

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

Souleymane SILUÉ

Introduction: importance des légumineuses

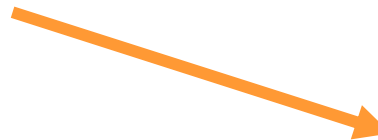
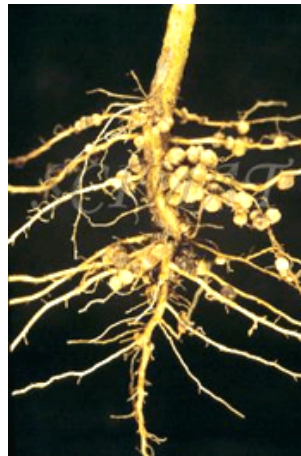


Environ 25% de protéine
dans les graines

Excellent complément
alimentaire



Bactéries *Rhizobium*



Nutrition de la plante

Fertilisation du sol

Introduction: le haricot commun (*Phaseolus vulgaris* L.)



Plus importante espèce du genre *Phaseolus*
> 90% de la production mondiale de haricot



L'antracnose
(*Colletotrichum lindemuthianum*)



Le charançon du haricot
(*Apion godmani* Wagner)

+ Manque de variétés résistantes



La sécheresse

Rendements

0,59 t/ha en Afrique

< 1,63 t/ha dans les pays développés

Introduction: amélioration du haricot commun

Hybridations interspécifiques

Transfert de nouveaux gènes d'une espèce à une autre

P. coccineus et *P. polyanthus*

P. vulgaris (♀) x (*P. coccineus* ou *P. polyanthus*) (♂)

30 à 70% de réussite

Retour vers les formes parentales

(*P. coccineus* ou *P. polyanthus*) (♀) x *P. vulgaris* (♂)

Meilleure transmission des caractères

60% d'avortement précoce des embryons hybrides

Régénération de plantes hybrides

Culture d'embryons immatures âgés de 7 à 33 jours

Introduction: amélioration du haricot commun

Causes des avortements des embryons hybrides

Alimentation anormale de l'embryon

- Mauvais fonctionnement des tissus maternels
- Malformation du suspenseur

Dysfonