apport mensuel de solution nutritive (Otoul & Le Marchand, 1974 ; Traoré, 1980) est effectué à partir du deuxième mois après les semis (Tableau 4).

Tableau 3 Matériel végétal utilisé et origine

Espèces	Génotypes	Origine	Type biologique
<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	NI 637	Brésil	Cultivé
	BAT 93	Colombie	Cultivé
	G 21245	Pérou	Sauvage
	NI 622	Pérou	Sauvage
<i>Phaseolus coccineus</i> L.	NI 16	Rwanda	Cultivé
	NI 889	Mexique	Sauvage
	NI 1111	Guatemala	Sauvage
<i>Phaseolus polyanthus</i> Greenm.	G 35348	Mexique	Cultivé
	NI 1015	Guatemala	Cultivé
	NI 1123	Guatemala	Sauvage

NI : numéros d'introduction de la collection du Jardin Botanique National de Belgique (BE-1860 Meise), G et BAT : numéros d'introduction de la collection du CIAT

Tableau 4 Composition de la solution nutritive apportée aux plantes

Macroéléments (10 L / 100 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 / 100 L)	
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 (100mL / 100 L)	
FeSO ₄ .7H ₂ O	35 g

2-2 Hybridations interspécifiques

Pour les hybridations, les fleurs des plantes des génotypes utilisés comme parents femelles, *P. polyanthus* et *P. coccineus*, sont sélectionnées et castrées un jour avant l'anthèse à l'aide d'une pince. La castration des fleurs femelles consiste d'abord à enlever la carène qui entoure le stigmate et les étamines. Ensuite, les étamines sont éliminées et enfin, 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 méthode de 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 du parent femelle. De cette façon, on est sûr de la présence de 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 contaminations de pollen non désiré. Après les hybridations, les gousses sont suivies pendant leur croissance et celles qui tombent sont comptabilisées. Les taux d'avortement des gousses des différents génotypes femelles sont comparés entre eux au moyen du test χ^2 de comparaison des proportions (Dagnelie, 2006).

2-3 Caractérisation des hybrides interspécifiques

Quelques embryons en voie d'avortement issus des hybridations interspécifiques ont été extraits et observés à la loupe binoculaire afin de déterminer les différentes anomalies qui les différencient des embryons issus d'autofécondation des génotypes maternels. Les graines de certaines gousses supposées hybrides (celles obtenues au cours des deux premières années de travail, 2003 et 2004) ont été semées pour vérifier l'hybridité des plantes produites par ces graines. Il s'agit de graines provenant des croisements NI889 x G21245 (2 graines), NI1111 x G21245 (1 graine) et G35348 x G21245 (3 graines). Les observations ont porté sur des caractères présentant des différences entre les deux parents hybridés, à savoir la couleur des fleurs et des graines ainsi que la taille des graines. Les moyennes des tailles des graines sont comparées entre elles, deux à deux, à l'aide du test de l'écart réduit ($n \geq 30$) au risque de 5% où la valeur attendue pour un degré de liberté (ddl) de 1 est de 1,96 (Dagnelie, 2006).

La caractérisation de ces plantes s'est faite aussi au moyen d'un marqueur microsatellite. Pour ce faire, nous avons extrait l'ADN des plantes supposées hybrides et celui des parents respectifs à partir de jeunes feuilles suivant le protocole général d'extraction de l'ADN des tissus des plantes (Aldrich & Cullis, 1993 ; Ouédraogo, 2003). Pour l'amplification des ADNs, les amorces du marqueur microsatellite BM160 (Droite : CGCGGTTCTGATCGTG-ACTTC, Gauche : CGTGCTTGGCGAATAGCTTTG) du CIAT (Gaitan-Solis *et al.*, 2002) ont été utilisées. Le mélange réactionnel contenait 20 ng d'ADN, un tampon d'amplification concentré 1X, 0,1 μ M d'amorces, 0,25 mM de dNTPs, 1,5 U de *Taq* DNA polymérase. Le programme d'amplification est le suivant : 3 min à 94°C, 35 cycles de 15 s à 94°C, 15 s à 55°C, 15 s à 72°C et une extension finale de 5 min à 72°C. Les produits d'amplification ont été dénaturés 5 min à 90°C en présence d'une même quantité de solution stop (10 mM d'hydroxyde de sodium, 95% de formamide, 0,05% de bleu de bromophénol, 0,05% de xylène cyanol) et chargés dans un gel de polyacrylamide 6%. Après migration d'1h à 1h30, le

gel est fixé dans une solution fix-stop (10% d'éthanol absolu, 0,5% d'acide acétique) pendant 7 min. Le gel est ensuite traité dans une solution de coloration (0,1% nitrate d'argent, 0,15% formamide) pendant 5 min et rincé dans de l'eau déionisée pendant quelques secondes. Les bandes générées par les amorces sont enfin révélées dans une solution de développement (1,5% NaOH, 0,2% formamide) (Ouédraogo, 2003).

2-4 Extraction des ARNs et synthèse des ADN complémentaires

Afin d'isoler des gènes différemment exprimés dans les graines hybrides en voie d'avortement, les ARNs ont été extraits de graines issues du croisement NI16 x NI637 âgées de 20 jours et montrant des signes d'avortement, et de graines du génotype maternel NI16 ayant le même âge. Plusieurs protocoles ont été testés : l'extraction faite à partir du Trizol ; l'extraction faite avec le kit « RNeasy Plant Mini Kit » de QIAGEN et le protocole de Bugos *et al.* (1995). Les deux premiers protocoles n'ont pas donné de résultats satisfaisants. Après quelques modifications apportées au protocole de Bugos *et al.* (1995), les ARNs obtenus étaient d'une bonne qualité. Le tampon d'extraction composé de 100 mM de Tris-HCl pH 8, 20 mM de EDTA pH 8, 0,5 M de NaCl, 0,5 % de SDS, 1 % de β -Mercaptoéthanol, a été chauffé à 65°C et 745 μ l ont été ajoutés à 100 mg de graines broyées dans de l'azote liquide. Ensuite 150 μ l de phénol ont été ajoutés au mélange qui est vortexé pendant 2 min et incubé à 65°C pendant 10 min. On ajoute au mélange 450 μ l de chloroforme, suivi d'une incubation de 15 min dans la glace. Le surnageant purifié par centrifugation à 9000 g à 4°C pendant 10 min, a été divisé dans deux tubes. La précipitation des ARNs s'est faite avec 1,5 V de LiCl 4 M, les tubes ont été ensuite mis dans la glace et incubés en chambre froide pendant 3 heures. Le culot obtenu après centrifugation à 14000 g à 4°C pendant 15 min a été dissout dans 250 μ l d'eau distillée stérile traitée au Diethyl Pyrocarbonate (DEPC, dH₂O). A cette étape, le traitement contre les contaminations d'ADN est effectué en ajoutant une unité de DNase I RNase-free et 1/10 de volume de tampon DNase I concentré 10X (200 mM de Tris-HCl pH 8,4, 500 mM de KCl, 20 mM de MgCl₂). Le mélange est ensuite laissé à température ambiante pendant 15 min, et purifié une fois au phénol et deux fois au chloroforme. Les ARNs sont ensuite précipités avec du 1/10 de volume de NaAc 3 M et 3 V d'éthanol absolu. Les échantillons sont ensuite incubés toute une nuit à -80°C et précipités par centrifugation à 12000 g à 4°C pendant 30 min. Le culot obtenu est lavé avec 700 μ l d'éthanol 70 % et resuspendu dans 50-70 μ l de dH₂O. Les ARNs d'un même échantillon sont repris dans un seul tube et conservés à -80°C.

Les doubles brins d'ADNc ont été synthétisés en utilisant le kit « SuperScript™ Double-Stranded » d'Invitrogen au départ de 10 µg d'ARN et en suivant les instructions du manufacturier.

2-5 Hybridation Soustractive Suppressive (SSH)

Le protocole de SSH utilisé a été adapté de ceux de Diatchenko *et al.* (1996) et Li *et al.* (2002) et le principe de cette technique est décrit au paragraphe 1 du chapitre II. Les oligonucléotiques utilisés pour la synthèse des adaptateurs sont repris dans le tableau 5. Les échantillons issus du croisement NI16xNI637 sont utilisés comme « tester » et ceux issus du parent maternel NI16 comme « driver », c.-à-d. témoin. Deux microgrammes des ADNc des deux échantillons sont d'abord digérés avec 15 unités de l'enzyme RsaI dans un volume total de 50 µl à 37°C pendant 3 heures. L'enzyme est ensuite inactivée à 60°C pendant 2 min. Deux échantillons d'ADNc « tester » sont liés aux adaptateurs 1 et 2 dans deux tubes différents contenant chacun 120 ng d'ADNc, 2 µM d'adaptateur, 1 U de T4 DNA ligase dans un volume total de 10 µl, toute une nuit à 16°C. L'enzyme est inactivée par ajout de 1 µl d'EDTA 0,2 M et une incubation à 70°C pendant 5 min. Des aliquots (1,5 µl) de chaque « tester » lié à un adaptateur sont mélangées à 600 ng de « driver » dénaturés ainsi que 2 µl du tampon d'hybridation concentré 5X (250 mM d'Hepes pH 8, 2,5 M de NaCl, 1 mM d'EDTA) dans un volume total de 10 µl. Après une courte incubation de 1,5 min à 98°C, les tubes sont placés à 63°C pendant 1h30 pour une première hybridation. Les contenus des deux tubes sont alors mélangés en présence de 300 ng d'ADNc « driver » dénaturés, de 3 µl du tampon d'hybridation concentré 1X et incubés toute une nuit à 63°C pour une deuxième hybridation. L'ADNc soustrait est ensuite amplifié par deux PCR successives dans un volume de 25 µl. Le mélange réactionnel de la première PCR contient 1 µl d'ADNc issu de la deuxième hybridation, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP, 1 U de Taq polymérase, du tampon de réaction concentré 1X et 0,3 µM d'amorce P1 correspondant à la séquence externe des adaptateurs 1 et 2. Le programme PCR est le suivant : 2 min à 72°C, 25 cycles de 30 s à 95°C, 30 s à 60°C, 1,5 min à 72°C et une extension finale de 7 min à 72°C. Pour la seconde PCR, les amorces PN1 et PN2, correspondant respectivement, aux séquences internes de l'adaptateur 1 et de l'adaptateur 2, sont utilisées avec 20 cycles de réaction et 66°C comme température d'hybridation au lieu de 60°C. Cette dernière amplification est visualisée sur un gel d'agarose 1,5% et les produits de cette PCR sont ensuite précipités.

Tableau 5 Oligonucléotides utilisés pour la synthèse des adaptateurs et les PCR de la SSH

Oligonucléotides	Séquences
Adapteur 1-1	5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCCGCCCGGGCAGGT-3'
Adapteur 1-2	3'-GGCCCGTCCA-5'
Adapteur 2-1	5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCAGCGTGGTTCGCGGCCGAGGT-3'
Adapteur 2-2	3'-GCCGGCTCCA-5'
Amorce P1	5'-CTAATACGACTCACTATAGGGC-3'
Amorce PN1	5'-TCGAGCGGCCCGCCCGGGCAGGT-3'
Amorce PN2	5'-AGCGTGGTTCGCGGCCGAGGT-3'

2-6 Clonage des produits d'amplification

Les produits issus de la deuxième PCR sont purifiés par précipitation en y ajoutant 1/10 de volume de NaAc 3M et trois volumes d'éthanol absolu. Le mélange est conservé à -80°C pendant 15 min. Le culot obtenu après une centrifugation à 1200 g à 4°C pendant 15 min est rincé avec 500 µl d'éthanol 70%, séché et resuspendu dans 20 µl d'eau. Les fragments ainsi purifiés (2 µl) sont insérés dans le vecteur pJET1/blunt en utilisant le kit « GeneJet™ PCR Cloning » de Fermentas ainsi que les instructions de la firme.

Les vecteurs contenant les inserts (5 µl) sont utilisés pour la transformation des souches DH5α de la bactérie *E. coli* dans un milieu de culture LB (Luria-Bertani) liquide contenant de l'ampicilline (50 µg/ml). Le mélange est incubé à 37°C pendant 1h sous agitation. Les bactéries ainsi transformées sont étalées sur un milieu LB solide supplémenté en ampicilline et incubées à 37°C toute la nuit. Les colonies qui ont poussé et donc porteuses du vecteur avec un insert, sont repiquées dans 2 ml de LB liquide supplémenté en ampicilline et mises à incuber toute une nuit sous agitation à 37°C.

2-7 Dot blot

Afin d'identifier les ADNc spécifiques à la condition « tester », échantillon NI16 x NI637, un *dot blot* (Paragraphe I.4) est effectué suivant un protocole adapté de Barbosa *et al.* (2004). Pour cela, une PCR est effectuée directement sur 1 µl des différentes colonies repiquées. Le programme utilisé est le même que celui de la 2^{ème} PCR de la SSH avec les mêmes amorces PN1 et PN2. Une partie des produits PCR (10µl) est visualisée sur un gel d'agarose 1,5% afin d'identifier les colonies qui contiennent des inserts (fragments issus de la SSH). Une autre partie du produit d'amplification de chaque colonie (3 µl) est dénaturée 10 min à 100°C en

présence d'EDTA 10 mM et de NaOH 0,4 M dans un volume total de 50 µl, et fixée sur deux membranes de nylon N⁺. Les membranes sont lavées avec 500 µl de NaOH 0,4 M pour une meilleure fixation des ADN monocaténaïres puis rincées avec 500 µl de SSC 2X et conservées à 4°C. Les membranes sont ensuite placées dans un tube à hybrider pour une préhybridation qui se fait à 65°C pendant 3h. La solution de préhybridation est composée de SSC 6X, de Denhardt's 5X (Ficoll 400 0,1 %, Polyvinylpyrrolidone 0,1 %, BSA 0,1 %), de SDS 0,5% et d'ADN de sperme de saumon 0,1 mg/ml dénaturé.

Les sondes sont préparées à partir des ADNc digérés des échantillons « driver » et « tester » avec le kit « MegaprimeTM DNA Labelling Systems » d'Amersham. Les ADNc (100ng/µl) sont d'abord dénaturés à 100°C pendant 5 min en présence de 5 µl d'amorces. Ensuite 4 µl de dATP, dGTP, dTTP non marqués et de dCTP radioactif ([α-³²P]-dCTP), 2 µl de l'enzyme de Klenow sont ajoutés. L'ensemble est porté à 50 µl et incubé environ 15 min à 37°C. Cinq microlitres d'EDTA 0,2 M sont ajoutés et le mélange est dénaturé pendant 5 min. Les sondes radioactives sont purifiées sur une colonne Sephadex G-50 afin d'éliminer les nucléotides non incorporés.

A la fin de la préhybridation, la solution est retirée et remplacée par la solution d'hybridation qui est composée de la solution de préhybridation plus les sondes marquées préalablement dénaturées. L'hybridation se déroule toute une nuit à 65°C. Le lendemain, la solution d'hybridation est retirée de chaque tube et les membranes sont rincées deux fois pendant 15 et 30 min, dans deux solutions de rinçage différentes. La première solution est composée de SSC 2X et de SDS 0,1% et la deuxième contient du SSC 0,2X et du SDS 0,1%. Les membranes sont séchées à température ambiante et exposées sur un écran autoradiographique de Biorad. L'écran est ensuite scanné avec le logiciel « Biorad personal FX PhosphoImager » pour la visualisation des spots.

2-8 Extraction de l'ADN plasmidique des clones d'intérêt (Minipréparation)

Les colonies présentant une forte intensité chez le « tester » par rapport au « driver » représentent les fragments d'ADNc différemment exprimés chez l'échantillon « tester ». Ces clones seront sélectionnés pour une extraction de plasmides selon un protocole standard (Payment & Trudel, 1989), suivie d'un séquençage.

Les bactéries provenant d'une culture liquide sont d'abord récupérées par centrifugation à température ambiante pendant 2 min à vitesse maximale, puis resuspendues dans 300 µl d'une solution P1 contenant de l'EDTA 10 mM et du Tris HCl 50 mM. Une solution P2 (300 µl)

contenant du NaOH 200 mM et du SDS 1% est alors ajoutée. Le mélange est incubé à température ambiante pendant 5 min. Enfin, 300 µl d'une solution P3 d'acétate de potassium 3 M pH 5,5 sont ajoutés et le tout est mis sur glace pendant 10 min. Le surnageant contenant les ADN plasmidiques est récupéré après une centrifugation à vitesse maximale pendant 10 min à 4°C. Ces derniers sont précipités par centrifugation en présence de 0,7 volume d'isopropanol et lavés par de l'éthanol 70%. Le culot obtenu est séché au lyophilisateur et resuspendu dans 25 à 50 µl d'eau. Afin d'éliminer toutes traces d'ARN, 1 µl de RNase (10 mg/ml) est ajouté dans les tubes qui sont incubés à 37°C pendant 30 min.

2-9 Séquençage des clones d'intérêt

Le séquençage est effectué directement sur les plasmides obtenus après la minipréparation. Les réactions de séquençage ont été préparées au moyen du kit *DYEnamic Direct cycle sequencing kit* d'Amersham Bioscience et l'électrophorèse est réalisée sur un séquenceur automatique de type LICOR (Westburg). Le gel de séquençage et les séquences obtenues sont analysés à l'aide des logiciels e-Seq V2.0 et DNasis V2.5 respectivement. Les recherches d'homologies sont effectuées grâce aux programmes BLASTN et BLASTX dans la base de données du NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

3 Résultats

3-1 Hybridations interspécifiques

Nous avons réalisé des croisements avec les génotypes de *P. polyanthus* et de *P. coccineus* comme parents femelles et ceux de *P. vulgaris* utilisés comme parents mâles, vu que c'est ce sens de croisement qui favorise une meilleure transmission des caractères vers l'espèce récurrente *P. vulgaris* (Camarena & Baudoin, 1987 ; Baudoin et al., 1992). Les périodes de floraison très courtes de certains génotypes expliquent dans certains cas le faible nombre d'hybridations réalisées. Une gousse qui est en cours d'avortement se caractérise par un ramollissement et un jaunissement suivis d'un arrêt de la croissance en longueur (Lecomte, 1997). Les gousses qui présentent ces caractéristiques un ou deux jours après la pollinisation

ne sont pas comptabilisées car cet état provient des blessures faites sur les pièces florales au cours de la manipulation des fleurs. Le tableau 6 donne une synthèse des croisements effectués entre les différents génotypes de *P. polyanthus* et de *P. coccineus* et ceux de *P. vulgaris*.

3-1-1 Hybridations *P. coccineus* x *P. vulgaris*

Au total 938 croisements *P. coccineus* x *P. vulgaris* ont été effectués, donnant environ 66% d'avortement des gousses intervenant entre 3 et 5 jours après pollinisation (JAP), 21% d'avortement entre 6 et 8 JAP, et 12% de gousses avortées au delà de 8 JAP. Des gousses matures supposées hybrides issues des croisements NI889 x NI637 (2 gousses), NI889 x G21245 (3 gousses), NI16 x NI637 (3 gousses) et NI1111 x G21245 (1 gousse) ont été obtenues. Les génotypes femelles NI1111, NI889 et NI16 avec respectivement 13,20%, 12,82% et 12,07% de gousses avortées au delà de 8 JAP ont donné sensiblement les mêmes résultats.

3-1-2 Hybridations *P. polyanthus* x *P. vulgaris*

Pour les croisements *P. polyanthus* x *P. vulgaris*, 733 hybridations ont été effectuées. Les taux d'avortement des gousses étaient d'environ 66% entre 3 et 5 JAP, de 16% entre 6 et 8 JAP et de 18% au-delà de 8 jours. Une seule gousse mature supposée hybride issue du croisement G35348xG21245 a été obtenue. Les croisements impliquant les génotypes femelles NI1015, G35348 et NI1123 se caractérisent respectivement par 22%, 18% et 10% de taux d'avortement des gousses au-delà de 8 jours.

Tableau 6 Nombre de gousses avortées à différents intervalles de temps après la pollinisation et nombre de gousses matures issues des croisements interspécifiques

Combinaisons interspécifiques	Nombre d'hybridations réalisées	Nombre de gousses avortées à différents intervalles de temps après pollinisation (Jours)				Gousses matures
		3-5	6-8	9-13	≥ 14	
<i>P.c. (♀) x P.v.</i>						
NI889 x NI637	58	31	17	8	0	2
NI889 x BAT93	24	18	6	0	0	0
NI889 x G21245	74	43	16	4	8	3
<i>Sous total</i>	156	92	39	12	8	5
NI16 x NI637	464	325	85	36	15	3
NI16 x BAT93	113	72	28	6	7	0
NI16 x G21245	142	94	24	15	9	0
NI16 x NI622	10	5	5	0	0	0
<i>Sous total</i>	729	496	142	57	31	3
NI1111 x NI637	15	8	6	0	1	0
NI1111 x G21245	20	13	4	2	0	1
NI1111 x NI622	18	9	5	3	1	0
<i>Sous total</i>	53	30	15	5	2	1
Total <i>P.c. (♀) x P.v.</i>	938	618	196	74	41	9
<i>P.p. (♀) x P.v.</i>						
G35348 x NI637	240	175	25	17	23	0
G35348 x G21245	177	128	18	14	16	1
G35348 x NI622	20	10	3	7	0	0
<i>Sous total</i>	437	313	46	38	39	1
NI1015 x NI637	159	87	36	15	21	0
NI1015 x G21245	50	25	12	7	6	0
<i>Sous total</i>	209	112	48	22	27	0
NI1123 x NI637	37	22	11	4	0	0
NI1123 x BAT93	15	10	5	0	0	0
NI 1123 x G21245	25	18	4	3	0	0
NI1123 x NI622	10	6	2	1	1	0
<i>Sous total</i>	87	56	22	8	1	0
Total <i>P.p. (♀) x P.v.</i>	733	481	116	68	67	1

P.v. = *Phaseolus vulgaris*, *P.c.* = *P. coccineus*, *P.p.* = *P. polyanthus*

3-1-3 Caractéristiques des hybrides obtenus

Des embryons hybrides âgés de 20 jours issus du croisement *P. coccineus* x *P. vulgaris* (NI16 x NI637) ont été observés. Les différentes anomalies se situent au niveau des cotylédons et d'un retard de croissance observé chez les embryons hybrides (Fig. 5). Chez l'embryon issu d'autofécondation, les deux cotylédons sont bien développés (Fig. 5A). Chez l'un des embryons issus d'hybridation on constate une malformation au niveau des cotylédons avec un troisième cotylédon (Fig. 5B), tandis que l'autre embryon se caractérise par un retard de croissance (Fig. 5C).

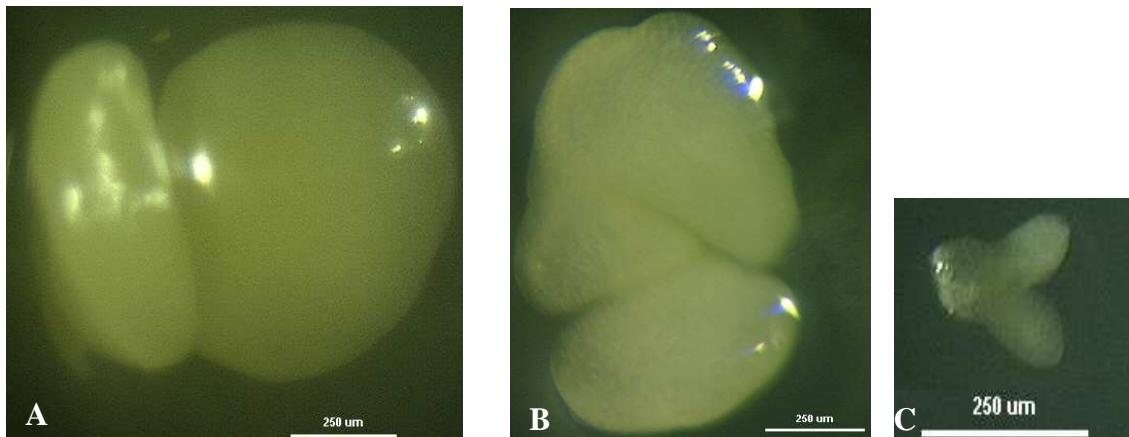


Figure 5 Caractéristiques d'embryons âgés de 20 jours. A : embryon issu d'autofécondation du génotype NI16 de *Phaseolus coccineus*, B et C : embryons issus d'hybridation avec le génotype NI637 de *P. vulgaris* présentant des anomalies au niveau des cotylédons (B) et un retard de croissance (C). (Barres = 250 µm) Photos : SILUÉ S.

Les graines des gousses supposées hybrides, obtenues durant les deux premières années (2003 et 2004) de travail, ont été semées pour vérifier l'hybridité des plantes issues de ces graines. Il s'agit de deux graines issues d'une gousse NI889 x G21245, d'une graine issue de la gousse NI1111 x G21245 et de trois graines issues d'une gousse G35348 x G21245. Exceptée la graine NI1111 x G21245 qui n'a pas germé, toutes les autres graines ont germé et donné des plantes fertiles. Deux des cinq plantes obtenues après germination de ces graines présentaient des caractères (couleur des fleurs et des graines, taille des graines) différents de ceux des parents dont elles sont issues. Ces plantes hybrides étaient issues l'une du croisement G35348 x G21245 (Fig. 6A) et l'autre du croisement NI889 x G21245 (Fig. 6B). Les caractères qui différencient ces hybrides de leurs parents respectifs, repris dans le tableau 7, sont la couleur des fleurs, la couleur et la taille des graines chez l'hybride G35348 x G21245 ; la couleur des fleurs et la taille des graines chez l'hybride NI889 x G21245. L'hybride G35348 x G21245 se caractérise par des fleurs violettes et des graines rousses ou grises tachetées de noir. Chez l'hybride NI889 x G21245 les fleurs sont roses et les graines sont de même couleur que les deux parents : grises tachetées de noir. L'hybride G35348 x G21245 présente des tailles de graines intermédiaires à celles des deux parents. Par exemple la longueur moyenne des graines de l'hybride F1 est significativement différente de celle des deux parents. En effet le test de l'écart réduit ($n \geq 30$) au risque de 5% montre que l'écart réduit F1 (G35348 x G21245) vs G35348 est de 8,13 (supérieur à la valeur attendue 1,96) ; et l'écart réduit F1 (G35348 x G21245) vs G21245 est de 19,21 ($>1,96$). Quant à l'hybride

NI889 x G21245, les tailles des graines sont supérieures à celles des deux parents. En effet l'écart réduit de la longueur de la graine F1 (NI889 x G21245) vs G21245 (parent qui a la plus grande taille des graines), est de 2,22 (supérieur à la valeur attendue 1,96). On constate chez ce dernier hybride que la longueur et la largeur d'une graine dépassent celles du parent qui a les plus grandes tailles de graines (G21245) d'environ 107% et 117% respectivement. Les trois autres plantes présentaient les mêmes caractères que ceux des parents femelles G35348 (*P. polyanthus* ; deux plantes) et NI889 (*P. coccineus* ; une plante).

Tableau 7 Caractéristiques des graines et des fleurs issues des génotypes parentaux et des hybrides F1

Génotypes parentaux et hybrides	Nombre de graines	Caractéristiques des graines						Couleur des graines	Couleur des fleurs
		Longueur (mm)			Largeur (mm)				
		Moy	ET	Var	Moy	ET	Var		
NI889 (<i>P. coccineus</i>)	8	6,49	0,39	0,15	5,01	0,19	0,03	Grise tachetée de noir	Rouge-orangé
NI889 (♀) x G21245 (F1)	30	8,86	1,23	1,51	6,11	0,69	0,47	Grise tachetée de noir	Rose
G21245 (<i>P. vulgaris</i>)	30	8,31	0,58	0,33	5,21	0,28	0,08	Grise tachetée de noir	Violet-pâle
G35348 (♀) x G21245 (F1)	30	12,12	0,92	0,85	8,20	0,49	0,24	Rousse ou grise tachetée de noir	Violette
G35348 (<i>P. polyanthus</i>)	30	14,50	1,31	1,72	10,85	0,88	0,78	Rousse	Blanche

Moy : moyenne, ET : écart-type, Var : variance

Le caractère hybride de ces plantes a été testé au moyen du marqueur microsatellite BM160. La figure 7 montre l'électrophorèse des produits PCR des différents échantillons. Seuls les échantillons du canal 3 (représentant l'hybride G35348 x G21245 en figure 6A) et du canal 7 (représentant l'hybride NI889 x G21245 en figure 6B) contenant les fragments Fp/Fp' de *P. polyanthus* et Fv/Fv' de *P. vulgaris* ; Fc/Fc' de *P. coccineus* et Fv/Fv' de *P. vulgaris* respectivement sont des hybrides. Ces résultats confirment les observations morphologiques faites sur ces plantes.

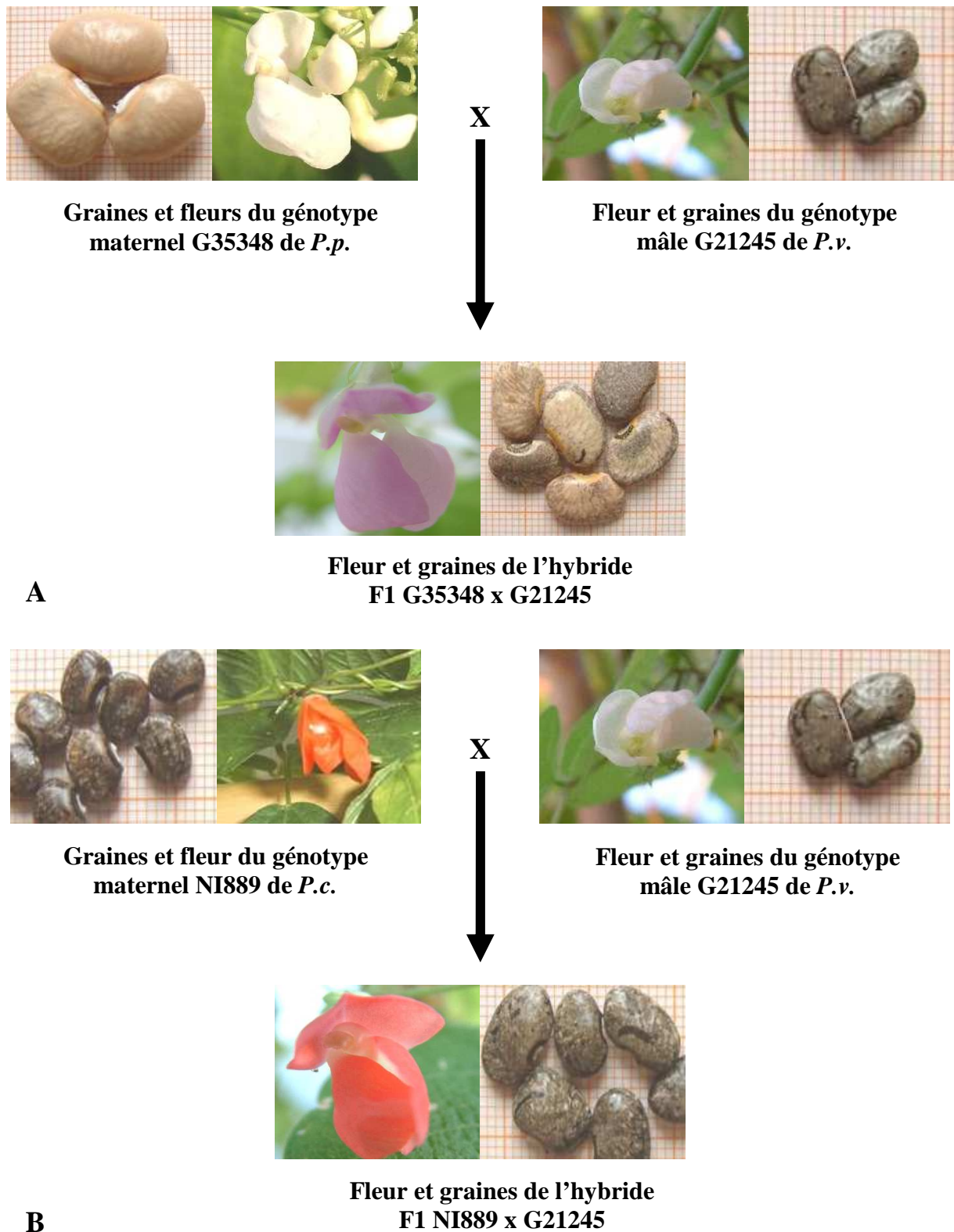


Figure 6 Caractéristiques des génotypes parentaux et des hybrides issus des croisements interspécifiques *P. polyanthus* x *P. vulgaris* (A) et *P. coccineus* x *P. vulgaris* (B). La couleur des fleurs, la taille et la couleur des graines des hybrides sont différentes de celles des génotypes parentaux. *P.v.* : *Phaseolus vulgaris*, *P.p.* : *Phaseolus polyanthus*, *P.c.* : *Phaseolus coccineus*. Photos : SILUÉ S. & TOUSSAINT A.

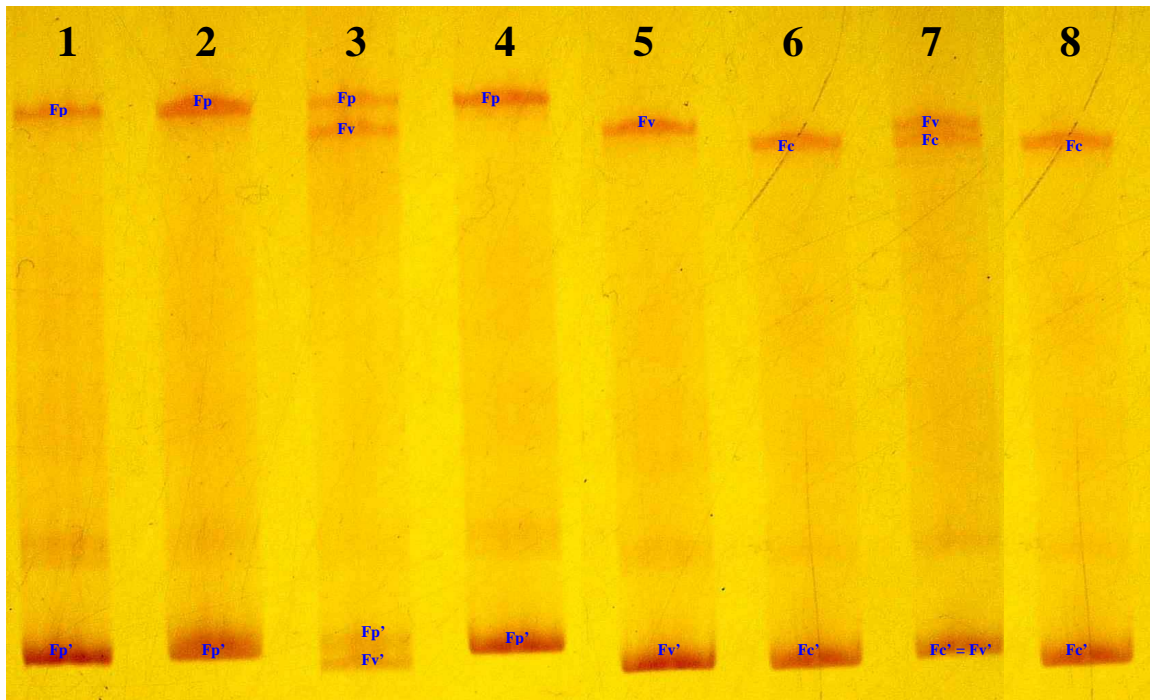


Figure 7 Electrophorèse des fragments amplifiés par l'amorce BM160 sur l'ADN extrait des feuilles des plantes supposées hybrides interspécifiques *Phaseolus* et de leurs parents respectifs. 1 : plante du génotype maternel de *P. polyanthus* G35348 ; 2, 3, 4 : plantes supposées hybrides G35348 x G21245 ; 5 : plante du génotype paternel de *P. vulgaris* G21245 ; 6, 7 : plantes supposées hybrides NI889 x G21245 ; 8 : plante du génotype maternel de *P. coccineus* NI889. Fp et Fp' : fragments du parent G35348 ; Fv et Fv' : fragments du parent G21245 ; Fc et Fc' : fragments du parent NI889. Seuls les échantillons 3 (Fig. 6A) et 7 (Fig. 6B) caractérisés par la présence des fragments des différents parents sont des hybrides. Photo : SILUÉ S. & TOUSSAINT A.

Les génotypes femelles ont été classés en fonction du taux d'avortement des gousses au-delà de 8 JAP lors des hybridations avec les deux génotypes mâles les plus utilisés : NI637 et G21245 (Fig. 8). Le test chi 2 de comparaison des proportions montre une différence significative entre les différents génotypes femelles ($\chi^2 = 17,371$; ddl = 5 ; P = 0,004 < 0,05) qui se classent dans l'ordre décroissant suivant : NI1015 (23,4%), G35348 (16,8%), NI889 (15,2%), NI16 (12,9%), NI1123 (11,3%) et NI1111 (8,6%). Pour un classement définitif de la performance des différents génotypes femelles, nous devons tenir compte de certains facteurs majeurs tels que les délais de floraison, l'abondance de floraison et surtout la taille des fleurs et des graines des différents génotypes. Les fleurs de taille relativement grande permettent une manipulation plus aisée lors des opérations de castration et d'hybridation.

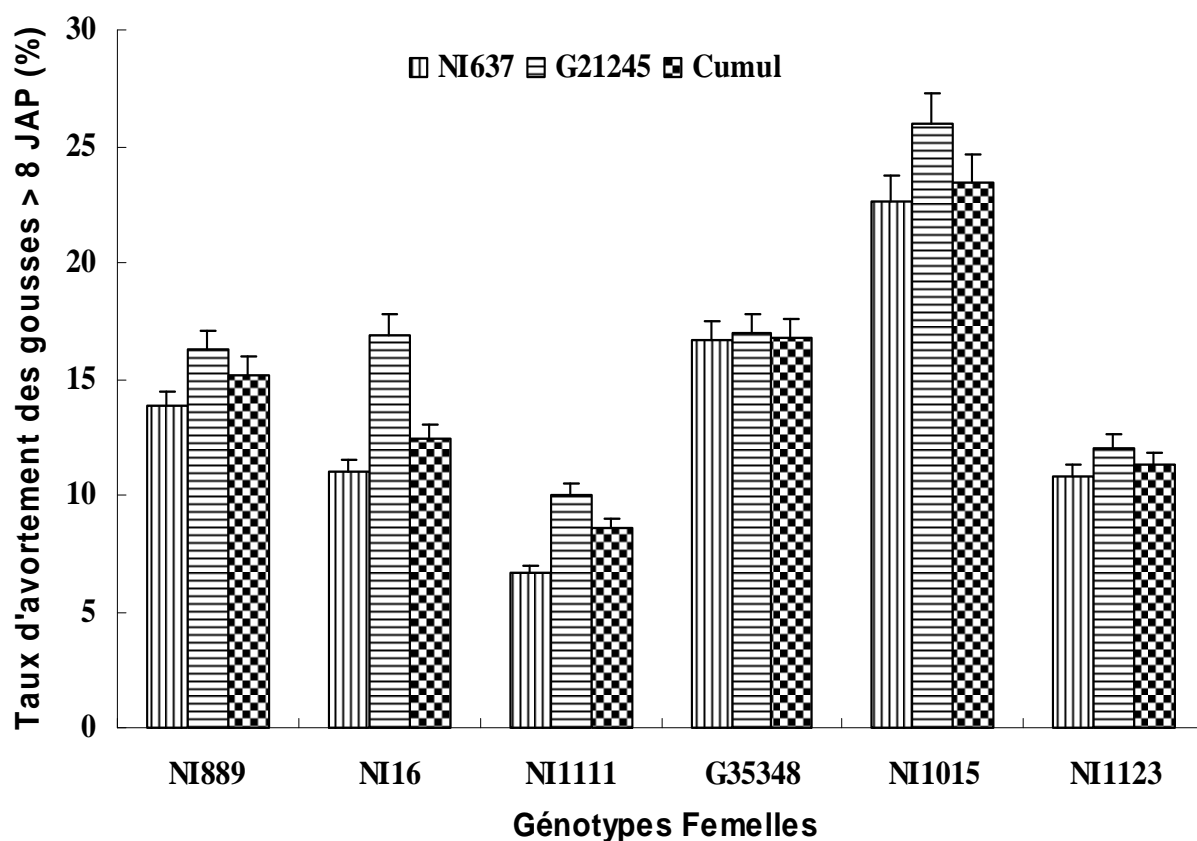


Figure 8 Pourcentage d'avortement des gousses au-delà de 8 jours après pollinisation des génotypes femelles NI889, NI16 et NI1111 de *P. coccineus* et G35348, NI1015 et NI1123 de *P. polyanthus* dans les croisements avec les génotypes NI637 et G21245 de *P. vulgaris*. Cumul représente le pourcentage des effectifs cumulés d'avortement des gousses avec les deux génotypes mâles.

3-2 Identification des ADNc différemment exprimés chez des graines hybrides interspécifiques NI16 x NI637 en voie d'avortement par rapport au génotype maternel NI16 de *P. coccineus*

Pour l'identification des ADNc différemment exprimés chez des graines hybrides en cours d'avortement, nous avons utilisé des graines hybrides NI16 x NI637 en voie d'avortement et des graines issues de l'autofécondation du génotype maternel NI16. Ces deux génotypes, NI16 et NI637, fleurissent précocement et donnent une floraison plus abondante que les autres. L'intervalle de temps entre le semis et la floraison est d'environ 40 jours pour ces deux génotypes contre 60 à 80 jours pour les autres. Les fleurs de ces deux génotypes sont plus grandes et donc plus faciles à manipuler. Les graines de NI16 sont de grande taille, ce qui facilite l'extraction et l'obtention de matériel génétique (ARN) suffisant. Comme le montre le tableau 6, le nombre de croisements effectués entre ces deux génotypes représente plus du quart des croisements (464/1671). La figure 9A montre une gousse issue de chacun des deux

échantillons. La gousse issue du croisement NI16 x NI637 est en cours de dégénérescence et montre des signes d'avortement (ramollissement, jaunissement et arrêt de croissance). Les techniques de la SSH et de la *dot blot* ont été utilisées pour amplifier des fragments de gènes différents entre ces deux échantillons et spécifiques aux graines hybrides en cours d'avortement.

Les ARN extraits de ces deux échantillons ont été utilisés pour la synthèse des ADN complémentaires qui ont servi à isoler des transcrits différemment exprimés dans les graines hybrides en voie d'avortement. Les produits amplifiés après la SSH (Fig. 9B) ont été précipités et insérés dans des plasmides. Ces derniers ont servi à transformer des bactéries qui ont été ensemencées sur un milieu LB solide.

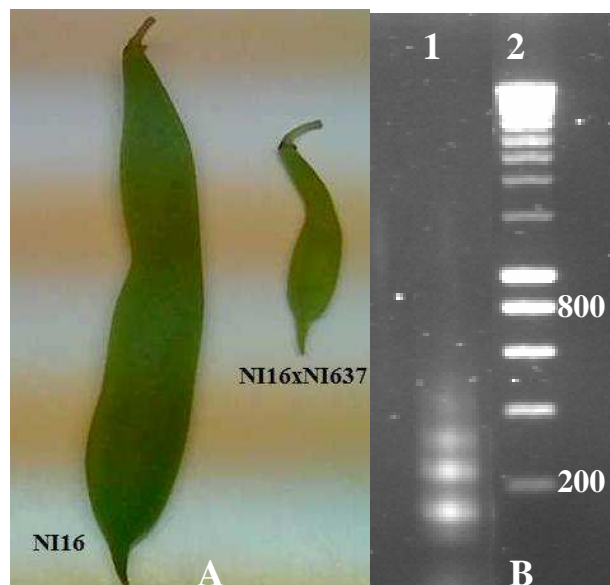


Figure 9 A : Caractéristiques des gousses de 20 jours issues de l'autofécondation du génotype NI16 de *P. coccineus* (gauche) et du croisement entre *P. coccineus* et *P. vulgaris* NI16 x NI637 (droit). La gousse issue du croisement présente des signes d'avortement. **B :** Gel d'agarose du produit PCR issu de la SSH. 1 : Produit PCR ; 2 : Marqueur de taille des fragments (paires de bases). Photos : SILUÉ S.

Les colonies qui ont poussé, sont porteuses d'un plasmide avec un insert. Elles ont été multipliées par culture dans un milieu LB liquide. Une PCR a été faite à partir d'une aliquote de la culture bactérienne de chaque clone et les produits PCR ont été fixés sur deux membranes. Sur un total de 120 clones amplifiés, seulement 72 clones qui contenaient des inserts ont été fixés sur deux membranes. Ces membranes ont été incubées chacune en présence de sondes radioactives synthétisées à partir des ADNc des deux échantillons pendant

toute une nuit : NI16 comme « driver » et NI16 x NI637 comme « tester ». Les membranes ont été visualisées après 48 h d'exposition sur l'écran (Fig. 10).

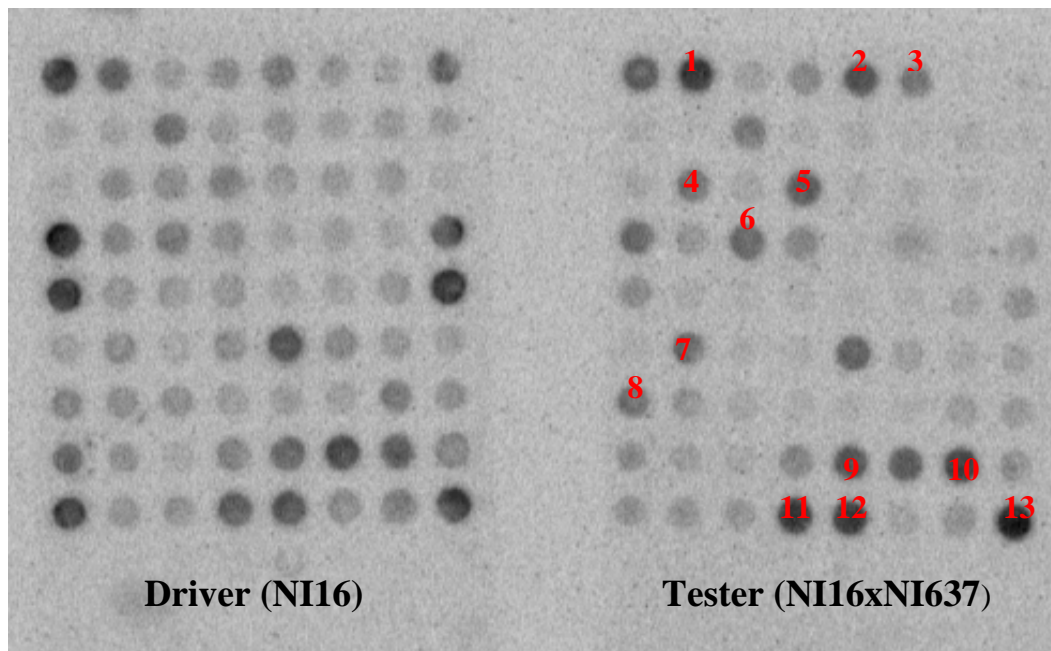


Figure 10 Résultat du Dot Blot après 48 h d'exposition. Les spots numérotés de 1 à 13 présentant une forte intensité chez le « tester » par rapport au « driver » ont été choisis pour le séquençage. Photo : SILUÉ S.

Sur la membrane « tester », 13 clones ont une intensité plus forte que ceux de la membrane « driver ». Ce sont des clones spécifiques à la condition « tester ». Ils ont été choisis pour le séquençage.

Après le séquençage des différents clones, des recherches d'homologie de séquences avec les programmes BLASTN et BLASTX ont été effectuées. Le tableau 8 donne les résultats de l'analyse des séquences et de la recherche d'homologie. Certains clones ont les mêmes séquences. C'est ainsi que les clones 1, 2, 5, 8, 10, 11, 12 et 13 représentent la même séquence (que nous avons nommée SSH_PcPv_1). Les autres clones 3 (SSH_PcPv_2), 4 (SSH_PcPv_3), 6 (SSH_PcPv_4), 7 (SSH_PcPv_5) et 9 (SSH_PcPv_6) représentent des séquences différentes de la première. Nous avons donc 6 clones différents sur les 13 de départ. Les recherches avec le programme BLASTN (recherche d'homologie dans une base de données de séquences de nucléotides) nous donnent les résultats suivants :

- SSH_PcPv_1 et SSH_PcPv_2 ont de très fortes identités, 100% et 96% respectivement, avec la séquence du clone GMFL01-21-C10 de *Glycine max* (L.) Merr. Ce clone est issu d'un programme de séquençage d'une librairie d'ADNc chez le soja (Umezawa *et al.*, 2008) ;

- SSH_PcPv_3 et SSH_PcPv_4 ont aussi des fortes identités avec deux clones SSH-36_01_A09_T3 mRNA (84%) et SSH-62_02_C05_T3 mRNA (93%) de l'espèce *Sesbania drummondii* (Rydb.) Cory obtenus après une SSH. Ces deux clones ont été identifiés chez des plantes de *S. drummondii* ayant accumulé un métal lourd, le plomb (Srivastava *et al.*, 2007) ;
- SSH_PcPv_5 a une bonne identité de 95% avec la séquence de l'ARN ribosomal 18S de l'espèce *Limonium bicolor* (Bunge) Kuntze (Wang *et al.*, 2008).
- SSH_PcPv_6 a une bonne identité de 98% avec la séquence de l'ARN ribosomal 18S de l'espèce *Chlamydomonas reinhardtii* P.A. Dangeard.

Les recherches d'homologie avec les séquences protéiques à l'aide du programme BLASTX ont donné les meilleurs scores avec la protéine cytochrome P450 de *Nicotiana tabacum* L. (SSH_PcPv_1, 84%), des protéines supposées associées au vieillissement des espèces *Pisum sativum* L. (SSH_PcPv_2, 92% et SSH_PcPv_4, 95%) et *Lilium longiflorum* Thunb. (SSH_PcPv_3, 76%) (Hsu *et al.*, 2008), des protéines hypothétiques des espèces *Vitis vinifera* L. (SSH_PcPv_5, 82%) et *Chlamydomonas reinhardtii* P.A. Dangeard (SSH_PcPv_6, 100%).

4 Discussion

Nos essais d'hybridations interspécifiques entre *P. coccineus* et *P. polyanthus* utilisés comme parents femelles et *P. vulgaris* utilisé comme parent mâle, ont mis en évidence les difficultés de réalisation des hybridations (castration des fleurs femelles et pollinisation) et d'obtention de gousses et de graines hybrides. Les résultats présentés montrent que la plupart des gousses obtenues après hybridation avortent entre 3 et 5 JAP, avec 66% de gousses avortées pour les deux types de croisements *P. coccineus* x *P. vulgaris* et *P. polyanthus* x *P. vulgaris*, période où l'embryon est au stade globulaire et donc difficile à sauver *in vitro*. Ces chiffres concordent avec ceux des travaux antérieurs (Lecomte, 1997 ; Geerts, 2001 ; Baudoin *et al.*, 2004). Bien que les travaux antérieurs aient montré les difficultés d'obtenir des hybrides sans embryoculture lorsque *P. coccineus* ou *P. polyanthus* sont utilisés comme parents femelles (Camarena, 1988 ; Mergeai *et al.*, 1997), nous avons pu obtenir des graines hybrides viables qui ont donné des plantes hybrides fertiles (Fig. 6, Fig. 7, tableau 7). Les taux d'obtention de gousses matures hybrides étaient de 0,96% pour les croisements *P. coccineus* x *P. vulgaris* et de 0,14% pour les croisements *P. polyanthus* x *P. vulgaris*. L'obtention de graines hybrides chez des croisements *P. coccineus* x *P. vulgaris* a été déjà signalée par certains auteurs.

Tableau 8 Résultats des recherches d'homologie dans la base de données du NCBI

Clones	Taille (paire de bases)	Recherche d'homologie	Meilleures homologues et numéros d'accès des séquences	Score	Identité %	E value
SSH_PcPv1	320	BLASTN	<i>Glycine max</i> cDNA, clone: GMFL01-21-C10 (AK286061)	576	100 (319) ^a	2e ⁻¹⁶¹
		BLASTX	<i>Nicotiana tabacum</i> cytochrome P450 (BAA10929)	80.5	84 (51)	4e ⁻¹⁴
SSH_PcPv2	293	BLASTN	<i>Glycine max</i> cDNA, clone: GMFL01-21-C10 (AK286061)	479	96 (293)	4e ⁻¹³²
		BLASTX	<i>Pisum sativum</i> putative senescence-associated protein (BAB33421)	164	92 (81)	2e ⁻³⁹
SSH_PcPv3	315	BLASTN	<i>Sesbania drummondii</i> clone SSH-36_01_A09_T3 mRNA sequence (DQ465789)	352	84 (315)	4e ⁻⁹⁴
		BLASTX	<i>Lilium longiflorum</i> putative senescence-associated protein (ABO20851)	123	76 (82)	6e ⁻²⁷
SSH_PcPv4	234	BLASTN	<i>Sesbania drummondii</i> clone SSH-62_02_C05_T3 mRNA sequence (DQ465815)	351	93 (234)	1e ⁻⁹³
		BLASTX	<i>Pisum sativum</i> putative senescence-associated protein (BAB33421)	91.7	95 (45)	2e ⁻¹⁷
SSH_PcPv5	111	BLASTN	<i>Limonium bicolor</i> 18S ribosomal RNA gene, partial sequence (EU039827)	178	95 (111)	5e ⁻⁴²
		BLASTX	<i>Vitis vinifera</i> hypothetical protein (CAN65763)	37.4	82 (23)	0.40
SSH_PcPv6	193	BLASTN	<i>Cratylia argentea</i> 18S ribosomal RNA gene, partial sequence (AF525294)	334	98 (193)	6e ⁻⁸⁹
		BLASTX	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> hypothetical protein (XP_001698950)	80.5	100 (30)	4e ⁻¹⁴

^a : Les nombres entre parenthèses indiquent le nombre de nucléotides ou d'acides aminés utilisé pour chaque comparaison

En effet, Nassar (1978) obtint un taux de réussite de 1,2% et Angeles (1986) un taux de 8,3%. Cependant les graines obtenues dans le dernier cas n'étaient pas viables comme ce fut le cas pour la graine hybride NI1111 x G21245 que nous avons obtenue. Il en est de même pour Nguema (2007) qui obtint 16 graines hybrides dans ce type de croisement ; sur 8 graines semées, 4 ont germé et la croissance de deux plantules s'est arrêtée deux semaines après la germination. Pour les croisements *P. polyanthus* x *P. vulgaris*, Camarena (1988) a eu recours à l'embryoculture pour la régénération de trois plantes hybrides. Les travaux de Lecomte (1997) et de Geerts (2001) ne mentionnent pas l'obtention de plantes hybrides pour ce type de croisement. Tous ces résultats confirment la difficulté de l'obtention des hybrides *Phaseolus* lorsque *P. coccineus* ou *P. polyanthus* sont utilisés comme parents femelles.

Comme nous l'avons mentionné plus tôt, les gousses supposées hybrides contenaient aussi des graines issues d'autofécondation et qui ont donné après germination des plantes identiques aux génotypes femelles (observations morphologiques et marqueur microsatellite). Ceci montre qu'au moment de la pollinisation avec les grains de pollen de *P. vulgaris*, les stigmates des génotypes femelles contenaient des grains de pollen issus de la plante mère elle-même, ce qui a donné lieu à la présence des deux types de grains de pollen sur le stigmate des fleurs femelles. Ce mélange de grains de pollen aurait-il facilité la fécondation d'un ovule par un pollen de *P. vulgaris* ? L'utilisation de mélange de grains de pollen des génotypes mâles et femelles pour la réussite des hybridations interspécifiques a été mentionnée chez certaines espèces. C'est ainsi que chez la tomate *Lycopersicon esculentum* Mill., l'hybridation avec *L. peruvianum* (L.) Mill. et *L. chilense* Dunal n'est possible que grâce à la culture *in vitro* d'embryons ou par pollinisation avec un mélange de grains de pollen venant des deux parents à hybrider (Laterrot, 1983). Avec cette technique, 1 à 5% d'hybrides ont été produits. Cette technique de mélange de grains de pollen des deux parents pourrait être exploitée chez *Phaseolus* pour augmenter la réussite des hybridations interspécifiques. Elle pourrait aussi être associée à celle de grains de pollen prégermés (PGP, pregerminated pollen). Cette dernière technique déjà utilisée chez *Phaseolus* consiste à faire germer des grains de pollen *in vitro* avant la pollinisation de la plante femelle. Les grains de pollen sont récoltés sur des fleurs fraîchement ouvertes et mis à germer sur un milieu de culture BK (Brewbaker & Kwack, 1963). La pollinisation des fleurs femelles se fait lorsqu'environ 65% des grains de pollen ont germé (Gurusamy *et al.*, 2007). Ces derniers auteurs ont également associé à cette technique une autre (cut-style) qui consiste à enlever une partie du style avec stigmate avant la pollinisation. L'association PGP et cut-style a permis d'obtenir environ 69% de fécondation 2 h après de pollinisation dans certains croisements où la fécondation ne commence que 22 h

après une pollinisation normale. Ces deux techniques PGP et cut-style associées au mélange de pollen pourraient apporter de meilleurs résultats lors des hybridations interspécifiques entre *P. vulgaris* et les espèces *P. polyanthus* et *P. coccineus*.

Des ADNc différemment exprimés dans les graines hybrides *Phaseolus* en cours d'avortement ont été identifiés. Le séquençage et l'analyse des ADNc amplifiés révèlent que ces séquences codent pour trois types de protéines. Il s'agit de la protéine cytochrome P450, des protéines supposées associées à la sénescence (vieillessement) et des protéines hypothétiques. Les protéines hypothétiques et les protéines supposées associées au vieillissement sont des protéines dont on ne connaît pas encore les fonctions. L'identification d'ADNc codant pour des protéines supposées liées au vieillissement peut être due à la dégénérescence des graines en cours d'avortement. En effet, ce type de protéines est identifié dans les cellules en fin de cycle. La sénescence peut être définie comme une séquence des événements biochimiques et physiologiques qui se traduisent par la dégradation ordonnée des constituants cellulaires puis la mort de la cellule (Morot-Gaudry, 1997). Les cytochromes P450s sont des monooxygénases capables de catalyser un grand nombre de réactions différentes dont des hydroxylations, des déalkylations, des désaminations, des oxydations, des déhalogénations, des dimérisations, des isomérisations ou des époxydations. De part cette grande diversité, les cytochromes P450 sont impliqués dans de nombreuses voies de biosynthèses (Nultsch, 1998 ; Noordermeer *et al.*, 2001 ; Hehn, 2007). Chez les plantes on peut distinguer différents groupes de P450s : les P450s qui sont essentiels à la survie des plantes et qui participent à la synthèse de polymères structuraux, des stérols membranaires ou des hormones ; les P450s qui interviennent dans la métabolisation de xénobiotiques ; les P450s qui sont impliqués dans les réactions de défense des végétaux ou dans le « dialogue » avec d'autres organismes ou avec l'environnement. De nombreux gènes P450s ont été isolés chez les plantes : 272 gènes identifiés chez *Arabidopsis*, plus de 450 gènes chez le riz, plus de 370 chez *Medicago truncatula* (Hehn, 2007). Le type de cytochrome identifié dans les graines des plantes est le cytochrome b₅ (Napier *et al.*, 1995) qui participe à la réduction du cytochrome P450 (Noshiro & Omura, 1978). Par ailleurs, une mutation dans le gène du cytochrome P450 (CYP724B1) chez le riz entraîne une réduction de la taille des graines due à une diminution de l'activité du cytochrome (Tanabe *et al.*, 2005).

Chapitre VI : Histological studies of *Phaseolus vulgaris* L. aborting embryos from plants defective in seed development

1 Introduction

A major objective of the research work conducted in our laboratory is to study the process of embryogenesis in *Phaseolus* genus in order to understand the incompatibility barriers occurring during interspecific hybridisations and to overcome these barriers. To achieve this objective, one way is to perform interspecific crosses and to collect aborting embryos; another possibility is to examine, from induced mutagenesis abnormal embryos arrested before maturity. Because interspecific crosses in genus *Phaseolus* lead to early abortion of the hybrid embryos, it is difficult to obtain degenerate seeds at late developmental stages (Baudoin *et al.* 1992; Baudoin *et al.* 2004; Toussaint *et al.* 2004). With mutagenized material, it is possible to obtain plants producing degenerate seeds at different steps of seed development (Meinke 1985; Consonni *et al.* 2003; Vernoud *et al.* 2005). This mutagenized material can help to a better understanding of embryo abortion mechanism.

In common bean, chemical mutagenesis is efficient, reliable, and well understood. Although different agents have been used, mutagenesis with EMS has been the most successful for experiments (Davis *et al.* 1988; Park and Buttery 1992; Pankhurst *et al.* 2004). EMS alkylates primarily guanine leading to mispairing: alkylated G pairs to T instead of C. Typically, seeds are soaked in EMS solution, rinsed and sown. These seeds represent the first generation of mutagenesis (M1, with “M” as Mutagenized generation). Because each cell of the embryo is mutagenized independently of the other cells, plants of the first generation are chimeras. To identify specific phenotypes, screening starts at the second generation (M2) where mutations are homozygous (Henikoff & Comai, 2003). Each family of mutagenized plants includes the plant obtained in M1 generation after seed treatment and the progenies from this plant.

The present paper aims to characterize phenotypical embryo pattern in plant line showing failure in seed development. For this purpose, we first screened a M2 EMS mutagenized population of common bean for plants defective in seed development. We then characterized these selected plants by comparing their embryo pattern to *Phaseolus* wild-type embryo during seed development. These results were discussed and the abnormalities were compared to those observed in *Phaseolus* degenerated hybrid embryos and in *Arabidopsis* aborting embryos obtained from induced mutations. We finally determined the inheritance of “seed

abortion” trait through analysis of F2 plants derived from crosses between selected plants and wild-type plants.

2 Materiel and methods

2-1 EMS mutagenesis and plant growth conditions

The mutagenesis protocol was first established by Pankhurst *et al.* (2004) in the University of Geneva (Switzerland). Common bean line BAT93 from the “Centro Internacional de Agricultura Tropical” (CIAT) in Colombia was used as plant material. BAT93 is a breeding line and its pedigree is (Veranic x Tlalnepantla 64) x (Jamapa x Tara). The variety BAT93 has genes controlling resistance to Bean Common Mosaic Virus, common bacterial blight, rust and anthracnose (Kami & Gepts, 2000). Briefly, 40 g of BAT93 seeds were treated with 200 ml of 30mM EMS overnight (approximately 16 hours) at the room temperature with slow shaking; seeds were rinsed and sown. Plants were grown in growth chambers at the University of Geneva and Gembloux Agricultural University (Belgium), at approximately 27°C/23°C (day/night), 75% relative humidity and 12 hrs photoperiod. Seeds were harvested from the M1 plants obtained after seeds treatment and sown to generate M2 plants. For our study, screening was done within the M2 population in order to select plants deficient in seed development.

2-2 Histological studies

The histological observations were carried out to determine the abnormalities that occur during embryo abortion in the mutagenized samples. The protocol was adapted from Bonhomme *et al.* (2000) and Geerts *et al.* (2002) but included modifications. Developing seeds (n = 4) from wild-type and mutagenized plants deficient in seed development at 0, 3, 5, 7, 10 and 12 days after anthesis (DAA) were harvested and fixed in 2% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7) for at least 24 hours at 4°C. Fixed tissues were dehydrated in a graded ethanol series, infiltrated and embedded in methacrylate resin (Technovik 7100) according to standard procedures. Embedded samples were sectioned with a microtome at 5-7 µm. The sections were stained with toluidine blue and examined by a Nikon microscope (Model Eclipse E800). Embryo proper and suspensor lengths were measured for each age to compare the evolution of these components between the two samples during seed growing.

2-3 Genetic analysis

EMS mutagenized selected plants, deficient in seed development were reciprocally (as male and female) crossed with the wild-type plants. F2 plants derived from these crosses were scored for seed development to determine the proportion of plants defective in seed development. The observed ratio of plants defective in seed development was tested against the expected ratio according to Mendel laws using chi-square test.

3 Results and discussion

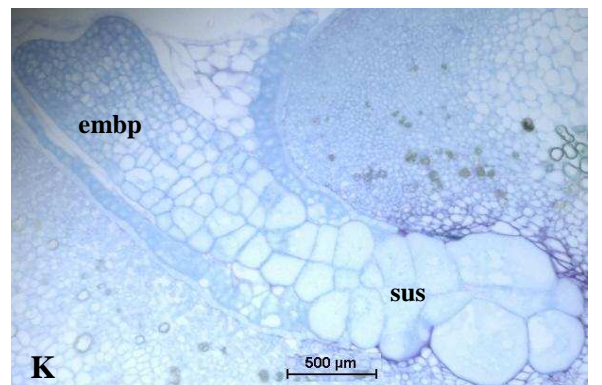
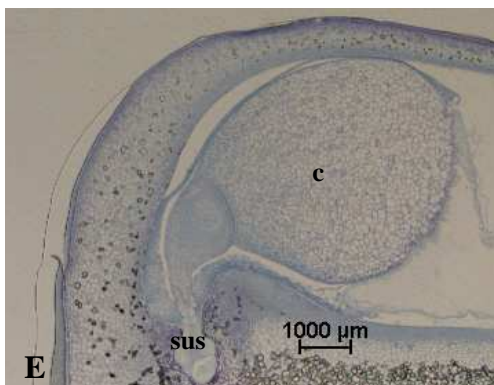
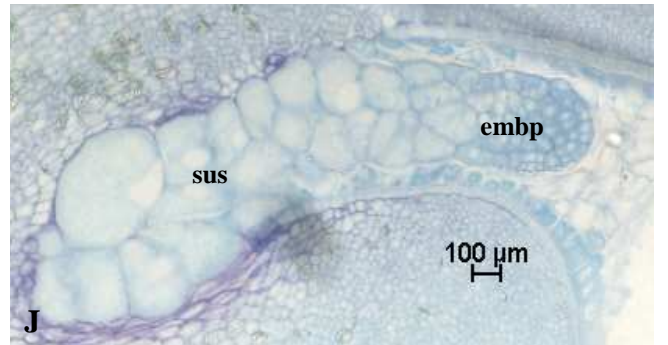
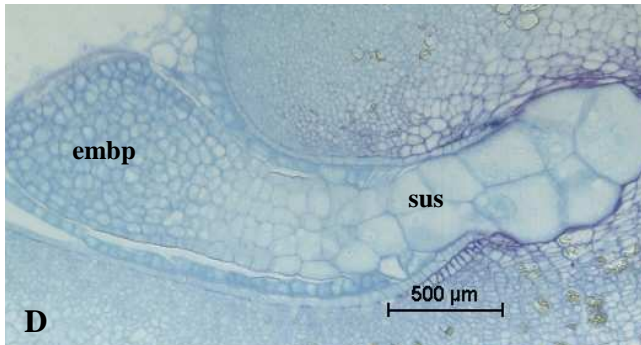
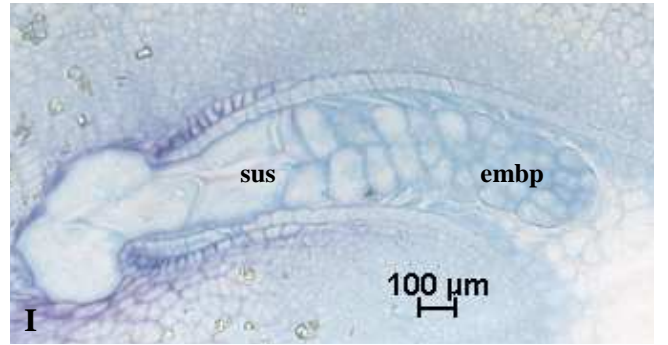
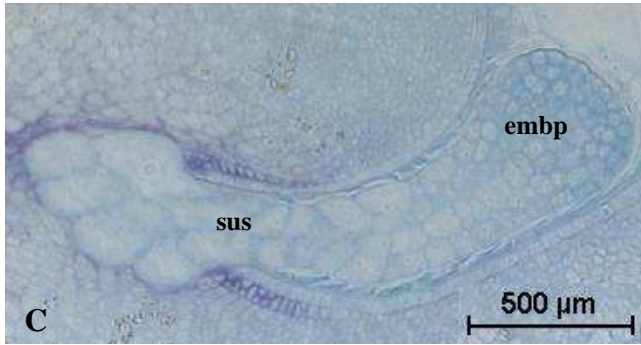
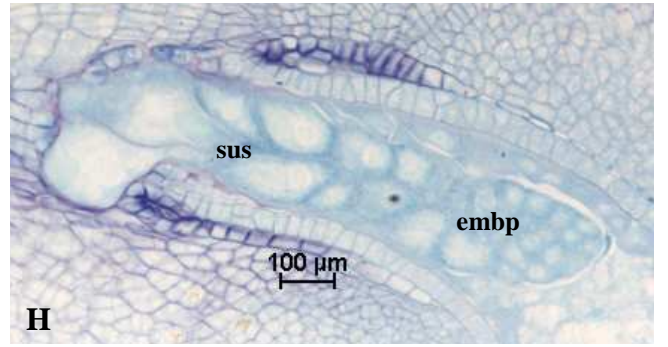
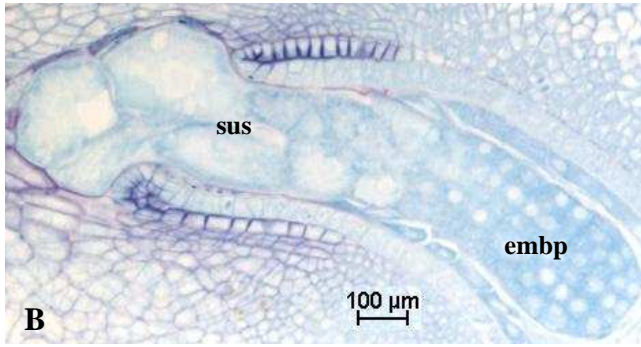
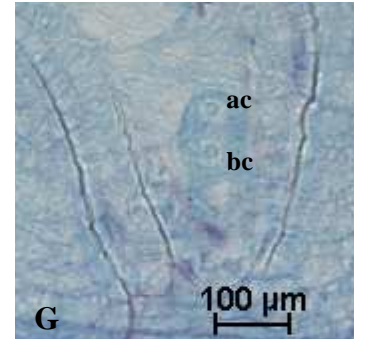
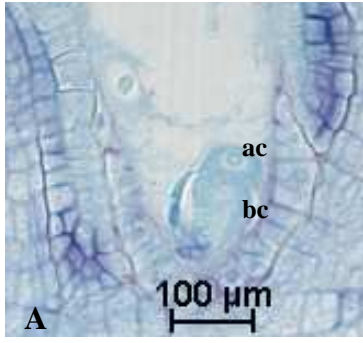
3-1 Histological studies of embryo development of *Phaseolus vulgaris* EMS mutagenized plants deficient in seed development

For our study, we screened a total of 365 M2 plants from 60 EMS mutagenized seeds (M1 generation) in order to isolate plants deficient in seed development. In the M2 progenies, only 2 plants from one family (identified as 522) showed the desired trait, i.e. seed abortion before maturity. Embryos inside degenerate seeds failed to grow normally, showing abnormalities mainly in suspensor and embryo proper from the early steps of development (3 DAA). These abnormalities increase during seed development and led to the embryo abortion before maturity. Figure 11 shows from the anthesis to 12 DAA, the histological patterns of abnormal embryos from plants 522 compared to the normal ones of the wild-type samples. As shown in figures 11A and 11G, no difference can be observed between the two samples at the anthesis. There are small apical and large basal cells in each sample derived from the transversal and asymmetric divisions of the zygote. From 3 to 12 DAA, the wild-type embryos (Fig. 11B, 11C, 11D, 11E and 1F) grow normally from the globular stage to the cotyledonary one with the early heart-shaped stage at 7 DAA (Fig. 11D) and the early cotyledonary stage at 10 DAA (Fig. 11E). From 3 DAA to 7 DAA, the wild-type embryo has regular cells and is composed by three cytological zones: the embryo proper containing small isodiametric cells; the basal part of the suspensor consisting of hypertrophic cells, which elongated, invaded the micropylar integument tissue and enlarged during this period; and the suspensor “neck zone” (i.e. the zone between the basal part of the suspensor and the embryo proper) consisting of enlarged isodiametric cells. After 7 DAA, the wild-type embryo reaches the heart-shaped stage and primordia of the cotyledons are initiated at the chalazal side of the embryo. Cotyledons continue its growth and the embryo reaches the cotyledonary stage at about two

weeks after anthesis, while the size and the number of suspensor cells decrease (Fig. 11F). During the same period of development in plants 522 samples, embryo growth is disturbed and the embryo proper is still globular at 7 DAA (Fig. 11J). It reaches heart-shaped stage at 10 DAA (Fig. 11K). At 12 DAA (Fig. 11L), the embryo forms small cotyledons and occupies about $\frac{1}{4}$ of the seed volume and the suspensor contains large cells, compared to that observed in the wild-type sample where the embryo occupies the whole seed. Plants 522 embryos are delayed in their growth and size, have a large suspensor and abort before seed maturity.

The characteristics described above in wild-type samples, are those observed during a normal development of dicot embryos, as described by Yeung and Clutter (1979), Geerts (2001), Nguema *et al.* (2007a) in *Phaseolus*. During the development of the suspensor three stages are distinguishable: the proliferation stage, which ends with a pro-embryo composed of diploid cells; the differentiation stage, during which the suspensor grows endomitotically, and the embryo mitotically; and the functional stage, during which the mature suspensor probably nourishes the rapidly growing embryo, especially the cotyledons. When the cotyledons reach the chalazal end of the embryo-sac, the suspensor cells are crushed after a short degeneration period. During seed development, the suspensor anchors the embryo to the endosperm and serves as a conduit for nutrients and growth factors for the developing embryo (Laux and Jürgens 1997; Rademacher and Weijers 2007).

Figure 12 represents the evolution of suspensor length and the ratio of suspensor length to embryo length in both wild-type and plants 522 samples during seed development. These ratios reflect changes in suspensor length compared to the development of the embryo. During the last steps of seed development in wild-type sample, the suspensor's size starts to decline after 10 DAA until its complete disappearance. In contrast, in plant 522 samples, the suspensor continues to grow after 10 DAA (Fig. 12). These observations support the idea that continued growth of the suspensor in the wild-type sample is inhibited by the embryo proper at the last stages during normal development (Yeung and Meinke, 1993). In plants 522 samples, the embryo proper loses the capacity to inhibit the suspensor growth which continues to grow and contains longer cells in the basal part than in the wild-type sample at 12 DAA (Fig. 11F and 11L). In the wild-type sample, the embryo proper becomes longer than the suspensor between 7 and 8 DAA, while in the plants 522 samples, this character is observed at around 11 DAA. This means that in degenerated samples, the embryo development is affected during seed development to the detriment of the suspensor's one.



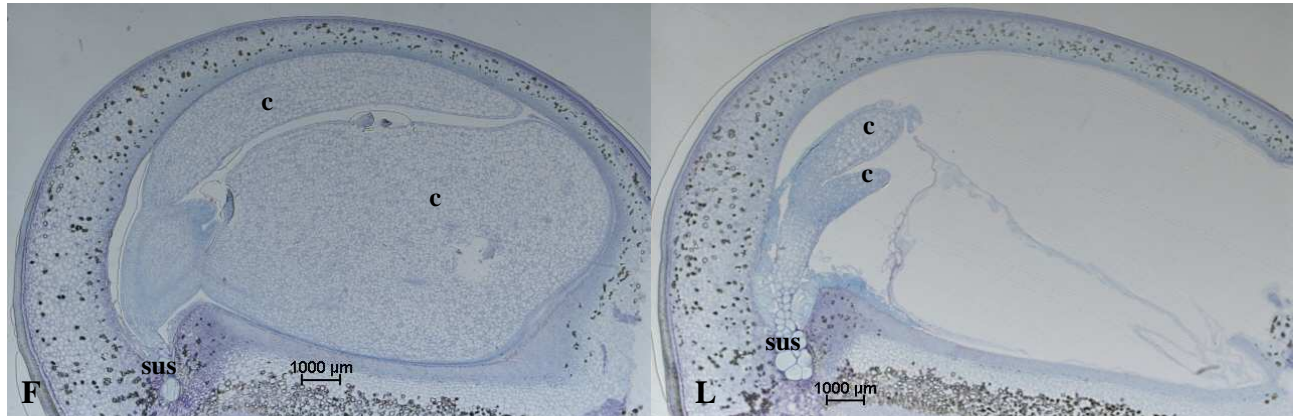


Figure 11 Longitudinal sections of *Phaseolus vulgaris* BAT93 developing embryos at 0 (A and G), 3 (B and H), 5 (C and I), 7 (D and J), 10 (E and K) and 12 (F and L) days after anthesis (DAA). Sections A, B, C, D, E and F represent the wild-type samples while sections G, H, I, J, K and L represent the mutagenized samples. Excepted the samples at the anthesis where there is no difference, embryos from mutagenized samples are delayed in their growth. ac: apical cell, bc: basal cell, sus: suspensor, embp: embryo proper, c: cotyledon. Pictures : SILUÉ S.

Identical results were obtained in mutants obtained following induced mutations in *Arabidopsis* by Schwartz *et al.* (1994) with *suspensor* (*sus*) mutants, Yadegari *et al.* (1994) and Apuya *et al.* (2002) with *raspberry* (*rsy*) mutants. In these mutants, the embryo proper possesses an enlarged suspensor and exhibits aberrant development. In *sus* mutants, aberrant morphogenesis in the embryo proper consistently results in the formation of a large suspensor. Defects in the embryo proper appear at the globular stage of development while abnormalities in the suspensor are detected soon after at the heart stage. In *rsy3*, embryo has “raspberry-like” cellular protuberances with an enlarged suspensor and is arrested morphologically at the globular stage of embryo development. On the other hand, in *Phaseolus* interspecific crosses, embryo abortion was partially attributed to the disruption of suspensor morphogenesis (Lecomte *et al.*, 1998). Indeed, in the crosses with *P. vulgaris* as male parent and *P. coccineus* or *P. polyanthus* as female parents, the hybrid embryo showed a suspensor hypertrophy, resulting in smaller and delayed embryo proper, compared to embryo from the parental lines. At the micropylar end, basal cells of the suspensor were bigger and contained larger vacuoles compared to the self-pollinated embryos (Lecomte *et al.* 1998, Nguema *et al.* 2007b). These abnormalities in the suspensor morphology could limit the nutrient transfer to the embryo and lead to its abortion.

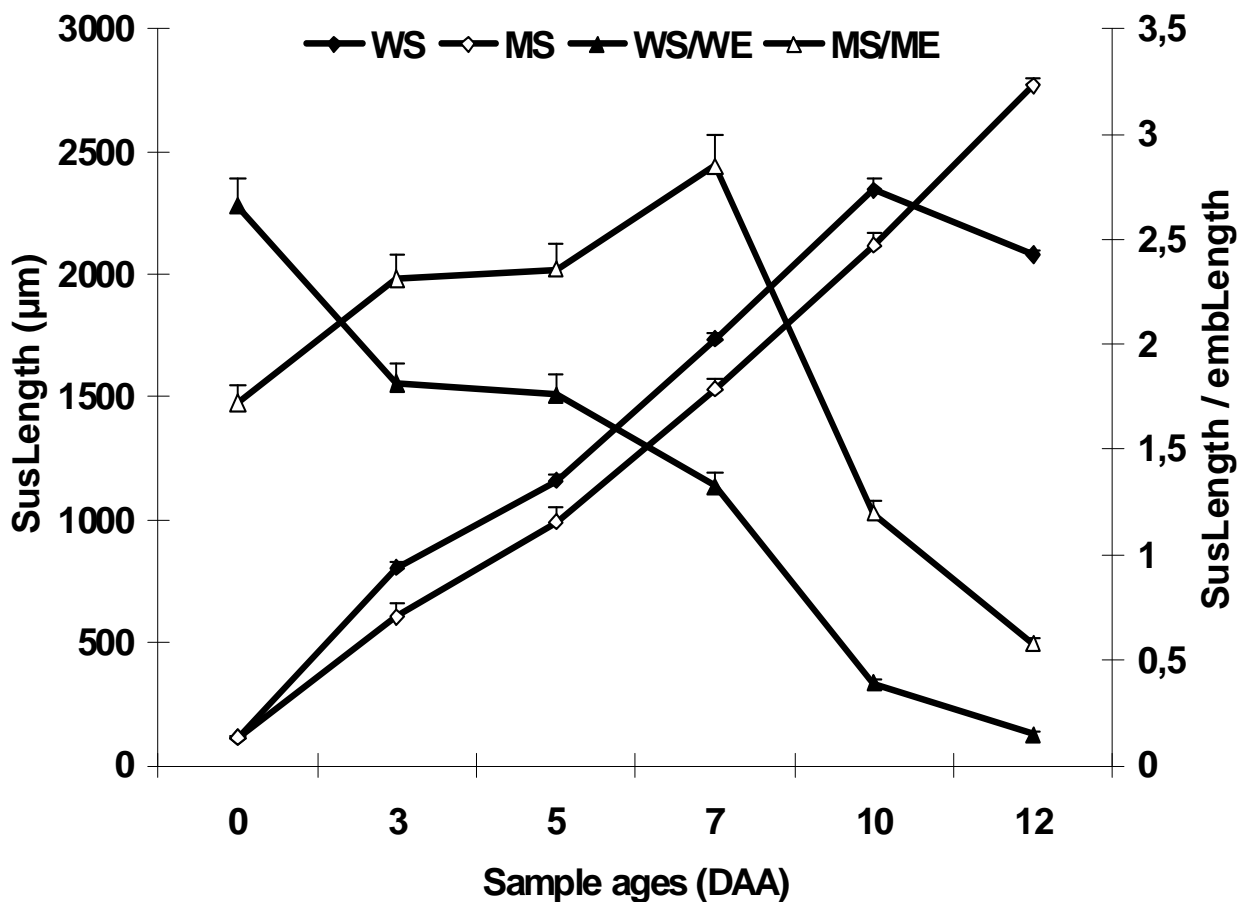


Figure 12 Suspensor length (left y-axis) and ratios of suspensor length to embryo length (right y-axis) in wild-type and mutagenized samples during seed development. DAA: days after anthesis, E: embryo, M: mutagenized sample, S: suspensor, W: wild-type. Error bars represent the standard error of the mean (SEM).

3-2 Inheritance of the “seed abortion” trait

In order to determine the inheritance of the “seed abortion” trait, mutagenized plants with aborting seeds isolated from an EMS M2 population were reciprocally crossed with the wild-type plants. In a first approach F2 plants derived from these crosses were scored for seed development to determine the proportion of plants defective in seed development. This observed ratio was tested against the expected ratio according to Mendel laws using chi-square test. Genetic analysis of F1 and F2 populations revealed that this trait was maternally inherited: if a plant defective in seed development was pollinated with wild-type pollen, the F1 seeds aborted before maturity. If a wild-type plant was pollinated with pollen from plant 522, the F1 seeds had the normal phenotype (embryo without abnormalities) and germinated

to produce normal F1 plants. The F1 plants were self-pollinated and all F2 seeds had this wild-type phenotype as well. In F2 generation, 96 plants were scored for seed development: 73 plants had wild-type phenotype and produced normal seeds while 23 plants did not produce mature seeds, all the seeds aborted before maturity. These data fit a 3:1 ($\chi^2 = 0.01$, $df = 1$, $P > 0.05$) segregation ratio, indicating that the trait “aborting seed” was controlled by a single recessive gene.

4 Conclusion and prospects

The aim of this study was to isolate and to characterize *Phaseolus* plants deficient in seed development. These plants were isolated in the second generation of an EMS mutagenized population of *P. vulgaris* cv. BAT93. Aborted embryos from these plants showed abnormalities mainly in suspensor and cotyledons at globular, heart and cotyledon stages and aborted before maturity. After fertilisation, there is no difference between the two samples embryos where we observed a small apical cell and a big basal one. During embryo development in mutagenized samples, the suspensor with large cells disturbs the development of the embryo which aborts before seed maturity compared to those observed in wild-type samples.

Genetic analyses of F2 population from the crosses between the selected plants and the wild-type plants indicated that the “seed abortion” phenotype is controlled by a single recessive gene. Additional tests such as backcrossing between plants from line 522 and hybrids F1 could be performed to confirm what was obtained in F2 analysis. A progeny testing of the F3 generation could be attempted to confirm the 3:1 segregation ratio obtained in the F2. Within the 73 F2 plants with normal phenotype, 24 should be homozygous wild-type and 48 should be heterozygous.

To our knowledge this is the first report of plant line defective in seed development in *Phaseolus* genus. This is a valuable material for *Phaseolus* embryogenesis studies. This material can be used to isolate and characterize different genes interacting during embryo formation, development and abortion. The cDNAs differentially expressed in the aborted embryos will help in understanding the mechanism of embryo defect and abortion.

Chapitre VII : Characterization of cDNAs isolated from *Phaseolus vulgaris* L. aborting seeds by suppression subtractive hybridization (SSH) and quantitative RT-PCR techniques

1 Introduction

In the previous chapter, we described the isolation of common bean plants line deficient in seeds development after EMS mutagenesis. In this section, we characterized this plants line using the technique of suppression subtractive hybridization (SSH) in order to isolate cDNAs differentially expressed in the aborting seeds compared to the wild-type samples. Total RNAs were extracted from two seed types: degenerate seeds of plants from EMS mutagenized seeds and normal seeds of wild-type plants; the cDNAs of both types of samples were compared in order to isolate differentially expressed genes between them, with cDNAs from wild-type samples as “driver” and cDNAs from mutagenized as “tester”. Subtracted cDNAs were cloned, sequenced and compared to the non-redundant National Center for Biotechnology Information (NCBI) nucleotide and protein databases. Specific primers of five potential clones that seemed interesting in respect of their putative function were designed and used to perform semi-quantitative RT-PCR reactions on both types of samples. The roles of the proteins encoded by these sequences and their probable involvement in seed development were discussed.

2 Material and methods

2-1 Plant material and growth conditions

A M2 population from EMS mutagenized seeds of common bean line BAT93 from the “Centro Internacional de Agricultura Tropical” (CIAT) in Colombia was screened to isolate plants deficient in seed development. This population was first established by Pankhurst *et al.* (2004) in the University of Geneva (Switzerland). Briefly, 40 g of BAT93 seeds were treated with 200 ml of 30mM EMS overnight (approximately 16 hours) at the room temperature with slow shaking; seeds were rinsed and sown. Plants were grown in growth chambers at the University of Geneva and at Gembloux Agricultural University (Belgium), at approximately

27°C/23°C (day/night), 75% relative humidity and 12 hrs photoperiod. Seeds were harvested from these M1 plants and sown to generate M2 plants.

2-2 RNA isolation and cDNA synthesis

Total RNAs were extracted from developing seeds of wild-type and selected M2 plants using the following protocol. Seeds were ground to a fine powder in liquid nitrogen and transferred to an Eppendorf tube (100 mg plant material). Warm RNA (65°C) extraction buffer (745 µl: 100 mM Tris-HCl pH 8, 20 mM EDTA pH 8, 0.5 M NaCl, 0.5 % SDS, 1 % β-Mercaptoethanol) was added and the mixture was homogenized. Then 150 µl of phenol was added, the mixture was vortexed for two min and incubated at 65°C for 10 min. Chloroform (450 µl) was added, the extract was gently vortexed, incubated on ice for 15 min and centrifuged 10 min at 9,000g at 4°C to collect the supernatant into two new tubes. RNA was precipitated by 1.5 V of 4 M LiCl and incubation on ice in cold room for 3 h followed by centrifugation for 15 min at 14,000g at 4°C to collect the pellet. The pellet was resuspended in 250 µl of DEPC treated water (dH₂O). At this step, we treated the samples with DNase I to remove DNA remains by adding 1/10 V of 10X DNase I buffer (200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM KCl, 20 mM MgCl₂) and 10 U of DNase I RNase-free to samples, and incubation 15 min at room temperature. RNAs were extracted once with phenol, twice with chloroform. 1/10 V of 3 M NaAc pH 5.2 and 3 V of ethanol were then added to the top aqueous phase. The mixture was incubated overnight at -80°C, centrifuged 30 min at 12,000g (4°C) and the pellet was washed twice with 700 µl of 70% EtOH. The pellet was dried and resuspended in 50-70 µl of dH₂O and stored at -80°C. Double strand cDNAs were synthesized using Invitrogen's SuperScript™ Double-Stranded cDNA kit with 10 µg of total RNAs according to the manufacturer's instructions.

2-3 Suppressive Subtractive Hybridization (SSH)

The primer and adapter sequences used in Suppressive Subtractive Hybridization and PCR reactions are listed in table 9. The SSH technique was adapted from Li *et al.* (2002) using developing seeds from mutagenized plants deficient in seed development as tester and from wild-type plants as driver. Two micrograms of each cDNA were digested with 15 U of RsaI for 3 h at 37°C. The enzyme was then inactivated at 60°C. Digested cDNAs were purified and resuspended in 10 µl of dH₂O. Two subsets of the digested tester cDNA (120 ng) were

separately ligated overnight at 16°C with 2 µM of the adapters A1 or A2 in a 10 µl final volume by 1 U of T4 DNA ligase. The enzyme was inactivated at 70°C by adding 1 µl of 0.2 M EDTA. The digested driver cDNA (600 ng) was added to 1.5 µl of each of the adaptor-ligated tester cDNAs. Two microliters of 5X hybridization buffer (250 mM Hepes pH 8, 2.5 M NaCl, 1 mM EDTA) were added to each tube in a final volume of 10 µl, and the samples were denatured for 1.5 min at 98°C and incubated for 1.5 h at 63°C. After this first hybridization, the two subsets were combined, 300 ng of denatured (94°C, 3 min) digested driver cDNA was added in 3 µl of 1X hybridization buffer and the sample was allowed to hybridize overnight at 63°C. Two PCR amplifications were performed. The first was conducted in 25 µl and contained 1 µl of subtracted cDNA, 0.3 µM of P1 primer, 1.5 mM of MgCl₂, 0.2 mM of dNTP, 1 U of Taq polymerase and 1X reaction buffer. PCR was conducted according to the following parameters: 72°C for 2 min, 25 cycles at 95°C for 30s, 60°C for 30s, 72°C for 1.5 min, final extension at 72°C for 7 min. One microliter of this PCR product was used as template for the second “nested” PCR with primers PN1 and PN2. Twenty cycles were performed with 66°C as annealing temperature. The product of the second PCR was loaded on a 1.5% agarose gel stained with ethidium bromide.

2-4 Subtracted cDNAs cloning and sequencing

Amplified fragments from the second PCR were extracted from the gel, inserted into the pCR2.1 vector plasmid and transformed into *E. coli* with selection for ampicillin resistance. Bacteria were then spread on Luria-Bertani (LB) agar plates containing ampicillin and X-gal. After overnight growth, random transformant white clones were picked to 2 ml of LB medium and cultured overnight at 37°C under agitation. Plasmids were extracted and cDNAs sequencing were carried out with LICOR System (IR², DNA Analyzer). BLAST sequence homology analyses were performed using the National Center for Biotechnology Information BLAST network service.

2-5 Quantitative RT-PCR

After fragments sequencing and homology analysis, specific primers were designed from five sequences that seemed interesting in respect of their putative function and used to perform semi-quantitative RT-PCR. One microgram of total RNAs from developing seeds of the two types of samples was first reverse transcribed using the ImProm-IITM Reverse Transcription

System kit. Eighty microliters of dH₂O were added to the final reaction. One microliter of the diluted RT mixture was used for the PCR amplification. As internal control, 18s rRNA primers were used. PCR reaction was conducted according to the following parameters: 94°C for 3 min, (25, 30 and 35) cycles at 94°C for 30s, primer-specific annealing temperature (Table 9) for 45s, 72°C for 1min. Amplification products were separated by a 1.5% agarose gel stained with ethidium bromide and the bands were quantified with the Quantity One Quantification software package (Biorad, Version 4). The values were normalized to the levels of 18S rRNA. The PCR experiments were repeated at least three times.

Tableau 9 Oligonucleotides used for suppression subtractive hybridization and for quantitative RT-PCR

Oligonucleotides	Sequences	RT-PCR Annealing temperatures
Adapter 1-1	5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCGCCCGGGCAGGT-3'	
Adapter 1-2	3'-GGCCCGTCCA-5'	
Adapter 2-1	5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCAGCGTGGTCGCGGCCGAGGT-3'	
Adapter 2-2	3'-GCCGGCTCCA-5'	
Primer P1	5'-CTAATACGACTCACTATAGGGC-3'	
Nested primer PN1	5'-TCGAGCGGCCGCCCGGGCAGGT-3'	
Nested primer PN2	5'-AGCGTGGTCGCGGCCGAGGT-3'	
Cytochrome P450	C-F ATGTGCCGCCCCAGCCAAACT C-R TTCCGTGAATCGGAAGCGGGG	59°C
MIPS	M-F AATGACACCACGGAGAACCT M-R CGCAACGTAAGGCACATACT	45°C
Cationic peroxidase	P-F CATTGAGACCATCAAAGAAGC P-R ACAACGGTGCACCAACTTCA	57°C
VDAC	V-F ACACAGCATGCTCTGGACCC V-R TTGGGAAGGCGAAACCCTAC	59°C
Sucrose synthase	S-F ACCGTGTGATCAGTGACACCA S-R TCTCTCCAATACGTTGGAGAC	59°C

MIPS : Myo-inositol 1-phosphate synthase

VDAC : Voltage-dependent anion channel

3 Results

3-1 Screening of M2 EMS mutagenized plants of *Phaseolus vulgaris*

We screened a total of 365 M2 plants from 60 EMS mutagenized seeds in order to isolate plants deficient in seed development. Each family of mutagenized plants includes the plant in M1 generation after seed treatment and the progenies from this plant. In the M2 progenies,

only one family (identified as 522) showed the desired trait, i.e. seed abortion before maturity. This trait was observed on 2 plants in the family 522. Embryos inside degenerate seeds failed to grow at globular, heart and cotyledon developmental stages: they were characterized by small size and showed very often degraded suspensors and merged cotyledons compared to the wild type (Fig. 13). In general *Phaseolus vulgaris* normal embryos reach the cotyledon stage around 10 days after anthesis (DAA) (Yeung & Clutter, 1979). In selected mutagenized plants, embryo growth is slower, with embryos reaching the globular and heart developmental stages 16 and 18 DAA respectively (Fig. 13A and 13B). When the embryos reach the cotyledon stage (Fig. 13C, 13D and 13E), the cotyledons are small, misshapen or merged compared to the wild-type embryo (Fig. 13F).

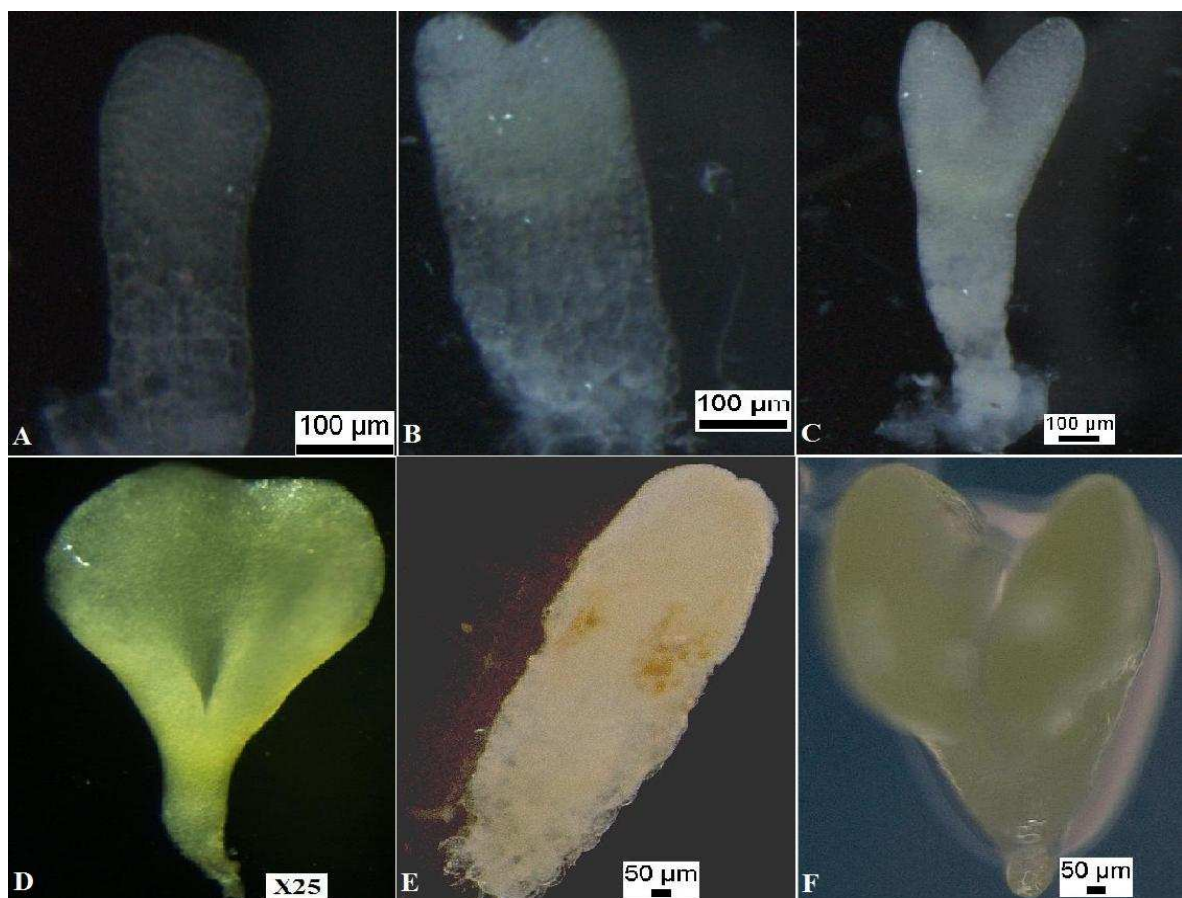


Figure 13 *Phaseolus vulgaris* embryos. A-E: embryos from mutagenized M2 plants stop growing at globular (A, 16 DAA), heart (B, 18 DAA) and cotyledon (C-E, 20 DAA) stages. F: a wild type embryo at cotyledon stage 20 DAA. Abnormal embryos show small size and merged cotyledons. Pictures: SILUÉ S.

3-2 SSH products and sequence analysis

The Suppressive Subtractive Hybridization was performed using degenerate developing seeds at 12 DAA from the M2 plants 522 as a “tester” and the developing normal seeds from the wild type as a “driver”. The sizes of the second “nested” PCR products ranged from 100 to 700 bp with eight predominant bright bands (Fig. 14).

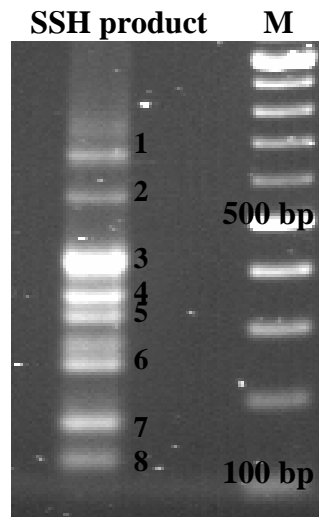


Figure 14 Agarose gel of subtracted fragments from the SSH reaction. M: DNA molecular weight marker. Picture: SILUÉ S.

Fragments revealed by the SSH reaction were extracted from the gel, cloned and sequenced. A total of 50 clones were sequenced twice. EcoRI and adapters sequences were removed, and one unique sequence was determined from the alignment of the two cDNA sequences. The cDNAs are partial sequences. A first BLASTN sequence homology analysis was performed with the obtained sequences. Clones which showed best homology with the same sequence in databases were aligned all together to design a consensus sequence. Finally from the 50 different clones, we were able to assemble them into ten individual sequences named SSH_Pv_E1 to SSH_Pv_E10 according to their size ranging from 210 to 618 base pairs and the number of clones sequenced (Table 10).

A BLASTX sequence homology analysis was performed to search for known proteins homologous to the 10 individual clones. Table 11 summarizes the sequence analysis and indicates, according to NCBI database, similar plant nucleotide and protein in various taxa.

Table 10 Number of clones sequenced from fragments obtained after SSH as showed in figure 14 and composition of each group of sequences.

Sequence groups	Length (bp)	Number of clones by fragment								Number of clones
		1	2	3	4	5	6	7	8	
SSH_Pv_E1	618	5				2	1			8
SSH_Pv_E2	519		4							4
SSH_Pv_E3	489		2							2
SSH_Pv_E4	385		1	6				3	3	13
SSH_Pv_E5	382			1						1
SSH_Pv_E6	315				3					3
SSH_Pv_E7	295				1	1				2
SSH_Pv_E8	292	1		2						3
SSH_Pv_E9	285				3	6				9
SSH_Pv_E10	210				1		4			5
Number of clones sequenced		6	7	9	8	9	5	3	3	50

All the sequences had hits in the database. For each sequence we identified plant nucleotide and protein with high similarities: *Glycine max* cDNA clone GMFL01-21-C10 and *Lilium longiflorum* cytochrome P450 protein (CYT) for SSH_Pv_E1, *Phaseolus vulgaris* chloroplast, complete genome and *Oryza sativa* retrotransposon protein for SSH_Pv_E2, *Phaseolus vulgaris* myo-inositol 1-phosphate synthase mRNA and *Phaseolus vulgaris* myo-inositol 1-phosphate synthase protein (MIPS) for SSH_Pv_E3, *Medicago truncatula* clone mth2-7h6 and *Oryza sativa* hypothetical protein for SSH_Pv_E4, *Vitis vinifera* contig VV78X190503.7 and *Vitis vinifera* hypothetical protein for SSH_Pv_E5, *Glycine max* cationic peroxidase 2 mRNA and *Glycine max* cationic peroxidase 2 protein for SSH_Pv_E6, *Lotus corniculatus* voltage-dependent anion channel 1.3 mRNA and *Lotus corniculatus* voltage-dependent anion channel 1.3 protein (VDAC) for SSH_Pv_E7, *Glycine max* cDNA clone GMFL01-21-C10 and *Lilium longiflorum* putative senescence-associated protein for SSH_Pv_E8, *Phaseolus vulgaris* sucrose synthase mRNA and *Phaseolus vulgaris* sucrose synthase protein (SUS) for SSH_Pv_E9, *Vitis vinifera* complete mitochondrial genome and *Arachis hypogaea* serine rich protein for SSH_Pv_E10.

The clones SSH_Pv_E3, SSH_Pv_E6, SSH_Pv_E7 and SSH_Pv_E9 BLASTX and BLASTN research had hits with the same sequences of the same specie. The sequences SSH_Pv_E6 and SSH_Pv_E7 which were not present in databases for *Phaseolus vulgaris* were submitted to NCBI. They were designed by accession numbers EF660341 and EF672105 respectively. These four sequences and SSH_Pv_E1 matched with proteins of known function. They were used for further studies.

Table 11 BLAST analysis of SSH clones identified from *Phaseolus vulgaris* aborting seeds

Clones	Length (bp)	Percentage of clones (%)	Homology analysis	Best match in database	Score	Identity %	E value
SSH_Pv_E1	618	16	BLASTN	<i>Glycine max</i> cDNA, clone: GMFL01-21-C10 (AK286061)	1112	99% (619) ^a	0.0
			BLASTX	<i>Lilium longiflorum</i> cytochrome P450-like TBP protein (ABO20848)	160	91% (84)	9e-48
SSH_Pv_E2	519	8	BLASTN	<i>Phaseolus vulgaris</i> chloroplast, complete genome (EU196765)	928	99% (519)	0.0
			BLASTX	<i>Oryza sativa</i> retrotransposon protein (ABR26094)	107	94% (55)	4e-26
SSH_Pv_E3	489	4	BLASTN	<i>Phaseolus vulgaris</i> myo-inositol 1-phosphate synthase mRNA (mips gene) (AJ853494)	874	99% (489)	0.0
			BLASTX	<i>Phaseolus vulgaris</i> myo-inositol 1-phosphate synthase protein (CAH68559)	325	100% (162)	7e-88
SSH_Pv_E4	385	26	BLASTN	<i>Medicago truncatula</i> clone mth2-7h6, complete sequence (AC145156)	663	98% (386)	0.0
			BLASTX	<i>Oryza sativa</i> hypothetical protein OsJ_020094 (EAZ36611)	68.9	91% (35)	1e-10
SSH_Pv_E5	382	2	BLASTN	<i>Vitis vinifera</i> contig VV78X190503.7, whole genome shotgun sequence (AM466733)	105	69% (269)	1e-19
			BLASTX	<i>Vitis vinifera</i> hypothetical protein (CAN68148)	61.2	65% (44)	6e-29
SSH_Pv_E6	315	6	BLASTN	<i>Glycine max</i> cationic peroxidase 2 (Prx2) mRNA, complete cds (AF039027)	497	94% (315)	1e-137
			BLASTX	<i>Glycine max</i> cationic peroxidase 2 protein (AAC83463)	203	96% (104)	4e-51
SSH_Pv_E7	295	6	BLASTN	<i>Lotus corniculatus</i> voltage-dependent anion channel 1.3 mRNA, complete cds (AY316739)	206	77% (279)	3e-50
			BLASTX	<i>Lotus corniculatus</i> voltage-dependent anion channel 1.3 protein (AAQ87021)	103	87% (58)	6e-21
SSH_Pv_E8	292	4	BLASTN	<i>Glycine max</i> cDNA, clone: GMFL01-21-C10 (AK286061)	527	100% (292)	8e-147
			BLASTX	<i>Lilium longiflorum</i> putative senescence-associated protein (ABO20851)	179	96% (85)	9e-44
SSH_Pv_E9	285	18	BLASTN	<i>Phaseolus vulgaris</i> sucrose synthase mRNA, complete cds (AF315375)	509	99% (285)	2e-141
			BLASTX	<i>Phaseolus vulgaris</i> sucrose synthase protein (AAN76498)	195	98% (94)	9e-49
SSH_Pv_E10	210	10	BLASTN	<i>Vitis vinifera</i> complete mitochondrial genome, cultivar Pinot noir clone ENTAV115 (FM179380)	372	99% (209)	3e-100
			BLASTX	<i>Arachis hypogaea</i> serine rich protein (ABH09320)	39.3	94% (19)	0.10

^a: Parentheses indicate the number of nucleotides or amino acids for each clone used for the comparison

3-3 Expression analysis of selected genes by semi-quantitative RT-PCR

The five clones SSH_Pv_E1, SSH_Pv_E3, SSH_Pv_E6, SSH_Pv_E7 and SSH_Pv_E9 were used for semi-quantitative RT-PCR analysis in respect of their putative identity. We performed semi quantitative RT-PCR reactions with 25, 30 and 35 cycles. Expression levels of these five genes were compared between mutagenized and wild-type plants developing seeds at 3, 5, 7, 10 and 12 DAA. The RT-PCR products at 30 cycles (in order to keep amplification in the log phase) were separated in agarose gel (Fig. 15) and the band intensity was quantified for each amplified fragment. The expression level of all the genes is higher in the wild-type samples in comparison to the mutagenized samples, except CYT where the level of expression is almost equal in the both samples.

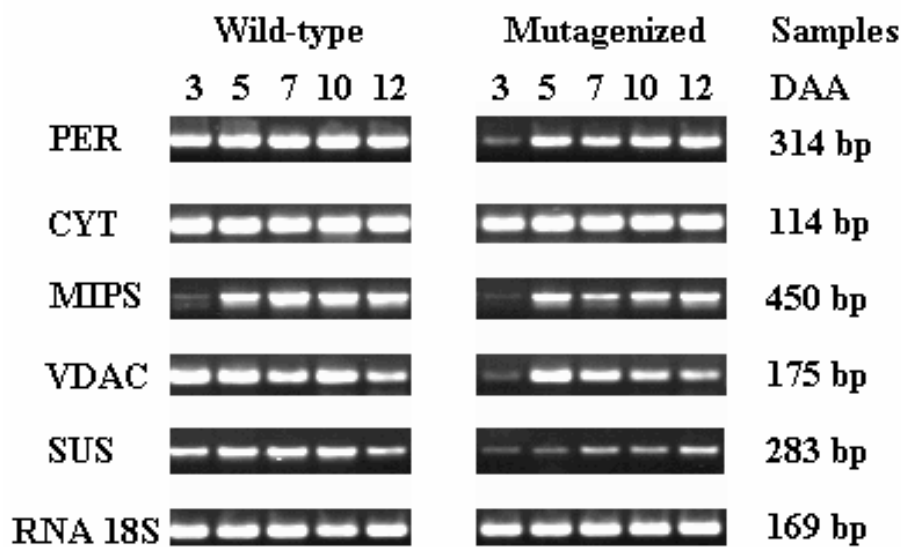


Figure 15 RT-PCR analysis at 30 cycles. RNAs were extracted from wild-type (driver) and mutagenized (tester) samples developing seeds 3, 5, 7, 10 and 12 days after anthesis (DAA). PER: Cationic peroxidase, CYT: Cytochrome P450, MIPS: myo-inositol 1-phosphate synthase, VDAC: Voltage-dependent anion channel, SUS: sucrose synthase. Picture : SILUÉ S.

The figure 16 represents the ratios of the wild-type signal to the mutagenized samples signal for each gene (W/M) at 30 cycles of PCR. These ratios reflect the reduction factor of genes expression in mutagenized samples: they range from 1.04 for CYT gene at 12 DAA to 20.32 for SUS gene at 3 DAA. For all the genes, the ratio W/M at 3 DAA is higher than the values at the other days and generally the reduction of genes expression in mutagenized samples decreases during seed development. This means that the expression of these five genes in wild-type samples is more important at the beginning of seed development compared to that

of mutagenized samples, and this difference of expression is less important at the end of seed development. SUS, PER, and VDAC genes seem to be the most affected in their expression in mutagenized samples during seed development, while CYT and MIPS genes are the least affected. For CYT gene, the reduction of expression is even very minor with a very low ratio W/M (less than 2) at each period.

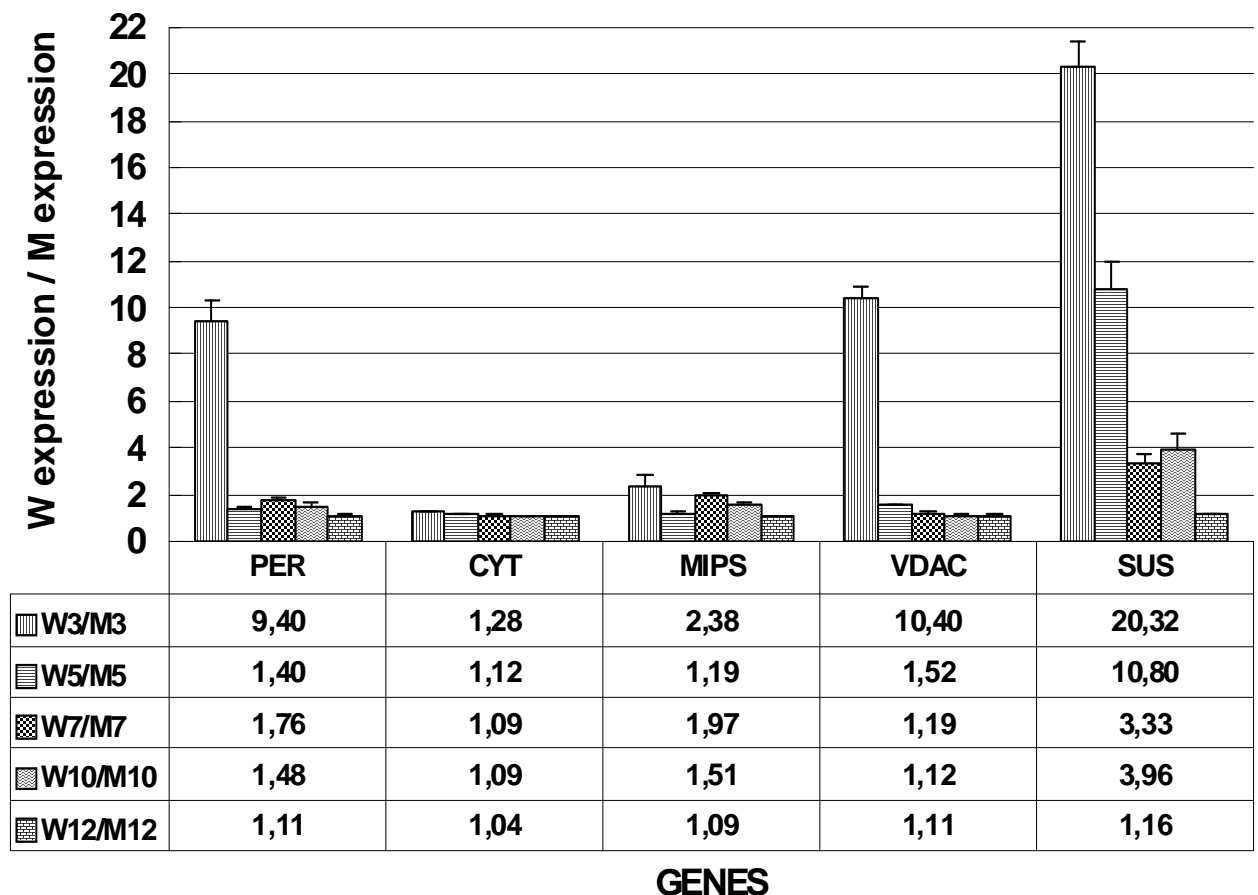


Figure 16 RT-PCR products quantification at 30 cycles of PCR. The graph reflects the reduction factor of genes expression in mutagenized samples at 3, 5, 7, 10 and 12 DAA. PER: cationic peroxidase, CYT: cytochrome P450, MIPS: myo-inositol 1-phosphate synthase, VDAC: voltage-dependent anion channel, SUS: sucrose synthase, M: mutagenized samples, W: Wild-type samples. The values were normalized to the levels of 18S rRNA. Error bars represent the standard error (SE).

4 Discussion

The aim of this study was to identify, within an EMS mutagenized collection of common bean, plants deficient in seed development; and then to isolate genes differentially expressed in degenerate seeds using the Suppressive Subtractive Hybridization technique. Seed development in higher plants such as *Arabidopsis* requires a coordinated differentiation of the

embryo proper, suspensor, endosperm tissue, and seed coat. Many genes must be expressed as the zygote divides in a regulated manner, completes morphogenesis, and differentiates into a mature embryo capable of surviving to desiccation and producing a viable plant (McElver *et al.* 2001). Disruption of these major genes could disturb the normal development of the seeds and then lead to the embryo abortion (Elster *et al.* 2000; Bommert and Werr 2001). Embryogenesis gene products identified to date include a wide array of metabolic enzymes (Lukowitz *et al.* 2001), transcription factors (Lotan *et al.* 1998), chloroplast and mitochondrial proteins (Apuya *et al.* 2001), and proteins required for vesicle trafficking (Rojo *et al.* 2001). This study allowed us to isolate 10 gene fragments encoding proteins likely to play an essential role in the development of seeds. The most represented were hypothetical protein (26%), sucrose synthase protein (18%), cytochrome P450 protein (16%) and serine rich protein (10%). Among the 10 genes identified, cytochrome P450, cationic peroxidase, voltage-dependent anion channel, sucrose synthase and myo-inositol 1-phosphate synthase genes have been particularly investigated in relation with their involvement in seed development and the effect of their mutation on cell survival (Noordermeer *et al.* 2001; Chiu *et al.* 2006; Loewus and Murthy 2000; Andrews *et al.* 2002; Wang *et al.* 2006). Specific primers were designed from their sequences and used in RT-PCR study in order to compare their expression signal between the wild-type and the mutagenized plants during seed development. We observed a reduced activity of these genes in developing seeds of mutagenized plants.

In higher plants, the cytochromes P450s catalyze a wide range of reactions. They constitute the largest group of enzymes associated with wound healing and pest resistance (Noordermeer *et al.* 2001), synthesis of secondary metabolites and plant signal molecules during cell differentiation, organogenesis in response to environmental cues (Bolwell *et al.* 1994), but without any effect in embryo abortion. The mutations of P450 (CYP724B1) in rice known as *dwarf11* give dwarfed plants with reduced seed length due to cytochrome activity reduction (Tanabe *et al.* 2005).

Sucrose Synthase is implicated in many aspects of plant metabolism (Chiu *et al.* 2006). According to Rochat and Boutin (1992), this enzyme facilitates the interconversion of starch and sucrose and thus buffers the supply of carbohydrate to the developing embryo in pea seeds. Craig *et al.* (1999) showed the reduction of SUS activities in pea *rug4* mutants affects embryo development. This reduction is caused by a point mutation at position 1757 of the sequence where the G/C in the wild-type has been changed to A/T.

The MIPS enzyme catalyzes the myo-inositol production; a product which can be converted into phytic acid (phytate). Myo-inositol enters into an array of biochemical reactions having diverse functions in cellular metabolism such as growth regulation, membrane biogenesis, osmotolerance, signal transduction, hormonal homeostasis, and stress protection (Loewus and Murthy 2000). Mutations in MIPS genes are reported to reduce phytate level in the seeds, but do not lead to the abortion of all the seeds (Larson *et al.* 2000; Wilcox *et al.* 2000). However, according to Nunes *et al.* (2006), total silencing of soybean MIPS gene (GmMIPS1) leads to the abortion of all soybean immature seeds.

Plants contain three classes of heme peroxidases (Veitch 2004). The classical plant class III peroxidases are targeted via the endoplasmic reticulum (ER) to the outside of the plant cell or to the vacuole. The high number of isoenzymes and their remarkable catalytic versatility allow them to be involved in a broad range of physiological and developmental processes all along the plant life cycle (Andrews *et al.* 2002; Passardi *et al.*, 2005). Gijzen (1997) showed that the *Ep* locus severely affects the amount of total peroxidase enzyme activity in soybean seed coats. Analysis by RNA blot hybridization reveals that *epep* recessive mutants have drastically reduced amounts of peroxidase transcript compared to *EpEp* plants. The peroxidase mRNA is abundant in seed coat tissues of *EpEp* plants during the late stages of seed maturation.

The voltage-dependent anion channel (VDAC), a major protein of the mitochondrial outer membrane, forms large (diameter 2.5–3 nm) voltage-gated pores and is thought to provide the major pathway for metabolite flow through the outer membrane (Colombini 1979; Mannella and Colombini 1984). Mitochondria supply cellular energy and are involved in a range of other processes, such as signaling, cellular differentiation, cell death, as well as the control of the cell cycle and cell growth (McBride *et al.*, 2006). Mutations in VDAC genes could disrupt mitochondria functions and affect the energy supplying required for cell live. All these constraints could lead to plant embryo abortion.

The five genes described above are expressed in seeds and are important for cells survival, and mutations in these genes cause a reduction of their activities in developing seeds. As shown above, mutations in *SUS* gene and total silencing in *MIPS* gene affect embryos development and lead to their abortion. In our case, we observed a reduction of expression of all the five genes in mutagenized samples.

5 Conclusion and prospects

We isolated plants deficient in seed development from EMS mutagenized seeds of common bean. Embryos from these seeds stopped growing at globular, heart and cotyledon stages and aborted before maturity; abnormalities were observed in suspensor and cotyledons. The Suppressive Subtractive Hybridization allowed us to isolate cDNAs fragments differentially expressed in developing seeds of the mutagenized plants. The cDNAs were cloned and sequenced. BLAST sequence homology analysis revealed 10 groups of proteins encoded by these cDNAs. RT-PCR reactions were performed to study the expression pattern of cytochrome P450, myo-inositol 1-phosphate synthase, sucrose synthase, voltage-dependent anion channel and peroxidase on RNA extracted from developing seeds of wild-type and mutagenized plants. We can conclude that these five genes are involved in the process of embryogenesis and they are down regulated in aborting seeds. Meanwhile, we do not know whether one of these genes is directly responsible for the observed mutation.

In further experiments, the five genes revealed in our investigations will be used as probes to follow the spatial expression pattern in the mutagenized and wild-type embryos during seed development by using the *in situ* hybridization (ISH) technique. ISH is a sensitive technique for the detection of gene expression at the cellular level (Drea *et al.*, 2005).

CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES

Conclusions générales

Au terme de ce travail, il nous semble nécessaire de rappeler les différents objectifs de cette étude et d'en tirer les principales conclusions à la lumière des résultats que nous avons obtenus et d'émettre les perspectives pour de futures investigations.

L'objectif principal de ce travail était d'isoler et de caractériser des gènes différemment exprimés chez les embryons en voie d'avortement, et donc nécessaires au développement normal des embryons. Pour ce faire, nous avons dans un premier temps sélectionné des génotypes de *P. vulgaris*, *P. coccineus* et *P. polyanthus* qui ont une bonne aptitude à la combinaison lors des hybridations interspécifiques. Nous avons ensuite mis en évidence des embryons en cours d'avortement à partir des hybridations interspécifiques et de la mutagenèse induite à l'EMS. Ces embryons ont été caractérisés et nous avons identifié des fragments de gènes différemment exprimés chez ces derniers en utilisant la technique de l'hybridation soustractive suppressive.

Les principales conclusions de ce travail peuvent se résumer comme suit :

Des génotypes des espèces *P. vulgaris*, *P. coccineus* et *P. polyanthus* ont été sélectionnés pour leur bonne aptitude à la combinaison.

Au cours des travaux d'hybridation, nous avons effectué au total 1671 hybridations dont 938 croisements *P. coccineus* x *P. vulgaris* et 733 croisements *P. polyanthus* x *P. vulgaris*. Chez la combinaison *P. coccineus* x *P. vulgaris*, le taux de gousses avortées au delà de 8 JAP était d'environ 13%. Nous avons obtenu quelques gousses matures supposées hybrides. Elles sont issues des croisements suivant : NI889 x NI637 (2), NI889 x G21245 (3), NI16 x NI637 (3) et NI1111 x G21245 (1) soit un taux de 0,96% d'obtention de gousses hybrides. Chez la combinaison *P. polyanthus* x *P. vulgaris*, le taux de gousses avortées au-delà de 8 jours était d'environ 19%. Une seule gousse mature hybride issue du croisement G35348 x G21245 a été obtenue soit un taux de 0,14% d'obtention de gousses hybrides. Les graines de certaines gousses hybrides (deux graines d'une gousse NI889 x G21245, la graine de la gousse NI1111 x G21245 et trois graines de la gousse G35348 x G21245) ont été semées pour vérifier le caractère hybride des plantes issues de ces graines. Parmi les graines issues de ces gousses hybrides, seules deux graines des croisements NI889 x G21245 et G35348 x G21245 ont donné des plantes présentant des caractéristiques différentes de ceux des parents respectifs. Ces différences ont été mises en évidence au moyen des caractères morphologiques

(couleur des fleurs et des graines, tailles des graines) et du marqueur microsatellite BM160. Les autres graines ont donné des plantes identiques aux plantes mères de *P. polyanthus* (G35348) et de *P. coccineus* (NI889). Ces graines proviennent donc d'autofécondations.

Les différents génotypes retenus pour leur bonne aptitude à la combinaison, en tenant compte des taux d'avortement au delà de 8 jours après la pollinisation, sont les suivants : NI637 et G21245 pour *P. vulgaris*, NI889 et NI16 pour *P. coccineus*, NI1015 et G35348 pour *P. polyanthus*.

Des embryons *Phaseolus* en cours d'avortement ont été isolés et caractérisés.

Ces embryons étaient soit issus des croisements *P. coccineus* x *P. vulgaris* (NI16 x NI637), soit obtenus à la suite de la mutagenèse à l'EMS appliquée sur le génotype BAT93 de *P. vulgaris*. Ces différents embryons se caractérisent par des anomalies observées au niveau des cotylédons et du suspenseur. Ils présentent aussi un retard de croissance. Les anomalies cotylédonaires se manifestent de différentes façons : cotylédons fusionnés, cotylédons surnuméraires, ou cotylédons de taille différente. Ces anomalies concernent les hybrides interspécifiques et les plantes issues de la mutagenèse. Chez les embryons issus de la mutagenèse à l'EMS, nous avons observé des anomalies au niveau du suspenseur : les suspenseurs étaient de plus grande taille que ceux des embryons normaux, entraînant ainsi un retard de croissance de ces embryons et leur avortement. La mutagenèse à l'EMS s'est donc révélée une méthode efficace pour l'obtention de plantes déficientes dans la production de graines normales.

Le caractère « avortement des embryons » chez les individus issus de la mutagenèse à l'EMS serait à hérédité maternelle et gouverné par un allèle récessif.

Le déterminisme génétique du caractère « avortement des embryons » a été évalué sur des hybrides F2 issues des croisements entre les plantes d'intérêt issues de la mutagenèse et des plantes non mutagenisées du génotype BAT93 de *P. vulgaris*. L'analyse de la F1 montre que la transmission de ce caractère est maternelle car lorsque les plantes mutées sont utilisées comme parents femelles, toutes les graines F1 produites avortent avant la maturité comme c'est le cas chez les plantes mutées. Par contre lorsque ces plantes sont utilisées comme parents mâles, toutes les graines F1 produites arrivent à maturité, germent et donnent des plantes F2 fertiles. Au total 96 plantes F2 ont été observées pour déterminer la proportion de plantes normales et la proportion de plantes anormales. Cette analyse a révélé une ségrégation

mendélienne 3:1 de plantes normales et de plantes anormales, montrant ainsi que ce caractère serait gouverné par un allèle récessif.

Des ADNc différemment exprimés dans les graines en voie d'avortement ont été isolés.

Des ADNc différemment exprimés dans les graines en voie d'avortement ont été mis en évidence en utilisant la technique de la SSH. Notre étude SSH s'est faite à partir de graines issues des hybridations interspécifiques où elles sont âgées de 20 jours ; et de graines issues de la mutagenèse chimique à l'EMS où elles sont âgées de 12 jours. Ces ADNc codent pour des protéines qui seraient impliquées dans le développement des graines. Six protéines ont été mises en évidence dans les échantillons issus des hybridations interspécifiques dont la principale protéine est le cytochrome P450. Les autres ADNc codent pour des protéines ayant des homologies avec des protéines hypothétiques (2) et des protéines liées à la sénescence (3). Chez les graines issues de la mutagenèse par contre, dix protéines ont été identifiées dont les principales protéines sont le cytochrome P450, la myo-inositol 1-phosphate synthase, la peroxidase cationique, le voltage-dependent anion channel et la sucrose synthase. Les autres ADNc codent pour des protéines ayant des homologies avec des protéines hypothétiques (2), une protéine liée à la sénescence, une protéine de rétrotransposon et une protéine riche en sérine. Certains ADNc des deux échantillons codent pour les mêmes types de protéines. Ce sont le cytochrome P450 et les protéines liées à la sénescence. L'ADNc SSH_PcPv3 issu des hybridations interspécifiques et l'ADNc SSH_Pv_E8 issu de la mutagenèse ont une identité de 86%. Ils codent pour des protéines qui ont des homologies avec la protéine liée à la sénescence de l'espèce *Lilium longiflorum* avec des identités de 76% et 85% respectivement. Les autres types de protéines identifiées et communes aux deux échantillons appartiennent à des espèces différentes.

Les différences observées dans le nombre et le type de protéines identifiées chez les graines issues des hybridations interspécifiques et les graines issues de la mutagenèse peuvent être dues à différents facteurs :

- le type de graines utilisées : les graines issues des hybridations interspécifiques contiennent deux matériels génétiques venant de chacun des deux parents, tandis que les graines issues de la mutagenèse ne contiennent qu'un seul type de matériel génétique qui a été modifié par une mutation ;

- l'âge des graines : chez les hybrides interspécifiques, l'expérience a été conduite sur les graines âgées de 20 jours, alors que des graines de 12 jours ont été utilisées chez les mutants.

Dans les graines normales, certains gènes qui sont exprimés en début de développement

peuvent ne plus être nécessaires au stade de la maturation. On aura donc plus de gènes exprimés dans une graine âgée de 12 jours que dans une autre âgée de 20 jours.

L'expression des cinq principaux cDNA identifiés dans les graines en cours d'avortement issues de la mutagenèse a été étudiée au cours du développement. Cette étude montre que les ADNc identifiés sont présents dans les graines de *P. vulgaris* au cours de leur développement. Les niveaux d'expression de la plupart de ces ADNc sont plus faibles chez les individus issus de mutagenèse comparés aux individus normaux et cela est plus marqué chez les graines âgées de 3 jours. Seul le niveau d'expression du cytochrome P450 semble être identique chez les deux échantillons.

Chacun de ces gènes pourrait être touché par la mutation soit au niveau de leur séquence codante, soit au niveau de leur promoteur. La mutation pourrait aussi toucher un gène qui régule l'expression de ces différents gènes.

Perspectives

Le travail que nous avons réalisé et qui s'inscrit dans le cadre général de l'étude sur le développement embryonnaire chez *Phaseolus*, a permis de caractériser des embryons en cours de dégénérescence issus des hybridations interspécifiques et de la mutagenèse induite. Il a permis ainsi d'identifier des gènes impliqués dans le développement normal des embryons. Au vu des différents résultats obtenus au cours de cette étude, nous proposons quelques voies pour de futures recherches :

Les hybridations interspécifiques

Afin d'accroître les taux de réussite des hybridations interspécifiques entre *P. vulgaris* et les deux autres espèces *P. coccineus* et *P. polyanthus*, la technique du mélange de grains de pollen (Laterrot, 1983) des génotypes mâles et femelles pourrait être envisagée pour une meilleure réussite des croisements. L'association de la technique de grains de pollen prégermés et/ou celle du cut-style (Gurusamy *et al.*, 2007) à celle du mélange de pollen pourrait également apporter de meilleurs résultats lors des hybridations interspécifiques.

Les plantes d'intérêt obtenues par mutagenèse

Les plantes qui produisent des graines avortant avant la maturité et obtenues par mutagenèse chimique représentent un matériel intéressant pour les études sur le développement embryonnaire chez *Phaseolus*. Puisque le caractère « avortement des embryons » est maintenu dans les descendances des croisements avec les plantes normales, des modifications du caractère peuvent être observées au cours des croisements. Des études histologiques complémentaires pourraient être envisagées pour identifier les différentes classes d'anomalies qui apparaissent au cours des générations. On sait par exemple que chez *A. thaliana* et *Z. mays* différentes classes de mutants embryons défectueux ont été mis en évidence.

La régénération *in vitro* de ces embryons sur différents milieux de culture pourrait être envisagée afin de sélectionner dans un premier temps un milieu de régénération adéquat pour ces embryons en voie d'avortement ; et ensuite afin d'identifier les anomalies présentes chez les plantules qui seraient obtenues à partir des ces embryons défectueux. Par exemple, les mutations dans le gène FACKEL chez *Arabidopsis* affectent l'hypocotyle. La régénération *in vitro* de ces embryons mutants *fackel* donne des plantules ayant les cotylédons directement rattachés à la racine (Ducreux, 2002).

Le déterminisme génétique du caractère « avortement des graines »

Pour le déterminisme génétique du caractère « avortement des graines », l'analyse de la population F2 pourrait être complétée par une analyse des descendants backcross issus du croisement entre les plantes d'intérêt issues de la mutagenèse et les hybrides F1. Ces hybrides F1 sont issus du croisement entre les plantes d'intérêt qui ne produisent pas de graines matures et les plantes normales non mutagénisées. Si l'analyse de cette descendance donne les proportions 1 : 1 de plantes normales et de plantes qui produisent des graines avortant avant la maturité, cela confirmera les résultats obtenus en F2. L'étude des descendants F3 issus des 73 plantes F2 au phénotype normal pourrait être aussi envisagée. Parmi ces plantes F2, on devrait avoir 1/3 de plantes homozygotes normales et 2/3 de plantes hétérozygotes. Pour confirmer les résultats obtenus en F2, les descendants F3 des 1/3 de plantes F2 homozygotes normales présenteront tous un phénotype normal ; tandis que les descendants F3 des 2/3 de plantes F2 hétérozygotes représenteront 3/4 de phénotype normal et 1/4 de phénotype anormal.

Les ADNc différemment exprimés dans les graines en voie d'avortement

La technique de la SSH nous a permis de mettre en évidence des ADNc différemment exprimés dans les graines en voie d'avortement et l'étude a été faite à partir des graines âgées de 12 jours pour la mutagenèse induite et des graines âgées de 20 jours pour les hybridations interspécifiques. Comme le montrent les annexes 1 et 2, les séquences de ces ADNc ont des extrémités 5' : AC et 3' : GT qui correspondent aux bouts générés par la digestion de

l'enzyme RsaI $\begin{matrix} 5' \dots \text{GT} \nabla \text{AC} \dots 3' \\ 3' \dots \text{CA} \nabla \text{TG} \dots 5' \end{matrix}$. L'utilisation d'autres enzymes de restriction générant des

bouts francs telles que : AluI $\begin{matrix} 5' \dots \text{AG} \nabla \text{CT} \dots 3' \\ 3' \dots \text{TCGA} \dots 5' \end{matrix}$, AfeI $\begin{matrix} 5' \dots \text{AGCGCT} \dots 3' \\ 3' \dots \text{TCGCGA} \dots 5' \end{matrix}$, etc., permettrait

d'isoler d'autres ADNc différents de ceux déjà mis en évidence.

Les graines de *Phaseolus* âgées de 12 jours contiennent des embryons qui sont au stade cotylédonaire âgé et entament leur phase de maturation. L'utilisation de graines âgées de 3 jours où les embryons sont au stade globulaire ou de graines âgées de 8 jours où les embryons sont au stade cordiforme permettrait d'isoler d'autres ADNc différents de ceux déjà mis en évidence avec des graines âgées de 12 et 20 jours.

Les séquences complètes des ADNc identifiés et identification des mutations ponctuelles

Les séquences des ADNc que nous avons mis en évidence au cours de cette étude ne sont que des séquences partielles. Elles pourront servir à la détermination des séquences complètes des différents ADNc correspondants par l'utilisation de la technique RACE-PCR (rapid amplification of cDNAs ends PCR, amplification rapide d'extrémités d'ADNc PCR). Cette technique permet à partir des ARN et d'amorces spécifiques à la séquence partielle d'un ADNc donné, la synthèse des extrémités 5'P et 3'OH des ADNc complets. Lors de la 5'RACE-PCR, après synthèse de l'ADNc monocaténaire, une queue polyG ou polyC est fixée à l'extrémité 3'OH. L'ADNc monocaténaire ainsi modifié est alors amplifié par PCR à l'aide de l'amorce spécifique de l'ADNc donné et d'une amorce complémentaire du polyG ou polyC. La 3' RACE-PCR consiste à synthétiser dans un premier temps les brins d'ADNc par la transcriptase inverse en utilisant comme amorce un oligonucléotide polyT contenant à son extrémité 5'P une séquence connue supplémentaire (oligonucléotide adaptateur) et s'hybridant sur l'extrémité polyA de l'ARNm. Ensuite un fragment d'ADNc est amplifié par PCR à l'aide d'une première amorce s'hybridant sur la séquence supplémentaire de l'oligonucléotide adaptateur et d'une seconde amorce s'hybridant spécifiquement sur l'ADNc donné (Michael *et al.*, 1988 ; Damier & Tagu, 2003). Les deux fragments obtenus par la RACE-PCR sont enfin caractérisés par séquençage pour déterminer la séquence complète de l'ADNc. Dans notre cas, deux types de séquences complètes d'ADNc seront synthétisés à partir d'ARN issus des graines normales et de graines en voie d'avortement. Les deux séquences seront comparées par alignement afin d'identifier les changements de bases induits par la mutagenèse.

L'identification de nouveaux gènes impliqués dans le développement des embryons

Dans le chapitre III de ce travail, nous avons présenté une série de gènes impliqués dans le développement de l'embryon de plantes modèles. Nous avons également identifié par la technique du SSH des gènes mis en cause chez les embryons en voie d'avortement issus des hybridations interspécifiques et de la mutagenèse chimique à l'EMS. Ces ADNc identifiés par la SSH sont loin de représenter l'ensemble des gènes nécessaires au développement normal des embryons. L'expression des différents gènes (KNOX, HEAT SHOCK PROTEIN, LIPID TRANSFER PROTEIN, PASTICCINO, etc.) recensés au chapitre III pourrait être étudiée chez les embryons en voie d'avortement et chez les embryons normaux afin d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans le développement normal de l'embryon de *Phaseolus*.

L'étude des lieux d'expression des différents gènes identifiés à l'intérieur des graines

Les différents ADNc isolés sont différemment exprimés dans des graines en cours d'avortement issues des hybridations interspécifiques et de la mutagenèse induite par comparaison à des graines normales. Il serait intéressant de déterminer les lieux d'expression de ces différents ADNc à l'intérieur des graines au cours du développement de l'embryon en utilisant la technique de l'hybridation *in situ* (Drea *et al.*, 2005) et de faire une comparaison entre les graines en cours d'avortement et les graines normales. Une comparaison pourrait être faite aussi entre les graines en cours de dégénérescence venant des hybridations interspécifiques et celles venant de la mutagenèse induite. Ces ADNc peuvent s'exprimer soit au niveau de l'embryon, soit dans les structures autour de l'embryon.

RÉFÉRENCES

Références

- Abawi G.S. & Pastor Corrales M.A. (1990). Root rots of beans in Latin America and Africa : diagnosis, research methodologies and management strategies. CIAT, Cali, Colombia 114 p.
- Aldrich J. & Cullis C.A. (1993). RAPD analysis in flax: Optimization of yield and reproducibility using klen *Taq* 1 DNA polymerase, chelex 100, and gel purification of genomic DNA. *Plant Molecular Biology Reporter* 11 (2): 128-141.
- Allard R. W. (1960). Principles of plant breeding. New York, London : John Wiley and Sons, Inc.
- Altmann T., Felix G., Jessop A., Kauschmann A., Uwer U., Pena-Cortes H. & Willmitzer L. (1995). Ac/Ds transposon mutagenesis in *Arabidopsis thaliana*: mutant spectrum and frequency of Ds insertion mutants. *Mol Gen Genet.* **247** (5): 646-652.
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W. & Lipman D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**: 403-410.
- Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zheng Z., Miller W. & Lipman D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST : a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389-3402.
- Alvarez H. N., Asher P. D. & Davis W. (1981). Interspecific hybridization in *Euphaseolus* through embryo rescue. *Hortscience* **16**: 541–543.
- Andrews J., Adams S.R., Burton K.S. & Evered C.E. (2002). Subcellular localization of peroxidase in tomato fruit skin and the possible implications for the regulation of fruit growth. *J Exp Bot* 53: 2185-2191.
- 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 (Belgium). Thèse de Doctorat. 185 p.
- Apuya N.R., Yadegari R., Fischer R.L., Harada J.J. & Goldberg R.B. (2002). *RASPBERRY3* gene encodes a novel protein important for embryo development. *Plant Physiol* **129**: 691-705.
- Apuya N.R., Yadegari R., Fischer R.L., Harada J.J., Zimmerman J.L. & Goldberg R.B. (2001). The *Arabidopsis* embryo mutant schlepperless has a defect in the chaperonin-60 α gene. *Plant Physiology* **126**: 717-730.
- Aronel V. & Kader J.C. (1990). Lipid transfer in plants. *Experientia* **46**: 579-585.

- Ashraf M. (1997). Improvement of salt tolerance in some native pulse crops. *In* : Jaiwal P.K., Singh R.P. & Gulati A., eds. *Strategies for improvement of salt tolerance in higher plants*. New Delhi, India : Oxford and IBH Publishing Co. Pvt. Ltd, 413-434.
- Assaad F.F., Huet Y., Mayer U. & Jürgens G. (2001). The cytokinesis gene KEULE encodes a Sec1 protein that binds the syntaxin KNOLLE. *J Cell Biol.* **152** (3): 531-43.
- Baker W., Van den Broek A., Camon E., Hingamp P., Sterk R., Stoesser G. & Tuli M.A. (2000). The EMBL nucleotide sequence database. *Nucleic Acids Res.* **28** : 19-23.
- Bao X., Franks R.G., Levine J.Z. & Liu Z. (2004). Repression of AGAMOUS by BELLRINGER in floral and inflorescence meristems. *Plant Cell* **16**: 1478-1489.
- Barbosa A.S., Giacaglia L.R, Martin R.M., Mendonca B.B. & Lin C.J. (2004). Assessment of the role of transcript for GATA-4 as a marker of unfavorable outcome in human adrenocortical neoplasms. *BMC Endocrine Disorders* **4**:3 doi:10.1186/1472-6823-4-3.
- Bastida M., Graziano E., Roca R., Lopez I., Sanchez-Pons N., Puigdomenech P. & Vicent C.M. (2006). A maize defective-kernel mutant (*longcell*) characterized by tubular cells, severe morphological alterations and induction of cell death. *Planta* **223**: 755-768.
- Baud S., Mendoza M.S., To A., Harscoët E., Lepiniec L. & Dubreucq B. (2007). WRINKLED1 specifies the regulatory action of LEAFY COTYLEDON2 towards fatty acid metabolism during seed maturation in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **50**: 825-838.
- Baudoin J.P., Camarena F. & Lobo M. (1995). Amélioration de quatre légumineuses alimentaires tropicales *Phaseolus vulgaris*, *P. coccineus*, *P. polyanthus* et *P. lunatus*. Sélection intra- et interspécifique. *In Actes des Quatrièmes Journées Scientifiques du Réseau Biotechnologies Végétales de l'UREF « Quel Avenir pour l'Amélioration des plantes ? »* 18 – 21 oct. 1993. John Libbey Eurotext, Paris, p 31-49.
- Baudoin J.P., Camarena M.F. & Schmit V. (1992). Contribution à une meilleure connaissance de la position phylétique de la légumineuse alimentaire *Phaseolus polyanthus* Grenm. *Bull Rech Agron Gembloux* **27**: 167–198.
- Baudoin J.P., Demol J., Louant B.P., Maréchal R., Mergeai G. & Otoul E. (2002). Amélioration des plantes : application aux principales espèces cultivées en régions tropicales. Gembloux : Presses Agronomiques de Gembloux.
- Baudoin J.P., Silué S., Geerts P., Mergeai G., Jacquemin J.M., 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* (Vol I, Part II). Trivandrum, Kerala, India: Research Signpost, 349-364.

- Baudoin J.P., Vanderborgh T., Kimani P.M., Mwang'Ombe A.W. (2001). Grain legumes: Common bean. In: Ramaeker R.H. ed., *Crop Production in Tropical Africa*. Brussels, Belgium: DGCI (Directorate General for International Cooperation), 317-334.
- Baudoin JP (2001). Contribution des ressources phylogénétiques à la sélection variétale de légumineuses alimentaires tropicales. *BASE* **5**: 221-230.
- Baumbusch L.O. (2006). Genetic control of plant embryogenesis and embryo dormancy in *Arabidopsis*. In: Teixeira da Silva J.A. ed., *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology: Advances and Topical Issues* (1st Edn, Vol I). London, England: Global Science Books, 417-428.
- Baumbusch L.O., Wayne Hughes D., Galau G.A. & Jakobsen K.S. (2004). *LEC1*, *FUS3*, *ABI3* and *Em* expression reveals no correlation with dormancy in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* **55**: 77-87
- Bayuelo-Jiménez J.S., Debouck D.G. & Lynch J.P. (2003). Growth, gas exchange, water relations, and ion composition of *Phaseolus* species grown under saline conditions. *Field Crop Res.* **80** (3): 207-222.
- Beaver J.S., Perea C.G.M., Osorno J.M., Ferwerda F.H. & Miklas P.N. (2005). Registration of Bean golden yellow mosaic virus Resistant Dry Bean Germplasm Lines PR9771-3-2, PR0247-49, and PR0157-4-1. *Crop Science* **45**: 2126-2127.
- Bechtold N., Ellis J. & Pelletier G. (1993). In *planta Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *C.R. Acad. Sci. Life Sciences* **316**: 1194-1199.
- Becker A., Bey M., Bürglin T.R., Saedler H. & Theissen G. (2002). Ancestry and diversity of BEL1-like homeobox genes revealed by gymnosperm (*Gnetum gnemon*) homologs. *Development, Genes and Evolution* **212**: 452-457.
- Beebe S., Cardona C., Diaz O., Rodriguez F., Mancía E. & Ajquejay S. (1993). Development of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) lines resistant to the bean pod weevil, *Apion godmani* Wagner, in Central America. *Euphytica* **69** (1-2) : 83-88.
- Bellec Y., Harrar Y., Butaeye C., Darnet S., Bellini C. & Faure J.D. (2002). *Pasticcino2* is a protein tyrosine phosphatase-like involved in cell proliferation and differentiation in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **32**: 713-722.
- Belles-Boix E., Hamant O., Witiak S.M., Morin H., Traas J. & Pautot V. (2006). KNAT6: an *Arabidopsis* homeobox gene involved in meristem activity and organ separation. *Plant Cell* **18**: 1900-1907.

- Belmonte M.F., Tahir M., Schroeder D. & Stasolla C. (2007). Overexpression of HBK3, a class I KNOX homeobox gene, improves the development of Norway spruce (*Picea abies*) somatic embryos. *Journal of Experimental Botany* **58**: 2851-2861.
- Ben C. (2005). Analyse du transcriptome lors de l'embryogenèse précoce chez le Tournesol. Thèse de doctorat, Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse, 167 p., 38 fig.
- Benson D.A., Karech-Mizrachi L, Lipman DJ., Ostell J., Rapp B.A. & Wheeler D.L. (2000) GenBank. *Nucleic Acids Res.* **28** : 15-18.
- Berleth T. & Chatfield S. (2002). Embryogenesis: pattern formation from a single cell. In: Somerville CR, Meyerowitz EM (Eds) *The Arabidopsis Book*, American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, pp 1-22.
- Bernal G. & Graham P.H. (2001). Diversity in the rhizobia associated with *Phaseolus vulgaris* L. in Ecuador, and comparisons with Mexican bean rhizobia. *Canadian Journal of Microbiology* **47** (6) : 526-534.
- Bhatt A.M., Etchells J.P., Canales C., Lagodienko A. & Dickson H. (2004). VAAMANA a BEL1-like homeodomain protein interacts with KNOX proteins BP and STM and regulates inflorescence stem growth in *Arabidopsis*. *Gene* **328**: 103-111.
- Bianchini A. (1999). Resistance to bean golden mosaic virus in bean genotypes. *Plant Disease* **83**: 615-620.
- Blair M.W., Bassett M.J., Abouzid A.M., Hiebert E., Polston J.E., McMillian Jr., R.T., Graves W. & Lamberts M. (1995). Occurrence of bean golden mosaic virus in Florida. *Plant Dis.* **79**:529-533.
- Blair M.W., Muñoz C., Garza R. & Cardona C. (2006). Molecular mapping of genes for resistance to the bean pod weevil (*Apion godmani* Wagner) in common bean. *Theor Appl Genet* **112**: 913 – 923.
- Bolwell G.P., Bozak K. & Zimmerlin A. (1994). Plant cytochrome P450. *Phytochemistry* **37**: 1491-1506.
- Bommert P. & Werr W. (2001). Gene expression patterns in maize caryopsis: clues to decisions in embryo and endosperm development. *Gene* **271**: 131-124.
- Bonhomme F., Kurz B., Melzer S., Bernier G. & Jacqumard A. (2000). Cytokinin and gibberellin activate SaMADS A, a gene apparently involved in regulation of the floral transition in *Sinapis alba*. *Plant J* **24**: 103-111.
- Bowman J.L. & Eshed Y. (2000). Formation and maintenance of the shoot apical meristem. *Trends in Plant Science* **5**: 110-115.

- Bracero V., Rivera L.I. & Beaver J.S. (2003). DNA analysis confirms *Macroptilium lathyroides* as alternative host of Bean golden yellow mosaic virus. *Plant Disease* **87**: 1022-1025.
- Brand U., Grunewald M., Hobe M. & Simon R. (2002). Regulation of CLV3 expression by two homeobox genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **129**: 565-575.
- Brewbaker J.L. & Kwack B.H. (1963). The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. *Am. J. Bot.* **50** : 859 - 865.
- Brink M. & Belay G. (2006). Ressources végétales de l'Afrique tropicale 1: céréales et légumes secs. Wageningen : PROTA.
- Broughton W.J., Hernandez G., Blair M.W., Beebe S., Gepts P. & Vanderleyden J. (2003). Beans (*Phaseolus* spp.) - Model Food Legumes. *Plant and Soil* **252**: 55-128.
- Bruyninx M., Cornet A., Hennuy B., Reiter E., Klug M., Closset J. & Hennen G. (1998). Gènes impliqués dans l'apoptose prostatique provoquée par un déficit androgénique. *Médecine/sciences* **14**: 572-579.
- Bürglin T.R. (1997). Analysis of TALE superclass homeobox genes (MEIS, PBC, KNOX, Iroquois, TGIF) reveals a novel domain conserved between plants and animals. *Nucleic Acids Research* **25**: 4173-4180.
- Busogoro J.P., Jijakli M.H. & Lepoivre P. (1999). Identification of a novel source of resistance to angular leaf spot disease of common bean within the secondary gene pool. *Plant Breeding* **118**: 417-423.
- Byrne M.E., Groover A.T., Fontana J.R. & Martienssen R.A. (2003). Phyllotactic pattern and stem cell fate are determined by the *Arabidopsis* homeobox gene BELLRINGER. *Development* **130**: 3941-3950.
- Caboche M. (2006). L'essor de la génomique végétale. *Biofutur*, **265**, 24-26.
- Caixeta E.T., Borém A., Azevedo Fagundes S., Niestche S., Barros E.G. & Moreira M.A. (2003). Inheritance of angular leaf spot resistance in common bean line BAT 332 and identification of RAPD marker linked to the resistance gene. *Euphytica* **134**: 297-303.
- Caldwell D.G., McCallum N., Shaw P., Muehlbauer G.J., Marshall D.F. & Waugh R. (2004). A structured mutant population for forward and reverse genetics in Barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant J* **40** (1): 143-150.
- Camarena M.F. & 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. à travers l'utilisation du cytoplasme de *P. polyanthus*, PhD Thesis, Gembloux Agricultural University, Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux, Gembloux, Belgium, 237 pp.
- Carabelli M., Sessa G., Baima S., Morelli G. & Ruberti I. (1993). The *Arabidopsis* Athb-2 and Athb-4 genes are strongly induced by far-red-rich light. *Plant J* **4**: 469-479.
- Cardona C. & Kornegay J. (1999). Bean germplasm resources for insect resistance. In : Clement S.L. & Quisenberry S.S. eds. *Global Plant Genetic Resources for Insect-Resistant Crops*. Boca Raton, Florida, USA : CRC Press, 85-99.
- Cardona C., Frei A., Bueno J.M., Díaz J., Gu H. & Dorn S. (2002). Resistance to *Thrips palmi* (Thysanoptera: Thripidae) in beans. *Journal of Economic Entomology* **95** : 1066–1073.
- Chan R.L., Gago G.M., Palena C.M. & Gonzalez D.H. (1998). Homeoboxed in plant development. *Biochimica and Biophysica Acta* **1442**: 1-19.
- Charvolin D., Douliez J.P., Marion D., Cohen-Addad C. & Pebay-Peyroula E. (1999). The crystal structure of a wheat non-specific lipid transfer protein (ns-LTP1) complexed with two molecules of phospholipid at 2.1 Å resolution. *European Journal of Biochemistry* **264**: 562-568.
- Chasan R. (1992). In the realm of the homeodomain. *Plant Cell* **4**: 237-240.
- Chen H., Rosin F.M., Prat S. & Hannapel D.J. (2003). Interacting transcription factors from the three-amino acid loop extension superclass regulate tuber formation. *Plant Physiol* **132**: 1391-1404.
- Chiu W.B., Lin C.H., Chang C.J., Hsieh M.H. & Wang A.Y. (2006). Molecular characterization and expression of four cDNAs encoding sucrose synthase from green bamboo *Bambusa oldhamii*. *New Phytol* **170**: 53-63.
- CIAT (1992). Constraints to and opportunities for improving bean production. A planning document 1993–98. An achievement document 1987–92, CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical), Cali, Colombia.
- Clark A.M. & Bohnert H.J. (1999). Cell-specific expression of genes of the lipid transfer protein family from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiology* **40**: 69-76.
- Clark J.K. & Sheridan W.F. (1991). Isolation and characterisation of 51 embryo-specific mutations of maize. *Plant Cell*, **3**, 935-951.
- Coca M.A., Almoguera C. & Jordano J. (1994). Expression of sunflower lowmolecular-weight heat-shock proteins during embryogenesis and persistence after germination: localization and possible functional implications. *Plant Molecular Biology* **25**: 479-492.

- Colmenero-Flores J.M., Campos F., Garcarrubio A. & Covarrubias A.A. (1997). Characterization of *Phaseolus vulgaris* cDNA clones responsive to waterdeficit: identification of a novel late embryogenesis abundant-like protein. *Plant Molecular Biology* **35**: 393-405.
- Colombini M. (1979). A candidate for the permeability pathway of the outer mitochondrial membrane. *Nature* **279**: 643-645.
- Comelli P., König J. & Werr W. (1999). Alternative splicing of two leading exons partitions promoter activity between the coding regions of the maize homeobox gene *Zmhox1a* and *Trap* (transposon-associated protein). *Plant Molecular Biology* **41**: 615-625.
- Consonni G., Aspesi C., Barbante A., Dolfini S., Giuliani C., Giulini A., Hansen S., Brettschneider R., Pilu R. & Gavazzi G. (2003). Analysis of four maize mutants arrested in early embryogenesis reveals an irregular pattern of cell division. *Sex Plant Reprod* **15**: 281-290.
- Cooper J.L., Till B.J., Laport R.G., Darlow M.C., Kleffner J.M., Jamai A., El-Mellouki T., Liu S., Ritchie R., Nielsen N., Bilyeu K.D., Meksem K., Comai L. & Henikoff S. (2008). TILLING to detect induced mutations in soybean. *BMC Plant Biology* **8**: 9.
- Coutos-Thevenot P, Jouenne T, Maes O, Guerbette F, Grosbois M, le Caer JP, Boulay B, Deloire A, Kader JC, Guern J (1993) Four 9-kDa proteins excreted by somatic embryos of grapevine are isoforms of lipid-transfer proteins. *European Journal of Biochemistry* **217**: 885-889.
- Craig J., Barratt P., Tatge H., Déjardin A., Handley L., Gardner C.D., Barber L., Wang T., Hedley C., Martin C., Smith A.M. (1999). Mutations at the *therug4* locus alter the carbon and nitrogen metabolism of pea plants through an effect on sucrose synthase. *Plant J* **17**: 353-362.
- Crossley S.J., Greenland A.J. & Dickinson H.G. (1995). The characterization of tapetum-specific cDNAs isolated from a *Lilium henryi* L. meiocyte subtractive cDNA library. *Planta* **196**: 523-529.
- Dagnelie P. (2006). *Statistique théorique et appliquée. 2, Inférence statistique à une et à deux dimensions*. Bruxelles : De Boeck Université.
- Damier L. & Tagu D. (2003). Hybridation moléculaire. *In*: Tagu D. and Moussard C. Eds. *Principes des techniques de biologie moléculaire*, INRA, Paris, France, pp 32-34.
- Damier L. & Tagu D. (2003). RACE : amplification rapide d'extrémités d'ADNc (rapid amplification of cDNAs ends). *In*: Tagu D. and Moussard C. Eds. *Principes des techniques de biologie moléculaire*, INRA, Paris, France, pp 82-84.

- Davies P.J. (1995). Hormones in tissue culture and propagation. In: Davies PJ (Ed) Plant Hormones, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 13-38.
- Davis J.H.C., Giller K.E., Kipe-Nolt J. & Awah M. (1988). Non-nodulating mutants in common bean. *Crop Sci.* **28**: 859-860.
- de Oliveira Carvalho A. & Gomes V.M. (2007). Role of plant lipid transfer proteins in plant cell Physiology, A concise review. *Peptides* **28**: 1144-1153.
- Debouck D.G. & Smartt J.J. (1995). Beans, *Phaseolus* spp. (Leguminosae-Papilionoidae). In: Smartt JJ, Simmonds NW (Eds) *Evolution of Crop Plants*, Longman Scientific and Technical, London, UK, pp 287-294.
- Debouck D.G. (1999). Diversity in *Phaseolus* species in relation to the common bean. In: Singh SP (Ed) *Common Bean Improvement in the Twenty-First Century*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 25-52.
- Debouck D.G., Araya V.R., Ocampo S. & Gonzalez U.W.G. (1989). Collecting *Phaseolus* in Costa Rica. *FAO/IBPGR Plant Genetic Resources Newsletter* **78/79** : 44–46
- Delgado-Salinas A. (1988). Variation, taxonomy, domestication and germplasm potentialities in *Phaseolus coccineus*. In P. Gepts, ed. *Genetic Resources of Phaseolus Bean*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Holland, p. 441–463.
- Devic M. (1995). L'embryogenèse d'*Arabidopsis*. *Biofutur* **151**: 32-37.
- Devic M., Albert S. & Delseny M. (1996). Induction and expression of seed-specific promoters in *Arabidopsis* embryo-defective mutants. *Plant J.* **9**: 205-215.
- Di Cristina M., Sessa G., Dolan L., Linstead P., Baima S., Ruberti I. & Morelli G. (1996). The *Arabidopsis* Athb-10 (GLABRA2) is an HD-Zip protein required for regulation of root hair development. *Plant J.* **10**: 393-402.
- Dita M.A., Rispaill N., Prats E., Rubiales D. & Singh K.B. (2006). Biotechnology approaches to overcome biotic and abiotic stress constraints in legumes. *Euphytica* **147**: 1-24.
- Dolfini S., Consonni G., Viotti C., Dal Prà M., Saltini G., Giulini A., Pilu R., Malgioglio A. & Gavazzi G. (2007). A mutational approach to the study of seed development in maize. *J. Exp. Bot.*, **58** (5) : 1197-1205.
- Dong Y.H., Yao J.L., Atkinson R.G., Putterill J.J., Morris B.A. & Gardner R.C. (2000). MDH1: an apple homeobox gene belonging to the BEL1 family. *Plant Molecular Biology* **42**: 623-633.
- Drea S., Corsar J., Crawford B., Shaw P., Dolan L. & Doonan J.H. (2005). A streamlined method for systematic, high resolution in situ analysis of mRNA distribution in plants. *Plant Methods* 1:8 doi:10.1186/1746-4811-1-8

- 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) Agric. Res. Rep. 872. 98 pp.
- Ducreux G. (2002). Construction et organisation fonctionnelle de l'appareil végétatif. *In*: Berlin, ed. *Introduction à la botanique*. Paris, France, 83-185.
- El Fahime E. & Ennaji M.M. (2007). Évolution des techniques de séquençage. Les technologies de laboratoire **5** : 4-12.
- Elster R., Bommert P., Sheridan W.F. & Werr W. (2000). Analysis of four embryo specific mutants in *Zea mays* reveals that incomplete radial organization of the proembryo interferes with subsequent development. *Development, Genes and Evolution* **210**: 300-310.
- Emery J.F., Floyd S.K., Alvarez J., Eshed Y., Hawker N.P., Izhaki A., Baum S.F. & Bowman J.L. (2003). Radial Patterning of *Arabidopsis* Shoots by Class III HD-ZIP and KANADI Genes. *Current Biology* **13**: 1768-1774.
- Estruch J.J., Prinsen E., van Onckelen H., Schell J., Spena A. (1991). Viviparous leaves produced by somatic activation of an inactive cytokinin-synthesizing gene. *Science* **254** : 1364-1367.
- Faure J.D., Vittorioso P., Santoni V., Fraisier V., Prinsen E., Barlier I., van Onckelen H., Caboche M. & Bellini C. (1998). The PASTICCINO genes of *Arabidopsis thaliana* are involved in the control of cell division and cell differentiation. *Development* **12**: 909-918.
- Feldmann K.A. & Marks M.D. (1987). *Agrobacterium*-mediated transformation of germinating seeds of *Arabidopsis thaliana*: a non tissue culture approach. *Mol. Gen. Genet.* **208**: 1-9.
- Floyd S.K., Zalewski C.S. & Bowman J.L. (2006). Evolution of Class III Homeodomain–Leucine Zipper Genes in Streptophytes. *Genetics* **173**: 373-388.
- Fofana B., Vekemans X., du Jardin P. & Baudoin J.P. (1997). Genetic diversity in Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) as revealed by RAPD markers. *Euphytica* **95** : 157–165.
- Foster G.D., Robinson S.W., Blundell R.P., Roberts M.R., Hodge R., Draper J. & Scott R.J. (1992). A *Brassica napus* mRNA encoding a protein homologous to phospholipid transfer proteins is expressed specifically in the tapetum and developing microspores. *Plant Science* **84**: 187-192.
- Franzmann L.H., Yoon E.S., Meinke D.W. (1995). Saturating the genetic map of *Arabidopsis thaliana* with embryonic mutations. *Plant J.* **7**: 341-350.

- Freytag G.F. & Debouck D.G. (2002). Taxonomy, distribution, and ecology of the genus *Phaseolus* (Leguminosae–Papilionoideae) in North America, Mexico and central America. *Sida Bot Misc* **23**. Botanical Research Institute of Texas.
- Fu S., Meeley R. & Scanlon M.J. (2002). Empty pericarp2 encodes a negative regulator of the heat shock response and is required for maize embryogenesis. *Plant Cell* **14**: 3119-3132.
- Gaitan-Solis E., Duque M.C., Edwards K.J. & Tohme J. (2002). Microsatellite repeats in common bean (*Phaseolus vulgaris*): isolation, characterization, and cross-species amplification in *Phaseolus* ssp. *Crop Sci.* **42**: 2128–2136.
- García-Olmedo F., Molina A., Segura A. & Moreno M. (1995). The defensive role of nonspecific lipid-transfer proteins in plants. *Trends in Microbiology* **3**: 72-74.
- Garza R., Vera J., Cardona C., Barcenas & N. Singh S.P. (2001). Hypersensitive response of beans to *Apion godmani* (Coleoptera: Curculionidae). *J Econ Entomol* **94**: 958–962.
- Gautam A.S., Sood K.C. & Mittal R.K. (1998). Mutagenic effectiveness and efficiency of gamma-rays and ethyl methane sulphonate in rajma (*Phaseolus vulgaris* L.). *Legume Res.* **21**: 217-220.
- Geerts P. (2001). Study of embryo development in *Phaseolus* in order to obtain interspecific hybrids. PhD Thesis, Gembloux Agricultural University, Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques, Gembloux, Belgium, pp 183.
- Geerts P., Toussaint A., Mergeai G. & 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.
- Gehring W.J. & Hiromi Y. (1986). Homeotic genes and the homeobox. *Annual Review of Genetics* **20**: 147-173.
- Gehring W.J. (1992). The homeobox in perspective. *Trends in Biochemical Sciences* **17**, 277-280.
- Gepts P., Aragão F.J.L., de Barros E., Blair M.W., Brondani R., Broughton W., Galasso I., Hernández G., Kami J., Lariguet P., McClean P., Melotto M., Miklas P., Pauls P., Pedrosa-Harand A., Porch T., Sánchez F., Sparvoli F. & Yu K. (2008). Genomics of *Phaseolus* Beans, a Major Source of Dietary Protein and Micronutrients in the Tropics. In P.H. Moore & R. Ming eds., *Genomics of Tropical Crop Plants*. New York, USA: Springer, 113-143.
- Gibas C. & Jambeck P. (2002). *Introduction à la bioinformatique*. Paris : O'Reilly.

- Gibrat J.F. & Marin A. (2004). Stratégies permettant d'assigner une fonction *in silico* aux séquences protéiques issues de projets de génomique. *In* : Morot-Gaudry J.F. & Briat J.F. eds. La génomique en biologie végétale, INRA, Paris, France, pp 91-113.
- Gibson G. & Muse S.V. (2004). Précis de génomique. Bruxelles : De Boeck Université.
- Gijzen M. (1997). A deletion mutation at the ep locus causes low seed coat peroxidase activity in soybean. *Plant J* **12**: 991-998.
- Godderis W. (1995). La culture du haricot au Burundi. Bruxelles: AGCD, Bujumbura: ISABU.
- Goldberg R.B., de Pavia G. & Yadegari R. (1994). Plant embryogenesis: zygote to seed. *Science* **466**: 605-614.
- Graham P.H. & Ranalli P. (1997). Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Field Crops Research* **53**: 131-146.
- Granier F. & Bauchez D. (2001). Les collections de mutants. Ecole thématique Biologie végétale: 1-9.
- Greene E.A., Codomo C.A., Taylor N.E., Henikoff J.G., Till B.J., Reynolds S.H., Enns L.C., Burtner C., Johnson J.E., Odden A.R., Comai L. & Henikoff S. (2003). Spectrum of chemically induced mutations from a large-scale reverse-genetic screen in *Arabidopsis*. *Genetics* **164**: 731-740.
- Grenier E. (2003). Criblage différentiel par SSH : Hybridation Soustractive et Suppressive (Suppression Subtractive Hybridization). *In*: Tagu D. and Moussard C. Eds. Principes des techniques de biologie moléculaire, INRA, Paris, France, pp 58-61.
- Groß-Hardt R. & Laux T. (2003). Stem cell regulation in the shoot meristem. *Journal of Cell Science* **116**: 1659-1666
- Gurusamy V., Vandenberg A. & Bett K.E. (2007). Manipulation of *in vivo* pollination techniques to improve the fertilization efficiency of interspecies crosses in the genus *Phaseolus*. *Plant Breeding* **126** : 120-124.
- Györgyey J., Gartner A., Németh K., Magyar Z., Hirt H., Heberle-Bors E. & Dudits D. (1991). Alfalfa heat shock genes are differentially expressed during somatic embryogenesis. *Plant Molecular Biology* **16**: 999-1007.
- Haberer G., Erschadi S. & Torres-Ruiz R.A. (2002). The *Arabidopsis* gene PEPINO/PASTICCINO2 is required for proliferation control of meristematic and non-meristematic cells and encodes a putative anti-phosphatase. *Development, Genes and Evolution* **212**: 542-550.

- Haecker A., Groß-Hardt R., Geiges B., Sarkar A., Breuninger H., Herrmann M. & Laux T (2004). Expression dynamics of WOX genes mark cell fate decisions during early embryonic patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Development* **131**: 657-668.
- Hake S.C., Char B.R., Chuck G., Foster T., Long J. & Jackson D. (1995) Homeobox genes in the functioning of plant meristems. *Philosophical Transactions: Biological Sciences* **350**: 45-51.
- Hake S.C., Smith H.M.S., Holtan H., Magnani E., Mele G. & Ramirez J. (2004). The role of KNOX genes in plant development. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **20**: 125-151.
- Han G.W., Lee J.Y., Song H.K., Chang C., Min K., Moon J., Shin D.H., Kopka M.L., Sawaya M.R., Yuan H.S., Kim T.D., Choe J., Lim D., Moon H.J. & Suh S.W. (2001). Structural basis of non-specific lipid binding in maize lipid-transfer protein complexes revealed by high-resolution X-ray crystallography. *Journal of Molecular Biology* **308**: 263-278.
- Hanson J., Johannesson H. & Engström P. (2001). Sugar-dependent alterations in cotyledon and leaf development in transgenic plants expressing the HDZip gene ATHB13. *Plant Molecular Biology* **45**: 247-262.
- Hanson P.M., Pastor-Corrales M.A. & Kornegay J.L. (1993). Heritability and sources of *Ascochyta* Blight resistance in common bean. *Plant Disease* **77**: 711-714.
- Harada J.J. (1997). Seed maturation and control of germination. In: Larkins BA, Vasil IK (Eds) *Cellular and Molecular Biology of Plant Seed Development*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 545-592.
- Harada J.J. (2001). Role of *Arabidopsis* Leafy Cotyledon genes in seed development. *Journal of Plant Physiology* **158**: 405-409.
- Harrar Y., Bellec Y., Bellini C. & Faure J.D. (2003). Hormonal control of cell proliferation requires PASTICCINO genes. *Plant Physiology* **132**: 1217-1227.
- Hay A., Craft J. & Tsiantis M. (2004). Plant hormones and homeoboxes: bridging the gap? *Bioessays* **26**: 395-404.
- Heckel T., Werner K., Sheridan W.F., Dumas C. & Rogowsky P.M. (1999). Novel phenotypes and developmental arrest in early embryo specific (*emb*) mutations of maize. *Planta* **210**: 1-8.
- Hehn A. (2007). Métabolisme secondaire : Les Cytochromes P450s acteurs de l'adaptation des plantes à leur environnement. Mémoire soutenu en vue de l'obtention de l'Habilitation à Diriger les Recherches. Spécialité : Sciences Agronomiques. Institut National

Polytechnique de Lorraine - Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Laitières. 86 p., 30 fig.

- Helm K.W. & Abernethy R.H. (1990). Heat shock proteins and their mRNAs in dry and early imbibing embryos of wheat. *Plant Physiology* **93**: 1626-1633.
- Hendriks T., Meijer E.A., Thoma S., Kader J.C., de Vries S.C. (1994). The carrot extracellular lipid transfer protein EP2: Quantitative aspects with respect to its putative role in cutin synthesis. *In*: Coruzzi G, Puigdomènech P (Eds) NATO ASI Series Vol. 81, Springer-Verlag, Berlin, pp 85-94.
- Henikoff S. & Comai L. (2003). Single-nucleotide mutations for plant functional genomics. *Annu. Rev. Plant Biol.* **54**: 375-401.
- Hillocks R.J., Madata C.S., Chirwa R., Minja E.M. & Msolla S. (2006). *Phaseolus* bean improvement in Tanzania, 1959–2005. *Euphytica* **150**: 215 – 231. DOI: 10.1007/s10681-006-9112-9.
- Hjortswang H.I., Filonova L.H., Vahala T., von Arnold S. (2002). Modified expression of the Pa18 gene interferes with somatic embryo development in Norway spruce. *Plant Growth Regulation* **38**: 75-82.
- Hofer J., Gourlay C., Michael A., Ellis T.H. (2001). Expression of a class 1 knotted1-like homeobox gene is down-regulated in pea compound leaf primordia. *Plant Molecular Biology* **45**: 387-398.
- Hollenbach B., Schreiber L., Hartung W., Dietz K.J. (1997). Cadmium leads to stimulated expression of the lipid transfer protein genes in barley: implications for the involvement of lipid transfer proteins in wax assembly. *Planta* **203**: 9-19.
- Howell S.H. (1998) *Molecular Genetics of Plant Development* (1st Ed), Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom, 384 pp.
- Hsu Y.F., Tzeng J.D., Liu M.C., Yei F.L., Chung M.C. & Wang C.S. (2008). Identification of anther-specific/predominant genes regulated by gibberellin during development of lily anthers. *Journal of Plant Physiology* **165**: 553-563.
- Ingouff M., Farbos I., Wiweger M., von Arnold S. (2003). The molecular characterization of PaHB2, a homeobox gene of the HD-GL2 family expressed during embryo development in Norway spruce. *Journal of Experimental Botany* **54**: 1343-1350.
- Ingram G.C., Boisnard-Lorig C., Dumas C. & Rogowsky P.M. (2000). Expression patterns of genes encoding HD-ZIP IV homeodomain proteins define specific domains in maize embryos and meristems. *The Plant Journal* **22**: 401-414.

- Ingram G.C., Magnard J.L., Vergne P., Dumas C. & Rogowsky P.M. (1999). ZmOCL1, an HDGL2 family homeobox gene, is expressed in the outer cell layer throughout maize development. *Plant Molecular Biology* **40**: 343-354.
- Ito M., Sato Y. & Matsuoka M. (2002a). Involvement of homeobox genes in early body plan of monocot. *International Review of Cytology* **218**: 1-35.
- Ito M., Sentoku N., Nishimura A., Hong S.K., Sato Y. & Matsuoka M. (2002b). Position dependent expression of GL2-type homeobox gene, Roc1: significance for protoderm differentiation and radial pattern formation in early rice embryogenesis. *The Plant Journal* **29**: 497-507.
- Ito Y., Chujo A., Eiguchi M. & Kurata N. (2004). Radial axis differentiation in a globular embryo is marked by HAZ1, a PHD-finger homeobox gene of rice. *Gene* **331**: 9-15.
- Jang J.C., Fujioka S., Tasaka M., Seto H., Takatsuto S., Ishii A., Aida M., Yoshida S. & Sheen J. (2000). A critical role of sterols in embryonic patterning and meristem programming revealed by the fackel mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev.* **14** (12): 1485-1497.
- Jesus Junior W.C., Vale F.X.R., Martinez C.A., Coelho R.R., Costa L.C., Hau B. & Zambolim L. (2001). Effects of angular leaf spot and rust on leaf gas exchange and yield of common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Photosynthetica* **39** : 603–606.
- Jofuku K.D. & Goldberg R.B. (1989). Kunitz trypsin inhibitor genes are differentially expressed during the soybean life cycle and in transformed tobacco plants. *Plant Cell* **1**: 1079-1094.
- Johannesson H., Wang Y. & Engström P. (2001). DNA-binding and dimerization preferences of *Arabidopsis* homeodomain-leucine zipper transcription factors *in vitro*. *Plant Molecular Biology* **45**: 63-73.
- Jung H.W., Kim W. & Hwang B.K. (2003). Three pathogen-inducible genes encoding lipid transfer protein from pepper are differentially activated by pathogens, abiotic, and environmental stresses. *Plant, Cell and Environment* **26**: 915-928.
- Jürgens G., Mayer U., Torres Ruiz R.A., Berleth T. & Misera S. (1991). Genetic analysis of pattern formation in the *Arabidopsis* embryo. *Dev. Suppl.*, **1**: 27-38.
- Jürgens G., Torres Ruiz R.A. & Berleth T. (1994). Embryonic pattern formation in flowering plants. *Annual Review of Genetics* **28**: 351-371.
- Kader J.C. (1996). Lipid transfer proteins in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **47**: 627-654.

- Kader J.C. (1997). Lipid-transfer proteins: a puzzling family of plant proteins. *Trends in Plant Science* **2**: 66-70.
- Kader J.C., Douady D. & Mazliak P. (1982). Phospholipid transfer proteins. *In*: Hawthorne JH, Ansell GB Eds. *Phospholipids, a comprehensive treatise*, Elsevier, Amsterdam, Netherlands, pp 279-311.
- Kader J.C., Julienne M. & Vergnolle C. (1984). Purification and characterization of a spinach-leaf protein capable of transferring phospholipids from liposomes to mitochondria or chloroplasts. *The European Journal of Biochemistry* **139**: 411-416.
- Kagaya Y., Toyoshima R., Okuda R., Usui H., Yamamoto A. & Hattori T. (2005). LEAFY COTYLEDON1 controls seed storage protein genes through its regulation of FUSCA3 and ABSCISIC ACID INSENSITIVE3. *Plant and Cell Physiology* **46**: 399-406
- Kami J. & Gepts P. (2000). Development of a BAC library in common bean genotype BAT93. *Annu Rept Bean Improv Coop* **43**: 208-209.
- Kamiya N., Nagasaki H., Morikami A., Sato Y. & Matsuoka M. (2003). Isolation and characterization of a rice WUSCHEL-type homeobox gene that is specifically expressed in the central cells of a quiescent center in the root apical meristem. *The Plant Journal* **35**: 429-441.
- Kanrar S., Onguka O. & Smith H.M.S. (2006). *Arabidopsis* inflorescence architecture requires the activities of KNOX-BELL homeodomain heterodimers. *Planta* **224**, 1163-1173.
- Katanga K. (1989). Création d'hybrides interspécifiques entre le haricot de Lima (*Phaseolus lunatus* L.) et plusieurs espèces sauvages du genre *Phaseolus*. Possibilités de leur utilisation pour l'amélioration de l'espèce cultivée. PhD thesis, Gembloux Agricultural University, Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux, Gembloux, Belgium, 213 p.
- Kelly J.D., Gepts P., Miklas P.N. & Coyne D.P. (2003). Tagging and mapping of genes and QTL and molecular marker-assisted selection for traits of economic importance in bean and cowpea. *Field Crop Res* **82**: 135-154.
- Kerstetter R.A., Laudencia-Chinguanco D., Smith L.G. & Hake S. (1997). Loss of function mutations in the maize homeobox gene, knotted1, are defective in shoot meristem maintenance. *Development* **124**: 3045-3054.
- Kieffer M., Stern Y., Cook H., Clerici E., Maulbetsch C., Laux T. & Davies B. (2006). Analysis of the transcription factor WUSCHEL and its functional homologue in

- Antirrhinum* reveals a potential mechanism for their roles in meristem maintenance. *Plant Cell* **18**: 560-573.
- Kissinger CR, Liu B, Martin-Blanco E, Kornberg TB, Pabo CO (1990). Crystal structure of an engrailed homeodomain-DNA complex at 2.8 Å resolution: A framework for understanding homeodomain-DNA interactions. *Cell* **63**: 579-590.
- Klinge B., Überlacker B., Korfhage C. & Werr W (1996). ZmHox: a novel class of maize homeobox genes. *Plant Molecular Biology* **30**: 439-453.
- Koltai H., Dhandaydham M., Opperman C., Thomas J. & Bird D. (2001). Overlapping plant signal transduction pathways induced by a parasitic nematode and a rhizobial endosymbiont. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **14**: 1168-1177.
- Koornneef M., 2002. Classical mutagenesis in higher plants. *In*: Gilmartin P. M. & Bowler C. eds., *Molecular Plant Biology Volume 1*. Napoli, Italy, 1-11.
- Korfhage U., Trezzini G.F., Meier I., Hahlbrock K. & Somssich I.E. (1994). Plant homeodomain protein involved in transcriptional regulation of a pathogen defense-related gene. *Plant Cell* **6**: 695-708.
- Kornegay J. & Cardona C. (1991). Breeding for insect resistance in beans. *In*: van Schoonhoven A. & Voysest O. eds. *Common beans : research for crop improvement*. Wallingford, UK : CAB International, 619-648.
- Kornegay, J., Cardona C., van Esch J. & Alvarado M. (1989). Identification of common bean lines with ovipositional resistance to *Empoasca kraemeri* (Homoptera: Cicadellidae). *J Econ Entomol* **82**: 649-654.
- Kuromori T., Hirayama T., Kiyosue Y., Takabe H., Mizukado S., Sakurai T., Akiyama A., Kamiya A., Ito T. & Shinozaki K. (2004). A collection of 11800 single-copy *Ds* transposon insertion lines in *Arabidopsis*. *Plant J.*, **37** (6): 897-905.
- Kwong R.W., Bui A.Q., Lee H., Kwong L.W., Fischer R.L., Goldberg R.B. & Harada J.J. (2003). LEAFY COTYLEDON1-LIKE defines a class of regulators essential for embryo development. *Plant Cell*, **15** (1): 5-18.
- Lacadena J.R. (1977). Interspecific gene transfer in plant breeding. *In*: Sánchez-Monge E. & Garcia-Olmedo F., eds. *Interspecific Hybridization in Plant Breeding*. Proc. 8th. Eucarpia Congress 1977, Madrid 45-62.
- LaFayette P.R., Nagao R.T., O'Grady K., Vierling E. & Key J.L. (1996). Molecular characterization of cDNAs encoding low-molecular-weight heat shock proteins of soybean. *Plant Molecular Biology* **30**: 159-169.

- Lamppa R.S., Gross P.L. & del Rio L.E. (2002). Races of *Pseudomonas syringae* pv. *phaeolicola* in North Dakota. Annu Rep Bean Improv Coop 45: 104–105.
- Larson S.R., Rutger J.N., Young K.A., Raboy V. (2000). Isolation and genetic mapping of a non-lethal rice (*Oryza sativa* L.) low phytic acid 1 mutation. Crop Sci **40**: 1397-1405.
- Laterrot H. (1983). Use of a pollen mixture technique in interspecific crosses between *Lycopersicon esculentum* and *L. peruvianum*. Report Tomato Genetics Cooperative **33**: 3-4.
- Laux T. & Jürgens G. (1997). Embryogenesis: a new start into life. Plant Cell **9**: 989-1000.
- Laux T., Mayer K.F.X., Berger J. & Jurgens G. (1996). The WUSCHEL gene is required for shoot and floral meristem integrity in *Arabidopsis*. Development **122**: 87-96.
- Lecomte B (1997) Etude du développement embryonnaire *in vivo* et *in vitro* dans le genre *Phaseolus* L. PhD thesis, Gembloux Agricultural University, Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux, Gembloux, Belgium, 186 pp
- Lecomte B., Longly B., Crabbe J. & Baudoin J.P. (1998). Etude comparative du développement de l'ovule chez deux espèces de *Phaseolus*: *P. polyanthus* et *P. vulgaris*. BASE **2**: 77-84.
- Lee H., Fischer R.L., Goldberg R.B. & Harada J.J. (2003). *Arabidopsis* LEAFY COTYLEDON1 represents a functionally specialized subunit of the CCAAT binding transcription factor. Proc. Nati. Acad. Sci. USA **100**: 2152-2156.
- Lenne C. & Douce R. (1994). A low molecular mass heat-shock proteins is localized to higher plant mitochondria. Plant Physiology **105**: 1255-1261.
- Lerche M.H., Kragelund B.B., Bech L.M. & Poulsen F.M. (1997). Barley lipid transfer protein complexed with palmitoyl CoA: The structure reveals a hydrophobic binding site that can expand to fit both large and small lipid-like ligands. Structure **5**: 291-306.
- Lieb J.D., Albrecht M.R., Chuang P.T. & Meyer B.J. (1998). MIX-1: an essential component of the *C. elegans* mitotic machinery executes X chromosome dosage compensation. Cell **92** : 265-277.
- Lincoln C., Long J., Yamaguchi J., Serikawa K. & Hake S. (1994). A knotted1-like homeobox gene in *Arabidopsis* is expressed in the vegetative meristem and dramatically alters leaf morphology when overexpressed in transgenic plants. Plant Cell **6**: 1859-1876.
- Lindquist S. & Craig E.A. (1988). The heat-shock proteins. Annual Review of Genetics **22**: 631-677.

- Lioi L., Galasso I., Lanave C., Daminati M.G., Bollini R. & Sparvoli F. (2007). Evolutionary analysis of the APA genes in the *Phaseolus* genus: wild and cultivated bean species as sources of lectin-related resistance factors? *Theor Appl Genet* **115**: 959-970.
- Lisch D. (2002). Mutator transposons. *Trends Plant Sci.*, **7** (11): 498-504.
- Liu C.M. & Meinke D.W. (1998). The *titan* mutants of *Arabidopsis* are disrupted in mitosis and cell cycle control during seed development. *The Plant Journal* **16**: 21-31.
- Liu C.M., McElver J., Tzafrir I., Joosen R., Wittich P., Patton D., van Lammeren A.A. & Meinke D. (2002). Condensin and cohesin knockouts in *Arabidopsis* exhibit a *titan* seed phenotype. *The Plant Journal* **29**: 405-415.
- Liu Z. & Makaroff C.A. (2006). *Arabidopsis* separase AESP is essential for embryo development and the release of cohesin during meiosis. *Plant Cell* **18**: 1213-1225.
- Loewus F.A. & Murthy P.P.N. (2000). Myo-inositol metabolism in plants. *Plant Sci* **150**: 1-19.
- Long J.A., Moan E.I., Medford J.I. & Barton M.K. (1996). A member of the KNOTTED class of homeodomain proteins encoded by the STM gene of *Arabidopsis*. *Nature* **379**: 66-69.
- Lotan T., Ohto M., Matsudaira Yee K., West M.A.L., Lo R., Kwong R.W., Yamagishi K., Fischer R.L., Goldberg R.B. & Harada J.J. (1998). *Arabidopsis* Leafy Cotyledon1 is sufficient to induce embryo development in vegetative cells. *Cell* **93**: 1195-1205.
- Lu P., Porat R., Nadeau J.A. & O'Neil S.D. (1996). Identification of a meristem L1 layer-specific gene in *Arabidopsis* that is expressed during embryonic pattern formation and defines a new class of homeobox genes. *Plant Cell* **8**: 2155-2168.
- Lukowitz W., Nickle T.C., Meinke D.W., Last R.L., Conklin P.L. & Somerville C.R. (2001). *Arabidopsis* *cyt1* mutants are deficient in a mannose-1-phosphate guanylyltransferase and point to a requirement of N-linked glycosylation for cellulose biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 2262-2267.
- Lukowitz W., Roeder A., Parmenter D. & Somerville C. (2004). A MAPKK Kinase gene regulates extra-embryonic cell fate in *Arabidopsis*. *Cell* **116**: 109-119.
- Ma H., McMullen M.D. & Finer J.J. (1994). Identification of a homeobox-containing gene with enhanced expression during soybean (*Glycine max* L.) somatic embryo development. *Plant Molecular Biology* **24**: 465-473.
- Ma Z. & Dooner H.K. (2004). A mutation in the nuclear-encoded plastid ribosomal protein S9 leads to early embryo lethality in maize. *Plant J.*, **37** (1): 92-103.

- Magnard J.L., Heckel T., Massonneau A., Wisniewski J.P., Cordelier S., Lassagne H., Perez P., Dumas C. & Rogowsky P.M. (2004). Morphogenesis of maize embryos requires ZmPRPL35-1 encoding a plastid ribosomal protein. *Plant Physiol.*, **134**, 649-663.
- Mahuku G., Montoya C., Henriquez M.A., Jara C., Teran H. & Beebe S. (2004). Inheritance and characterization of angular leaf spot resistance gene present in common bean accession G 10474 and identification of an AFLP marker linked to the resistance gene. *Crop Sci* **44**: 1817-1824.
- Mahuku G.S., Jara C.E., Cajiao C. & Beebe S. (2002). Sources of resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* in the secondary gene pool of *Phaseolus vulgaris* and in crosses of primary and secondary gene pools. *Plant Dis.* **86**:1383-1387.
- Mahuku G.S., Jara C.E., Cajiao C. & Beebe S. (2003). Sources of resistance to angular leaf spot (*Phaeoisariopsis griseola*) in common bean core collection, wild *Phaseolus vulgaris* and secondary gene pool. *Euphytica* 130:303-313.
- Maluszynski M., Nichterlein K., van Zanten L. & Ahloowalia B.S. (2000). Officially released mutant varieties – the FAO/IAEA Database. *Mut. Breed. Rev.* **12**: 1-84.
- Mannella C.A. & Colombini M. (1984). Toward the molecular structure of the mitochondrial channel, VDAC. *J Bioenerg. Biomembr* **24**: 7-19.
- Maquet A., Zoro Bi I., Delvaux M., Wathelet B. & Baudoin JP. (1997). Genetic structure of a Lima bean base collection using allozyme markers. *Theor. Appl. Genet.* 95: 980–991.
- Maréchal R., Mascherpa J.M. & Stainier F. (1978). Etude taxonomique d'un groupe complexe d'espèces des genres *Phaseolus* et *Vigna* sur la base de données morphologiques et polliniques traitées par l'analyse informatique. *Boisiera* **28**: 273.
- Martienssen R.A. (1998). Functional genomics: probing plant gene function and expression with transposons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 2021–2026.
- Martinez J.P., Silva H., Ledent J.F. & Pinto M. (2007). Effect of drought stress on the osmotic adjustment, cell wall elasticity and cell volume of six cultivars of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *European Journal of Agronomy* **26**: 30-38.
- Matsuoka M., Ichikawa H., Saito A., Tada Y., Fujimura T. & Kano-Murakami Y. (1993). Expression of a rice homeobox gene causes altered morphology of transgenic plants. *Plant Cell* **5**: 1039-1048.
- Maxam, A. M. and W. Gilbert (1977). A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**(2): 560-564.
- McBride H.M., Neuspiel M. & Wasiak S. (2006). Mitochondria: more than just a powerhouse. *Curr. Biol.* **16**: R551-R560.

- McCallum C.M., Comai L., Greene E.A. & Henikoff S. (2000). Targeting Induced Local Lesions IN Genomes (TILLING) for plant functional genomics. *Plant Physiol.* **123**: 439-442.
- McElver J., Patton D., Rumbaugh M., Liu C.M., Yang L.J. & Meinke D. (2000). The TITAN5 gene of *Arabidopsis* encodes a protein related to the ADP ribosylation factor family of GTP binding proteins. *Plant Cell* 12: 1379-1392.
- McElver J., Tzafrir I., Aux G., Rogers R., Ashby C., Smith K., Thomas C., Schetter A., Zhou Q., Cushman M.A., Tossberg J., Nickle T., Levin J.Z., Law M., Meinke D. & Patton D. (2001). Insertional mutagenesis of genes required for seed development in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **159**: 1751-1763.
- McGinnis W., Levine M.S., Hafen E., Kuroiwa A. & Gehring W.J. (1984). A conserved DNA sequence in homeotic genes of the *Drosophila* antennapedia and bithorax complexes. *Nature* **308**: 428-433.
- McKern N.M., Mink G.I., Barnett O.W., Mishra A., Whittaker L.A., Silbernagel M.J., Ward C.W. & Shukla D.D. (1992). Isolates of bean common mosaic virus comprising two distinct potyviruses. *Phytopathology* **82**: 923-928.
- Meijer E.A., de Vries S.C., Sterk P., Gadella Jr. D.W.J., Karel Wirtz K.W.A. & Hendriks T. (1993). Characterization of the non-specific lipid transfer protein EP2 from carrot (*Daucus carota* L.). *Molecular and Cellular Biochemistry* **123**:159-166.
- Meinke D.W. (1985). Embryo-lethal mutants of *Arabidopsis thaliana*: analysis of mutants with a wide range of lethal phases. *Theor. Appl. Genet.* **69**: 543-552.
- Meinke D.W. (1992). A homeotic mutant of *Arabidopsis thaliana* with leafy cotyledons. *Science* **258**: 1647-1650.
- Meinke D.W. (1995). Molecular genetics of plant embryogenesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **46**: 369-394.
- Meinke DW (1994) Seed development in *Arabidopsis*. In: Meyerowitz E.M., Somerville C.R., Eds. *Arabidopsis*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp 253-295.
- Melotto M., Balardin R.S. & Kelly J.D. (2000). Host-pathogen interaction and variability of *Colletotrichum lindemuthianum*. In: Prusky D., Freeman S. & Dickman M.B. eds., *Colletotrichum host specificity, pathology, and host-pathogen interaction*. St. Paul, Minnesota, USA: APS Press, 346-361.

- Mendoza M.S., Dubreucq B., Miquel M., Caboche M. & Lepiniec L. (2005). Leafy Cotyledon2 activation is sufficient to trigger the accumulation of oil and seed specific mRNAs in *Arabidopsis* leaves. *FEBS Letters* **579**: 4666-4670.
- Mergei G., Schmit V., Lecomte B. & Baudoin J. P. (1997). Mise au point d'une technique de culture *in vitro* d'embryons immatures de *Phaseolus*. *BASE* **1**: 49 – 58.
- Meunier E., 2005. Des plantes mutantes dans nos assiettes. *Inf'OGM* **67**, Septembre 2005.
- Michael A.F., Michael K.D. & Gail R.M. (1988). Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts : Amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer (polymerase chain reaction/5' and 3' cDNA ends/cDNA cloning/low-abundance mRNAs/int-2 gene). *Proc. Nati. Acad. Sci. USA* **85**: 8998-9002.
- Michaelis C., Ciosk R. & Nasmyth K. (1997). Cohesins: chromosomal proteins that prevent premature separation of sister chromatids. *Cell* **91**: 35-45.
- Miklas P.N., Coyne D.P., Grafton K.F., Mutlu N., Reiser J., Lindgren D.T. & Singh S.P. (2003). A major QTL for common bacterial blight resistance derives from the common bean great northern landrace cultivar Montana No. 5. *Euphytica* **131**: 137-146.
- Miklas P.N., Kelly J.D., Beebe S.E. & Blair M.W. (2006). Common bean breeding for resistance against biotic and abiotic stresses: From classical to MAS breeding. *Euphytica* **147**: 105–131.
- Miklas P.N., Zapata M., Beaver J.S. & Grafton K.F. (1999). Registration of four dry bean germplasms resistant to common bacterial blight: ICB-3, ICB-6, ICB-8 and ICB-10. *Crop Sci.* **39**:594.
- Modrusan Z., Reiser L., Feldmann K.A., Fischer R.L. & Haughn G.W. (1994). Homeotic transformation of ovules into carpel-like structures in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **6**: 333-349.
- Mok M.C. (1994). Cytokinins and plant development, an overview. *In*: Mok D.W.S., Mok M.C. Eds. *Cytokinins: Chemistry, Activity, and Function*, CRC Press, Boca Raton, Florida, pp 155-166.
- Molina A., Segura A. & García-Olmedo F. (1993). Lipid transfer proteins (nsLTPs) from barley and maize leaves are potent inhibitors of bacterial and fungal plant pathogens. *FEBS Letters* **316**: 119-122.
- Monéger F. & Tagu D., 2003. Séquençage d'ADN. *In*: Tagu D. and Moussard C. eds. *Principes des techniques de biologie moléculaire*, INRA, Paris, France, pp 76-79.
- Moon Y.H., Choi S.B., Kim J.I., Han T.J., Cho S.H., Kim W.T. & Lee K.W. (1996). Isolation and characterization of a homeodomain-leucine Zipper gene, *Gmh1*, from soybean somatic embryo. *Molecules and Cells* **6**: 366-373.
- Morère J.L. & Pujol R., 2003. *Dictionnaire raisonné de Biologie*. Paris: Frison-Roche.

- Morot-Gaudry J.F. (1997). Assimilation de l'azote chez les plantes : aspects physiologique, biochimique et moléculaire. Versailles : Quae.
- Mukeshimana G., Paneda A., Rodriguez C., Ferreira J.J., Giraldez R. & Kelly J.D. (2005). Markers linked to the bc-3 gene conditioning resistance to bean common mosaic potyviruses in common bean. *Euphytica* **144**: 291-299.
- Muller J., Wang Y., Franzen R., Santi L., Salamini F. & Rohde W. (2001). *In vitro* interactions between barley TALE homeodomain proteins suggest a role for protein-protein associations in the regulation of Knox gene function. *The Plant Journal* **27**: 13-23.
- Nadeau J.A., Zhang X.S., Li J. & O'Neill S.D. (1996). Ovule development: identification of stage specific and tissue-specific cDNAs. *Plant Cell* **8**: 213-239.
- Nambara E., Hayama R., Tsuchiya Y., Nishimura M., Kawaide H., Kamiya Y. & Naito S. (2000). The role of ABI3 and FUS3 loci in *Arabidopsis thaliana* on phase transition from late embryo development to germination. *Developmental Biology* **220**: 412-423.
- Napier J.A., Smith M.A., Keith Stobart A. & Shewry P.R. (1995). Isolation of a cDNA encoding a cytochrome b₅ specifically expressed in developing tobacco seeds. *Planta* **197** : 200-202.
- Nassar M. A. S. (1978). Studies of reciprocal interspecific hybridisations between *Phaseolus coccineus* L. and *Phaseolus vulgaris* L. Ph. D. Thesis, Southampton University, Biology Department, England, 287 p.
- Neuffer M.G. & Sheridan W.F. (1980). Defective kernel mutants of maize. I. Genetic and lethality studies. *Genetics* **95**: 929-944.
- Nguema N.P. (2007). Etude histologique de l'embryogenèse chez *Phaseolus coccineus* L. et *P. vulgaris* L. et chez les hybrides réciproques entre ces deux espèces. Thèse de doctorat: Faculté universitaire des Sciences agronomiques de Gembloux (Belgique), 173 p.
- Nguema N.P., Toussaint A. & Baudoin J.P. (2007a). Embryogenèse précoce comparative lors des croisements entre *Phaseolus coccineus* L. et *Phaseolus vulgaris* L. *BASE* **11**: 97-107.
- Nguema N.P., Toussaint A. & Baudoin J.P. (2007b). Embryo abortion and histological features in the interspecific cross between *Phaseolus vulgaris* L. and *P. coccineus* L. *Plant Cell Tiss Organ Cult* **88**: 329-332
- Nishimura A., Tamaoki M., Sakamoto T. & Matsuoka M. (2000). Over-expression of tobacco knotted1-type class1 homeobox genes alters various leaf morphology. *Plant and Cell Physiology* **41**: 583-590.

- Nishimura A., Tamaoki M., Sato Y. & Matsuoka M. (1999). The expression of tobacco knotted1-type class 1 homeobox genes correspond to regions predicted by the cytohistological zonation model. *The Plant Journal* **18**: 337-347.
- Noodén L.D. (1988). The phenomena of senescence and aging. *In*: Noodén LD, Leopold AC Eds. *Senescence and Aging in Plants*, Academic Press, Inc., San Diego, CA, pp 1-50.
- Noordermeer M.A., Veldink G.A. & Vliegthart F.G. (2001). Fatty acid hydroperoxide lyase: a plant cytochrome P450 enzyme involved in wound healing and pest resistance. *ChemBioChem* **2**: 494–504.
- Noshiro M. & Omura T. (1978). Immunocbemical study on the electron pathway from NADH to cytochrome P-450 of liver microsomes. *J Biochem* **83** : 61-77.
- Nultsch W. (1998). *Botanique générale*. Paris (France), Louvain-la-Neuve (Belgique) : De Boeck Université.
- Nunes A.C.S., Vianna G.R., Cuneo F., Amaya-Farfan J., de Capdeville G., Rech E.L., Aragao F.J.L. (2006). RNAi-mediated silencing of the myo-inositol-1-phosphate synthase gene (GmMIPS1) in transgenic soybean inhibited seed development and reduced phytate content. *Planta* **224**: 125-132.
- Nyabyenda P. (2005). *Les plantes cultivées en régions tropicales d'altitude d'Afrique : Généralités, Légumineuses alimentaires, Plantes à tubercules et racines, Céréales*. Gembloux : Presses Agronomiques de Gembloux.
- Nzungize Rusagara J. (2005). Etude des hybrides interspécifiques : *Phaseolus coccineus* L. x *Phaseolus vulgaris* L. et *Phaseolus polyanthus* Greenm. x *Phaseolus vulgaris* L. Mémoire de DEA, Faculté Universitaires des Sciences Agronomiques de Gembloux, 80 p.
- Obando L., Lepoivre P. & Baudoin J.P. (1988). Sources of resistance to *Phoma exigua* in the secondary gene pool of *Phaseolus vulgaris*. *Annu. Rep. Bean Improv. Coop.* 31: 117-118.
- Osorno J.M., Beaver J.S., Ferwerda F.H. & Miklas P.N. (2003). Two genes from *Phaseolus coccineus* L. confer resistance to bean golden yellow mosaic virus. *Annu Rep Bean Improv Coop* **46**: 147-148.
- Otoul E. & 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, Faculté Universitaires des Sciences Agronomiques de Gembloux, 144 p., 13 fig., 32 tabl.
- Palena CM, Chan RL, Gonzalez DH (1997) A novel type of dimerization motif, related to leucine zippers, is present in plant homeodomain protein. *Biochimica et Biophysica Acta* **1352**, 203-212
- Pankhurst C, Blair MW & Broughton WJ (2004). Tilling the beans. Proceeding Phaseomics III. June 13-15, 2004 Geneva, Switzerland, p 28.
- Parinov S. & Sundaesan V. (2000). Functional genomics in *Arabidopsis*: Large scale insertional mutagenesis complements the genome sequencing project. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **11**, 157-161.
- Park S.J. & Buttery B.R. (1992). Ethyl-methane sulphonate (EMS) induced nodulation mutants of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) lacking effective nodules. *Plant Soil* **139**: 295 - 298.
- Park S.J. & Buttery B.R. (2006). Registration of ineffective nodulation mutant R69 and non-nodulation mutant R99 common bean genetic stocks. *Crop Sci.*, **46** (3), 1415-417.
- Passardi F., Cosio C., Penel C. & Dunand C. (2005). Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. *Plant Cell Rep* **24**: 255-65.
- Payment P. & Trudel M. (1989). Manuel de techniques virologiques. Québec, Presses de l'Université du Québec.
- Pearson W.R. & Lipman D.J. (1988). Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85** : 2444-2448.
- Pedalino M., Giller K.E. & Kipe-Nolt J. (1992). Genetic and Physiological Characterization of the Non-nodulating Mutant of *Phaseolus vulgaris* L. -NOD125. *J. Exp. Bot.*, **43** (6): 843-849.
- Pereira A. (2000). A transgenic perspective on plant functional genomics. *Transgenic Res.* **9**: 245-260.
- Perry J.A., Wang T.L., Welham T.J., Gardner S., Pike J.M., Yoshida S. & Parniske M. (2003). A TILLING reverse genetics tool and a web-accessible collection of mutants of the legume *Lotus japonicus*. *Plant Physiol.* **131**: 866-871.
- Pevzner P.A. (2006). Séquençage. In : Puech N., ed. *Bio-informatique moléculaire : une approche algorithmique*. Paris, France Springer-Verlag, 59-65.
- Pillemer E.A. & Tingey W.M. (1976). Hooked trichomes: A physical barrier to a major agricultural pest. *Science* **193**: 482-474.

- Pons J.L., de Lamotte F., Gautier M.F. & Delsuc M.A. (2003). Refined solution structure of a liganded type 2 wheat nonspecific lipid transfer protein. *The Journal of Biological Chemistry* **278**: 14249-14256.
- Postma-Haarsma A.D., Verwoert I.I.G.S., Stronk O.P., Koster J., Lamers G.E.M., Hoge J.H.C. & Meijer A.M.H. (1999). Characterization of the KNOX class homeobox genes *Oskn2* and *Oskn3* identified in a collection of cDNA libraries covering the early stages of rice embryogenesis. *Plant Molecular Biology* **39**: 257-271.
- Poznanski J., Sodano P., Suh S.W., Lee J.Y., Ptak M. & Vovelle F. (1999). Solution structure of a lipid transfer protein extracted from rice seeds comparison with homologous proteins. *The European Journal of Biochemistry* **259**: 692-708.
- Prendota K. (1984). Recherches sur l'utilisation de *Phaseolus acutifolius* A. Gray pour l'amélioration du haricot commun (*Phaseolus vulgaris* L.). Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux (Belgium). Thèse de Doctorat. 181 p.
- Prigge M.J., Otsuga D., Alonso J.M., Ecker J.R., Drews G.N. & Clark S.E. (2005). Class III homeodomain-leucine zipper gene family members have overlapping, antagonistic, and distinct roles in *Arabidopsis* development. *Plant Cell* **17**: 61-76.
- Pyee J. & Kolattukudy P.E. (1995). The gene for the major cuticular wax-associated protein and three homologous genes from broccoli (*Brassica oleracea*) and their expression patterns. *The Plant Journal* **7**: 49-59.
- Rademacher E.H. & Weijers D. (2007) Got root? - Initiation of the embryonic root meristem. *International Journal of Plant Developmental Biology* **1**, 122-126.
- Raghavan V. (1997). *Molecular Embryology of Flowering Plants*, Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom, pp. 712.
- Rainey K.M. & Griffiths P.D. (2005): Inheritance of heat tolerance during reproductive development in snap bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **130**, 700-706.
- Reiser L., Modrusan Z., Margossian L., Samach A., Ohad N., Haughn G.W. & Fischer R.L. (1995). The *BELL1* gene encodes a homeodomain protein involved in pattern formation in the *Arabidopsis* ovule primordium. *Cell* **83**: 735-742.
- Reiser L., Sanchez-Baracaldo P. & Hake S. (2000). Knots in the family tree: Evolutionary relationships and functions of knox homeobox genes. *Plant Molecular Biology* **42**: 51-166.
- Rendón F., Cardona M.C. & Bueno J.M. (2001). Losses caused by *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae) and *Trips palmi* (Thysanoptera: Thripidae) on

- snap beans in the Cauca Valley of Colombia. *Revista Colombiana de Entomología* **27** (1-2):39-43.
- Robinson-Beers K., Pruitt R.E. & Gasser C.S. (1992). Ovule development in wildtype *Arabidopsis* and two female-sterile mutants. *Plant Cell* **4**: 1237-1249.
- Rochat C. & Boutin J.P. (1992). Temporary storage compounds and sucrose-starch metabolism in seed coats during pea seed development (*Pisum sativum*). *Physiologia Plantarum* **85**: 567-572.
- Roeder A.H., Ferrandiz C. & Yanofsky M.F. (2003) The role of the REPLUMLESS homeodomain protein in patterning the *Arabidopsis* fruit. *Current Biology* **13**: 1630-1635.
- Rojo E., Gillmor C.S., Kovaleva V., Somerville C.R. & Raikhel N.V. (2001). VACUOLELESS1 is an essential gene required for vacuole formation and morphogenesis in *Arabidopsis*. *Developmental Cell* **1**: 303-310.
- Rosas J.C., Castro J.A., Hernandez J.C. & Araya R. (2003). Registration of Bribri small red bean (race Mesoamerica). *Crop Sci.* **43**: 430-431.
- Rueckert D.G. & Schmidt K. (1990). Lipid transfer proteins. *Chemistry and Physics of Lipids* **56**:1-20.
- Salcedo G., Sánchez-Monge R., Barber D. & Díaz-Perales A (2007). Plant nonspecific lipid transfer proteins: An interface between plant defence and human allergy. *Biochimica et Biophysica Acta* **1771**, 781-791.
- Sanderfoot A.A., Assaad F.F. & Raikhel N.V. (2000). The *Arabidopsis* genome. An abundance of soluble N-Ethylmaleimide-Sensitive factor adaptor protein receptors 1. *Plant Physiol.* **124**:1558-1569.
- Sanger F. & Nicklen S. & Coulson A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74** (12): 5463-5467.
- Sato Y., Hong S., Tagiri A., Kitano H., Yamamoto N., Nagato Y. & Matsuoka M. (1996). A rice homeobox gene, OSH1, is expressed before organ differentiation in a specific region during early embryogenesis. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA* **93**: 8117-8122.
- Sato Y., Sentoku N., Nagato Y. & Matsuoka M. (1998). Isolation and characterization of a rice homeobox gene, OSH15. *Plant Molecular Biology* **38**, 983-998.
- Scanlon M.J., Myers A.M., Schneeberger R.G. & Freeling M. (1997). The maize gene empty pericarp-2 is required for progression beyond early stages of embryogenesis. *Plant J.* **12**: 901-909.

- Scanlon M.J., Stinard P.S., James M.G., Myers A.M. & Robertson D.S. (1994). Genetic analysis of 63 mutations affecting maize kernel development isolated from Mutator stocks. *Genetics* **136**: 281-294.
- Schena M, Davis RW (1992) HD-Zip proteins: Members of an Arabidopsis homeodomain protein superfamily. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **89**, 3894-3898.
- Schindler U., Beckmann H. & Cashmore A.R. (1993). HAT3.1, a novel *Arabidopsis* homeodomain protein containing a conserved cysteine-rich region. *The Plant Journal* **4**: 137-150.
- Schmit V. & 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.
- Schmit V. & Baudoin J.P. (1992). Screening for resistance to *Ascochyta* blight in populations of *P. coccineus* L. and *P. polyanthus* Greenman. *Field Crops Res* **30**: 155-165.
- Schmit V. (1992). Etude de *Phaseolus polyanthus* Greenm. et autres taxons du complexe *Phaseolus coccineus* L. Thèse de doctorat, Faculté Universitaires des Sciences Agronomiques de Gembloux, 198 p.
- Schmulling T. (2002). New insights into the functions of cytokinins in plant development. *Journal of Plant Growth Regulation* **21**: 40-49.
- Schöffl F., Prandl R. & Reindl A. (1998). Regulation of the heat-shock response. *Plant Physiology* **117**: 1135-1141.
- Schwartz B., Yeung E. & Meinke D. (1994). Disruption of morphogenesis and transformation of the suspensor in abnormal suspensor mutants of Arabidopsis. *Dev Suppl* **120**: 3235-3245
- Schwartz H.F., Correa V.F., Pineda P.A.D., Oyata M.M. & Katherman M.J. (1981). Dry bean yield losses caused by *Ascochyta angular* and white leaf spots in Colombia. *Plant Disease* **65**: 383-385.
- Schwartz H.F., Pastor-Corrales M.A. & Singh S.P. (1982). New sources of resistance to anthracnose and angular leaf spot of beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Euphytica* **31**: 741-754.
- Sentoku N., Sato Y., Kurata N., Ito Y., Kitano H. & Matsuoka M (1999). Regional expression of the rice KN1-type homeobox gene family during embryo, shoot, and flower development. *Plant Cell* **11**, 1651-1663.

- Sentoku N., Tamaoki M., Nishimura A. & Matsuoka M. (1998). The homeobox gene NTH23 of tobacco is expressed in the basal region of leaf primordia. *Biochimica et Biophysica Acta* **1399**: 203-208.
- Serikawa K.A., Martinez-Laborda A., Kim H.S. & Zambryski P.C. (1997). Localization of expression of KNAT3, a class 2 knotted1-like gene. *The Plant Journal* **11**: 853-861.
- Serikawa K.A., Martinez-Laborda A., Zambryski P.C. (1996). Three knotted1-like homeobox genes in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* **32**: 673-683.
- Sharma K.K. & Lavanya M. (2002). Recent developments in transgenics for abiotic stress in legumes of the semi-arid tropics. *JIRCAS Working Report* **23**: 61-73.
- Shen B., Sinkevicius K.W., Selinger D.A. & Tarczynski M.C. (2006). The homeobox gene GLABRA2 affects seed oil content in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* **60**, 377-387
- Sheridan W.F. & Neuffer M.G. (1980). Defective kernel mutants of maize: II. Morphological and embryo culture studies. *Genetics* **95**: 945-960.
- Silue S., Lariguet P., Pankhurst C., Jacquemin J.M., Broughton W.J. & Baudoin J.P., 2006. Screening *Phaseolus vulgaris* L. EMS mutants to isolate plants wich failed in seed development. *Ann. Rept. Bean Improv. Coop.*, **49**: 149-150.
- Singh S.P. (1999). Integrated genetic improvement. *In*: Singh S.P. Ed. *Common Bean Improvement in the Twenty-First Century*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 133-165.
- Singh S.P. (2001). Broadening the genetic base of common beans cultivars: A review. *Crop Sci.* **41**:1659–1675.
- Smith H.M.S. & Hake S. (2003). The interaction of two homeobox genes, BREVIPEDICELLUS and PENNYWISE, regulates internode patterning in the *Arabidopsis* inflorescence. *Plant Cell* **15**: 1717-1727.
- Smith H.M.S., Campbell B.C. & Hake S. (2004). Competence to respond to floral inductive signals requires the homeobox genes PENNYWISE and POUNDFOOLISH. *Current Biology* **14**: 812-817.
- Smith L.M., Sanders J.Z., Kaiser R.J., Hughes P., Dodd C., Connell C.R., Heiner C., Kent S.B. & Hood L.E. (1986). Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature* **321** (6071) : 674-679.
- Smolenaars M.M.W., Madsen O., Rodenburg K.W. & Van der Horst D.J. (2007). Molecular diversity and evolution of the large lipid transfer protein superfamily. *Journal of Lipid Research* **48**: 489-502.

- Snapp S., Kirk W., Roman-Avilés B. & Kelly J. (2003). Root traits play a role in integrated management of *Fusarium* root rot in snap beans. *Hortscience* **38**: 187-191.
- Sodano P., Caille A., Sy D., de Person G., Marion D. & Ptak M. (1997). ¹H NMR and fluorescence studies of the complexation of DMPG by wheat nonspecific lipid transfer protein. Global fold of the complex. *FEBS Letters* **416**: 130-134.
- Söderman E., Hjellström M., Fahleson J. & Engström P. (1999). The HD-Zip gene *ATHB6* in *Arabidopsis* is expressed in developing leaves, roots and carpels and up-regulated by water deficit conditions. *Plant Molecular Biology* **40**: 1073-1083.
- Sossountzov L., Ruiz-Avila L., Vignols F., Jolliot A., Arondel V., Tchang F., Grosbois M., Guerbette F., Miginiac E., Delseny M., Puigdomenèch P. & Kader J.C. (1991) .Spatial and temporal expression of a maize Lipid Transfer Protein gene. *Plant Cell* **3**: 923-933.
- Soufleri I.A., Vergnolle C., Miginiac E., Kader J.C. (1996). Germination-specific lipid transfer protein cDNAs in *Brassica napus* L. *Planta* **199**: 229-237.
- Srivastava A.K., Venkatachalam P., Raghothama K.G. & Sahi S.V. (2007). Identification of lead-regulated genes by suppression subtractive hybridization in the heavy metal accumulator *Sesbania drummondii*. *Planta* **225**:1353–1365, DOI 10.1007/s00425-006-0445-3.
- States D.J. & Botstein D. (1991). Molecular sequence accuracy and the analysis of protein coding regions. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA* **88** : 5518-5522
- Stavelly J.R. (2000). Pyramiding rust and viral resistance genes using traditional and marker techniques in common bean. *Ann Rep Bean Imp Coop* **43**: 1-4.
- Steeves T.A. & Sussex I.M. (1989). The structure of the shoot apex. *In*: Steeves T.A. & Sussex I.M. eds. *Patterns in Plant Development*. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 46-61.
- Sterk P., Booij H., Schellekens G.A., Van Kammen A. & de Vries S.C. (1991). Cell specific expression of the carrot EP2 lipid transfer protein gene. *Plant Cell* **3**: 907-921.
- Sundas-Larsson A., Svenson M., Liao H. & Engström P. (1998). A homeobox gene with potential developmental control function in the meristem of the conifer *Picea abies*. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA* **25**: 15118-15122.
- Takegami J.C. & Beaver J.S. (2000). Heritability of web blight resistance in common bean. *Ann. Rep. Bean Improv. Coop.* **43**: 43-44.
- Takumi S., Kosugi T., Murai K., Mori N. & Nakamura C. (2000). Molecular cloning of three homoeologous cDNAs encoding orthologs of the maize *KNOTTED1* homeobox protein from young spikes of hexaploid wheat. *Gene* **249**: 171-181.

- Tan Q.K.G. & Irish V.F. (2006). The *Arabidopsis* zinc finger-homeodomain genes encode proteins with unique biochemical properties that are coordinately expressed during floral development. *Plant Physiology* **140**: 1095-1108.
- Tanabe S., Ashikari M., Fujioka S., Takatsuto S., Yoshida S., Yano M., Yoshimura A., Kitano H., Matsuoka M., Fujisawa Y., Kato H. & Iwasakia Y. (2005). A novel cytochrome P450 is implicated in brassinosteroid biosynthesis via the characterization of a rice dwarf mutant, *dwarf11*, with reduced seed length. *Plant Cell* **17**: 776-790.
- Tang Z., Sadka A., Morishige D.T. & Mullet J.E. (2001). Homeodomain leucine zipper proteins bind to the phosphate response domain of the soybean VspB tripartite promoter. *Plant Physiology* **125**: 797-809.
- Tateno Y., Miyazaki S., Ota M., Sugawara H. & Gojobori. T. (2000). DNA Data Bank of Japan (DDBJ) in collaboration with mass sequencing teams. *Nucleic Acids Res.* **28** : 24-26.
- Taylor J.D., Teverson D.M., Allen D.J. & Pastor-Corrales M.A (1996). Identification and origin of races of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* from Africa and other bean growing areas. *Plant Pathol.* **45** (3) : 469-478.
- Teran H. & Singh S.P. (2002). Comparison of sources and lines selected for drought resistance in common bean. *Crop Sci* **42**: 64-70.
- Thoma S.L., Hecht U., Kippers A., Botella J., de Vries S. & Sommerville C. (1994). Tissue-specific expression of a gene encoding a cell wall-localized lipid transfer protein from *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **105**: 35-45.
- Thoma S.L., Kaneko Y. & Somerville C. (1993). An *Arabidopsis* lipid transfer protein in the cell wall. *The Plant Journal* **3**: 427-437.
- Till B.J, Cooper J., Tai T.H., Colowit P., Greene E.A, Henikoff S. & Comai L., 2007. Discovery of chemically induced mutations in rice by TILLING. *BMC Plant Biology* **7**: 19.
- Till B.J., Reynolds S.H., Weil C., Springer N., Burtner C., Young K., Bowers E., Codomo C.A., Enns L.C., Odden A.R., Greene E.A., Comai L. & Henikoff S. (2004). Discovery of induced point mutations in maize genes by TILLING *BMC Plant Biology* **4**:12.
- Tornero P., Conejero V. & Vera P. (1996). Phloem-specific expression of a plant homeobox gene during secondary phases of vascular development. *The Plant Journal* **9**: 639-648.
- Toussaint A., Geerts P., Clement F., Mergeai G. & 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. *Belg. Journ. Bot.*, **137** (1), 47-54.

- Tranbarger T.J. & Misra S. (1995). The molecular characterization of a set of cDNAs differentially expressed during Douglas-fir germination and early seedling development. *Physiologia Plantarum* **95**: 456-464.
- 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, Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux, 177 p.
- Tsiantis M. & Hay A. (2003). Comparative plant development: the time of the leaf? *Nature Reviews Genetics* **4**: 169-180.
- Tsuboi S., Osafune T., Tsugeki R., Nishimura M. & Yamada M. (1992). Nonspecific Lipid Transfer Protein in castor bean cotyledon cells: subcellular localization and a possible role in lipid metabolism. *Journal of Biochemistry* **111**: 500-508.
- Tzafrir I., Dickerman A., Brazhnik O., Nguyen Q., McElver J., Frye C., Patton D. & Meinke D. W. (2003). The *Arabidopsis* SeedGenes project. *Nucleic Acids Res.*, **31**, 90-93.
- Tzafrir I., McElver J.A., Liu C.M., Yang L.J., Wu J.Q., Martinez A., Patton D.A. & Meinke D.W. (2002). Diversity of TITAN functions in *Arabidopsis* seed development. *Plant Physiology* **128**: 38-51.
- Tzafrir I., Pena-Muralla R., Dickerman A., Berg M., Rogers R., Hutchens S., Sweeney T.C., McElver J., Aux G., Patton D. & Meinke D. W. (2004). Identification of genes required for embryo development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **135**: 1206-1220.
- Überlacker B., Klinge B. & Werr W. (1996). Ectopic expression of the maize homeobox genes ZmHOX1a or ZmHox1b causes pleiotropic alterations in the vegetative and floral development of transgenic tobacco. *Plant Cell* **8**: 349-362.
- Umehara M., Ikeda M. & Kamada H. (2007). Endogenous factors that regulate plant embryogenesis: Recent advances. *Japanese Journal of Plant Science* **1**: 1-6.
- Umezawa T., Sakurai T., Totoki Y., Toyoda A., Seki M., Ishiwata A., Akiyama K., Kurotani A., Yoshida T., Mochida K., Kasuga M., Todaka D., Maruyama K., Nakashima K., Enju A., Mizukado S., Ahmed S., Yoshiwara K., Harada K., Tsubokura Y., Hayashi M., Sato S., Anai T., Ishimoto M., Funatsuki H., Teraishi M., Osaki M., Shinano T., Akashi R., Sakaki Y., Yamaguchi-Shinozaki K. & Shinozaki K. (2008). Sequencing and analysis of approximately 40 000 soybean cDNA clones from a full-length-enriched cDNA library. *DNA Research* 1–14. doi:10.1093/dnares/dsn024

- van Enkevort L.E.J.G., Droc G., Piffanelli P., Greco R., Gagneur C., Weber C., Gonzalez V.M., Cabot P., Fornara F., Berri S., Miro B., Lan P., Rafel M., Capell T., Puigdomenech P., Ouwerkerk P.B.F., Meijer A.H., Pe E., Colombo L., Christou P., Guiderdoni E. & Pereira A. (2005). EU-OSTID: a collection of transposon insertional mutants for functional genomics in rice. *Plant Mol. Biol.* **59**: 99-110.
- Veitch N.C. (2004). Structural determinants of plant peroxidase function. *Phytochemistry Reviews* **3**: 3-18.
- Vernoud V., Hajduch M., Khaled A.S., Depège N. & Rogowsky P.M., 2005. Maize embryogenesis. *Maydica* **50**: 469-483.
- Vierling E. (1991). The roles of heat shock proteins in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **42**: 579-620.
- Vignols F., Wigger M., García-Garrido J.M., Grellet F., Kader J.C. & Delseny M. (1997). Rice lipid transfer protein (LTP) genes belong to a complex multigene family and are differentially regulated. *Gene* **195**: 177-186.
- Vittorioso P., Cowling R., Faure J.D., Caboche M. & Bellini C. (1998). Mutation in the *Arabidopsis* PASTICCINO gene, which encodes a new FK506-binding protein-like protein, has a dramatic effect on plant development. *Molecular and Cell Biology* **18**: 3034-3043.
- Vollbrecht E., Reiser L. & Hake S. (2000). Shoot meristem size is dependent on inbred background and presence of the maize homeobox gene, knotted1. *Development* **127**: 3161-3172.
- Vollbrecht E., Veit B., Sinha N. & Hake S. (1991). The developmental gene Knotted-1 is a member of a maize homeobox gene family. *Nature* **350**: 241-243.
- Vroemen C.W., Langeveld S., Mayer U., Ripper G., Jürgens G., van Kammen A. & de Vries S. (1996). Pattern formation in the *Arabidopsis* embryo revealed by position-specific Lipid Transfer Protein gene expression. *Plant Cell* **8**: 783-791.
- Wang H., Guo J., Lambert K.N. & Lin Y. (2007). Developmental control of *Arabidopsis* seed oil biosynthesis. *Planta* **226**: 773-78.
- Wang J., Zhang L.D., Zuo K.J., Qian H.M., Cao Y.F. & Tang K.X. (2006). Cloning and expressional studies of the Voltage-dependent Anion Channel gene from *Brassica rapa* L. *J Integr Plant Biol* **48**: 197-203.
- Wang Y., Ma H., Liu G., Zhang D., Ban Q., Zhang G., Xu C. & Yang C. (2008). Generation and analysis of expressed sequence tags from a NaHCO₃-treated *Limonium bicolor* cDNA library. *Plant Physiology and Biochemistry* **46** : 977 – 986.

- Waters E.R., Lee G.J. & Vierling E. (1996). Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants. *Journal of Experimental Botany* **47**: 325-338.
- Watillon B., Kettmann R., Boxus P. & Burny A. (1997). Knotted1-like homeobox genes are expressed during apple tree (*Malus domestica* [L.] Borkh) growth and development. *Plant Molecular Biology* **33**: 757-763.
- Wehmeyer N., Hernandez L., Finkelstein R. & Vierling E. (1996). Synthesis of small heat-shock proteins is part of the developmental program of late seed maturation. *Plant Physiology* **112**: 757-757.
- Weijers D. & Jürgens G. (2005) Auxin and embryo axis formation: the ends in sight? *Current Opinion in Plant Biology* **8**: 32-37
- West M.A.L. & Harada J.J. (1993). Embryogenesis in higher plants: an overview. *Plant Cell* **5**: 1361-1369.
- West M.A.L., Yee K.M., Danao J., Zimmerman J.L., Fischer R.L., Goldberg R.B. & Harada J.J. (1994). Leafy cotyledon1 is an essential regulator of late embryogenesis and cotyledon identity in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **6**: 1731-1745.
- Western T.L. & Haughn G.W. (1999). BELL1 and AGAMOUS genes promote ovule identity in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **18**: 329-336.
- Wilcox J., Premachandra G., Yound K. & Raboy V. (2000). Isolation of high seed inorganic P, low-phytate soybean mutants. *Crop Sci* **40**: 1601-1605
- Wirtz K.W.A. (1991). Phospholipid transfer proteins. *Annual Review of Biochemistry* **60**: 73-99.
- Wortmann C.S., Kirkby R.A., Eledu C.A. & Allen D.J. (1998). Atlas of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Africa. CIAT, Cali, Colombia.
- Wu G., Robertson A.J., Liu X., Zheng P., Wilen R.W., Nesbitt N.T. & Gusta L.V. (2004). A lipid transfer protein gene BG-14 is differentially regulated by abiotic stress, ABA, anisomycin, and sphingosine in bromegrass (*Bromus inermis*). *Journal of Plant Physiology* **161**: 449-458.
- Wu J.Q. (1999). Mutant analysis of endosperm development in *Arabidopsis*. MSc Dissertation, Oklahoma State University, Stillwater, OK, USA, pp. 105.
- Yadegari R., de Paiva G.R., Laux T., Koltunow A.M., Apunya N., Zimmerman J.L., Fischer R.L., Harada J.J. & Goldberg R.B. (1994). Cell differentiation and morphogenesis are uncoupled in *Arabidopsis* raspberry embryos. *Plant Cell* **6**: 1713-1729.

- Yamada T., Moriyama R., Hattori K. & Ishimoto M. (2005). Isolation of two α -amylase inhibitor genes of tepary bean (*Phaseolus acutifolius* A.Gray) and their functional characterization in genetically engineered azuki bean. *Plant Sci* **169**: 502-511.
- Yang J.Y., Chung M.C., Tu C.Y. & Leu W.M. (2002). OSTF1: A HD-GL2 family homeobox gene is developmentally regulated during early embryogenesis in rice. *Plant and Cell Physiology* **43**: 628-638.
- Yang X., Makaroff C.A. & Ma H. (2003). The *Arabidopsis* MALE MEIOCYTE DEATH1 gene encodes a PHD-finger protein that is required for male meiosis. *Plant Cell* **15**: 1281-1295.
- Yeung E.C. & Clutter M.E. (1979). Embryogeny of *Phaseolus coccineus*: the ultrastructure and development of the suspensor. *Can. J. Bot.* **57**: 120-136.
- Yeung E.C. & Meinke D.W. (1993). Embryogenesis in angiosperms: development of the suspensor. *Plant Cell* **5**:1371–1381.
- Zarsky V., Garrido D., Eller N., Tupy J., Vicente O., Schöffl F. & Heberle-Bors E. (1995). The expression of a small heat shock gene is activated during induction of tobacco pollen embryogenesis by starvation. *Plant, Cell and Environment* **18**: 139-147
- Zhu B., Gu A., Deng X., Geng Y. & Lu Z. (1995). Effects of caffeine or EDTA post-treatment on EMS mutagenesis in soybean. *Mutation Res.* **334** (2): 157-159.

ANNEXES

1 Liste des séquences d'ADN complémentaires différemment exprimées dans des graines hybrides *P. coccineus* x *P. vulgaris* (NI16xNI637) en voie d'avortement par rapport à des graines issues de l'autofécondation du génotype maternel NI16 de *P. coccineus*

>SSH_PcPv1 = clones 1, 2, 5, 8, 10, 11, 12 et 13, 319 pb

5' **_ACGGGTCGTCGCGTGCCGGTCGGGGACGGATTGGGAACGGGCCCTTCGGGGCCTCTTC**
CCCGGGCGTTCGAACAGTCAACTCAGAACTGGTACGGACAAGGGGAATCCGACTGTTTAATTA
AAACAAAGCATTGCGATGGTCCCTGCGGATGTTGACGCAATGTGATTTCTGCCAGTGCTCT
GAATGTCAAAGTGAAGAAATTCAACCAAGCGCGGGTAAACGGCGGGAGTAACTATGACTCTC
TTAAGGTAGCCAAATGCCTCGTCATCTAATTAGTGACGCGCATGAATGGATTAACGAGATTC
CCACTGTCCCT**GT_3'**

>SSH_PcPv2 = clone3, 293 pb

5' **_ACGAATACGAACCGTGAAAGCGTGGCCTGTCGGGCCGTTAGGCCTTCGGAAGTTGAAGC**
TAGAGGTGTCAGAAAAGTTACTACAGGGATTACTGGCTTGTGGCAGCCAAGCGTTCATAACG
ACGTTGCTTTTTGATCCTTCGATGTCGGCTCTTCCTATCATTGTGAAGCAGAATTCACCAAG
TGTTGGATTGTTACCCACCAATAGGGAACGTGAGCTGGGTTTAGACCGTCGTGAGATAGGT
TAGTTTTACCCTACTGATGACAGTGTCGCAATAGCAATTC AACCTAG**T_3'**

>SSH_PcPv3 = clone4, 315 pb

5' **_ACGAATACAAACCGTGAAAGCGTGGCCTATCGATCCTTTACTCCTTCGGAATTTACACGC**
TAGAGGTGTCGGACCACTCACCACAGGGATAACTGGCTTGTGCGAGTCAAGCCTTCATAGCG
ACGTTCTTTCCCCCTTCGATGTCGGCTCTTCCTATCATTGTGAAGCAGAATTCACCAGG
TGTTGGATTGTTACACACAAAATAGGGAACGCTAGCTGGGGTTAAAATGTAGTGAGAAAAGT
TAATATTAATCTACATGATGAAAGTATAGCAATAATAATTA AAAATAGTACTTCGGCTGGGA
CCACGCTA

>SSH_PcPv4 = clone6, 234 pb

5' **_ACGAGAGGAACCGTTGATTCACACAATTGGTCATCGCGCTTGGTTGAAAAGCCAGTGCC**
GCGAAGCTACCGTGCGTTGGATTATGACTGAACGCCTCTAAGTCAGAATCCGGGCGAGAAGC
GATGCGTGCGCCCGCCTTTTGTGTTGCCGACCAGCAGTAGGGGCCTTGCCCCGCCAGAGGCAC
GTGCCGTTGGTGACCCTCGTAAGGTGAATGAACCTTGCGAGATGCCTTGAA

>SSH_PcPv5 = clone7, 111 bp

AGCCCGGGTAATCTTTGAAATTTTCATCGTGATTGGGGTAGATCATTGCAATTGTTGGTCTTC
AACGAGGAATTCCTAGTAAGCACGAATAATCAGCTCGCGTTGACTAC**GT**_3'

>SSH_PcPv6 = clone9, 193 bp

TAAATCCCTTAACGAGGATCCATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCA
GCTCCAATAGCGTATATTTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGACCTTGGGTTGG
GTCGATCGGCCCGCCTCTGGTGTGCACCGGTCGGGTCGCCCTTCTGCCGGCGATGCGCTCC
TGGCCTT

2 Liste des séquences d'ADN complémentaires différemment exprimées dans des graines en voie d'avortement issue de la plante de deuxième génération sélectionnée suite à la mutagenèse à l'EMS du génotype BAT93 de *Phaseolus vulgaris* par rapport au génotype non muté

>SSH_PvE1, 619 pb

CTGGAAATCAGAATCAAACGAGCTTTTACCCTTTTGTTCACACGAGATTTCTGTTCTCGTT
GAGCTCATCTTAGGACACCTGCGTTATCTTTTAACAGATGTGCCGCCCCAGCCAAACTCCCC
ACCTGACAATGTCTTCCGCCCCGATCGACCGGCCGAAGCCGACCTTGGGTCCAAAAAGAGGG
GCAGCGCCCCGCTTCCGATTCACGGAATAAGTAAAATAACGTTAAAAGTAGTGGTATTTTAC
TTTCGCTGTTTCCAGCTCCCACCTTATCCTACACCTCTCAAGTCATTTACAAAGTCGGACTA
GAGTCAAGCTCAACAGGGTCTTCTTTCCCGCTGATTCCGCCAAGCCCGTTCCCTTGGCTGT
GGTTTCGCTGGATAGTAGACAGGGACAGTGGGAATCTCGTTAATCCATTCATGCGCGTCACT
AATTAGATGACGAGGCATTTGGCTACCTTAAGAGAGTCATAGTTACTCCCGCCGTTTACCCG
CGCTTGGTTGAATTTCTTCACTTTGACATTCAGAGCACTGGGCAGAAATCACATTGCGTCAA
CATCCGCAGGGACCATCGCAATGCTTTGTTTTAATTAACAGTCGGATTCCCCTTGTCCGT_3'

>SSH_PvE2, 519 pb

5' **_AC**AGGAATATTCACCTGTTGTCCATCGACTACGCCTTTCGGCCTGATCTTAGGCCCTGA
CTCACCTCCGTGGACGAACCTTGCGGAGGAACCTTGGGTTTTTCGAGGCATTGGATTCTCA
CCAACGTTTTCGTTACTCAAGCCGACATTCTCGCTTCCGCTTCGTCCAGCACTGCTCGCGCG
GGTCCTTCCCTCTAAGGCGGAACGCTCCCCTACCGATTCAATTTGACATCCCACAGCTTCGG
CAGATCGCTTAGCCCCGTTTTCATCTTCGGCGCAAGAGCGCTCGATCAGTGAGCTATTACGCAC
TCTTCCAAGGGTGGCTGCTTCTAGGCAAACCTCCTGGTTGTCTCTGCACCCCTACCTCCTTT
ATCACTGAGCGGTCATTTAGGGGCCTTAGCTGGTGATCCGAGCTGTTTCCCTCTCGACGATG
AAGCTTATCCCCATCGTCTCACTGGCCGACCTTGACCCTTGTTATTTTGGAGGTCATATCTA
GTATTCAGAGTTTGCCTCGATTTGGT_3'

>SSH_PvE3, 489 pb

TGGTTGTTGGTCTTAATGACACCACGGAGAACCTCTTGGCTGCCCTGGACAGAAATGAGGCT
GAGATTTCTCCTTCCACCTTGTTTGCCATTGCTTGTGTTACGGAAAATGTTCCATTCATCAA
CGGAAGCCCTCAGAACACTTTTGTCCCAGGGTTGATTGATTTTGGCATCCAGAAAACTGTT

TGATTGGAGGAGATGACTTCAAGAGTGGTCAGACCAAATGAAATCCGTGCTGGTAGATTTTC
CTTGTGGGGGCTGGTATCAAGCCAACATCAATAGTTAGTTACAACCATCTTGAAACAATGA
TGGTATGAATCTCTCTGCTCCACAAACCTTCCGTTCCAAGGAAATCTCCAAGAGTAACGTTG
TTGATGATATGGTCAACAGCAATGCCATCCTCTATGAGCCTGGTGAACATCCCGACCATGTT
GTTGTTATTAAGTATGTGCCTTACGTTGCGGACAGCAAGAGAGCCATGGATGAGT_3'

>SSH_PvE4, 385 pb

5' **_AC**CTTTGATCCGTTGAGCGAGAGCCCTTCCACACGGGACTCCCGGATCACTATGGCCGA
CTTTCGTCTCTGTTTCGACCAGTCGGTCTCACAGTCAGGCAGGCTTATAACCATTACGCTCACG
AGCAGAATCTTAGCTTGAGCCTACCTTCGCACACCTCCGTTACTCTTTAGGAGGCATCCGCC
CCAGATAAACTGCCACCTCGCAGTGTCCCGCCCCCCCCGAATCTTCGGTGCGGCGGTTAG
GCATCCTTAGACGAAAGAGTGGTCTTTCAGGATTGGTCGTTCTGTGTCATCACCTCCACCT
ATCCTACACATTCGATCAAGGTTGTCACTGCGAACTATAGTTAAGGTGCACGGGGCCTTACC
GTCTAGCCGTTGGTAC

>SSH_PvE5, 382 pb

CATCAAAGGATCACTGTGACAAGGATTGCTATTTCCATCTGAGAACAATTTGAAATTGACAG
CTTATTGCGACTCAGACTAGGGAGGTTGTCAGACAACCTCGGAGATCGATATCTGGTATTGTA
TTTTTCTTGGTTCCTCTATTATCTCATGAAAATTAATAAATAATCAGATAAACGTATCAAGAT
CATCTGCAGAAGCAGAATACTGCGCGATGGACAATACTTGTTTGAAGATAGTTTGGTTGCGA
TATTTGTTGCAGGATTTAAAGCGACATTACATATAGCAGCAAACCAGTATTTTCATGAACGCA
CAAAACACATTGAGATAGACTGCCACATTGTGTGAGAAAAATTACAAGTGGGATAATCAGTC
CTTTATAT**GT**_3'

>SSH_PvE6, 315 pb

5' **_AC**ATTGAGACCATCAAAGAAGCTGTGGAAAGGGAGTGCCAGGAGTTGTTTCCTGTGCT
GATATACTCGTTCTCTCTGCCAGAGATGGCATTGTTTCGCTAGGAGGCCCCCATATCCCTCT
TAAACTGGAAGAAGGGATGGTAGAAGGAGCAGAGCTGATGTGGTGGAAAGAGTTCCCTCCAG
ACCACAATGAGTCCATTTCTTCAGTTCTTGACAAGTTTGGTGCCATGGGAATTGACACTCCC
GGGGTGGTTGCATTGCTTGGAGCACGCAGTGTGGTAGAACCCATTGTGTGAAGTTGGTGCA
CCGTTT**GT**_3'

>SSH_PvE7, 295 pb

5' **_ACACAGCATGCTCTGGACCCGTTAACGCACTTGAAAGCTCGGGTGAACAATTATGGTTT**
GGCTAGTGCTCTGATTCAGCATGACTGGAATCCAAGAACTCGTTTCTCTCTTGTGGGGGAGG
TGGATACTGGGGCCATCGGAAAGAGTGCAAAGGTTGGTCTCGCTGTCGCCTTGAACCTTAGG
TATAGGCTTCTTGTGTTGTGGAGATAATAAGTTATTGTAGGGTTTCGCCTTCCCAATGAACCTT
TGGTCCTTCATTTTGGAGCTATATCAATCTCTTGATATATTGGTGGGT**GT_3'**

>SSH_PvE8, 292 pb

5' **_ACGAATACGAACCGTGAAAGCGTGGCCTATCGATCCTTTAGTCCTTCGGAATTTGAAGC**
TAGAGGTGTCAGAAAAGTTACCACAGGGATAACTGGCTTGTGGCAGCCAAGCGTTCATAGCG
ACGTTGCTTTTTTGATCCTTCGATGTCGGCTCTTCCTATCATTTGTGAAGCAGAATTCACCAAG
TGTTGGATTGTTACCCACCAATAGGGAACGTGAGCTGGGTTTAGACCGTCGTGAGACAGGT
TAGTTTTACCCTACTGATGACAGTGTGCAATAGTAATTCAACCTAG

>SSH_PvE9, 285 pb

5' **_ACCGTGTGATCAGTGACACCAGGGGAGCCTTTGTGCAGCCTGCAGTGTATGAGGCATTT**
GGTTTGACAGTGGTTGAAGCCATGACTTGTGGGTTGCCAACATTTGCCACATGCAATGGTGG
TCCTGCTGAGATCATTGTTTCATGGAAAATCTGGCTTCCACATTGATCCCTACCATGGTGACC
GTGCTGCTGACCTCCTTGTGAGTTCTTTGAGAAGTGCAAGGTTGAGCCATCTCACTGGGAC
ACCATCTCTCAAGCTGGTCTCCAACGTATTGGAGAGAAG**GT_3'**

>SSH_PvE10, 210 pb

ATCAGACTCTATACATCGTGTTACCACTTAGCAGAGTCCTGTGTTTTTAATAAACAGTCGCT
ACCCCCTGGTATGTGCCGCTTTCCTAATCAAAAGATAGGAGAGCACCCCTTCTCCGAAGTT
ACGGGGTCATTTTGCCGAGTTCCTTCGACATGGTTCTCTCAAGCGCCCTAGTATACTCTACT
TGTTAACCTGTGTCGGTTTGGG**GT_3'**

3 Liste des séquences nucléotidiques obtenues pendant cette thèse et soumises à la banque de gènes du NCBI

>EF672105, *Phaseolus vulgaris* voltage-dependent anion channel mRNA, partial cds, 296 bp (SSH_Pv_E7)

```
ACACAGCATGCTCTGGACCCGTTAACGCACTTGAAAGCTCGGGTGAACAATTATGGTTTGGC
TAGTGCTCTGATTCAGCATGACTGGAATCCAAGAAGCTCGTTTCTCTCTTGTGGGGGAGGTGG
ATACTGGGGCCATCGGAAAGAGTGCAAAGGTTGGTCTCGCTGTCGCCTTGAAGCCTTAGGTA
TAGGCTTCTTGTGTGGAGATAATAAGTTATTGTAGGGTTTCGCCTTCCCAATGAACCTTTG
GTCCTTCATTTTGGAGCTATATCAATCTCTTGATATATTGGTGGGTGT
```

>EF660341, *Phaseolus vulgaris* cationic peroxidase mRNA, partial cds, 315 bp (SSH_Pv_E6)

```
ACATTGAGACCATCAAAGAAGCTGTGGAAAGGGAGTGCCCAGGAGTTGTTTCCTGTGCTGAT
ATACTCGTTCTCTCTGCCAGAGATGGCATTGTTTCGCTAGGAGGCCCCCATATCCCTCTTAA
AACTGGAAGAAGGGATGGTAGAAGGAGCAGAGCTGATGTGGTGAAGAGTTCCTCCCAGACC
ACAATGAGTCCATTTCTTCAGTTCTTGACAAGTTTGGTGCCATGGGAATTGACACTCCCGGG
GTGGTTGCATTGCTTGGAGCACGCAGTGTGGTAGAACCATTGTGTGAAGTTGGTGCACCG
TTTGT
```

>EF660340, *Phaseolus vulgaris* elongation factor 1-alpha (EF1-a) mRNA, partial cds, 606 bp

```
GGCTTCTTCAGGATGTGTACAAGATTGGTGGTATTGGTACCGTGCCAGTGGGACGTGTTGAA
ACCGGTGTCATCAAGCCGGGTATGCTGGTGACTTTTGCTCCACAGGTTTGACAAGTGAAGT
TAAGTCTGTTGAGATGCACCACGAGGCTCTCCTAGAGGCTCTTCCAGGTGACAATGTCCGGCT
TCAACGTGAAGAACGTTGCTGTCAAGGATCTCAAGCGTGGTTTCGTTGCTTCCAAGTCCAAG
GATGACCCTGCCAAGGAAGCTGCCAAGTTCACATCCCAAGTCATCATCATGAATCACCTGG
CCAGATCGGAAATGGCTATGCACCAGTGCTTGATTGCCACACCTCCACATTGCAGTCAAGT
TCGCCGAAGTTCGTGACCAAGATCGACAGGCGATCAGGTAAGGAGATCGAGAAGGAGCCCAA
TTTTTGAAGAATGGTGTGATGCAGGTTATGTTAAGATGATTCCAACCAAGCCCATGGTTGTTGA
AACCTTCTCTGAGTATCCTCCCCTTGGCCGTTTTGCCGTGAGGGACATGCGTCAGACCGTGG
CTGTCCGAGTCATCAAGAGTGTGAGAAGAAAGACCCACTGGTGCAAG
```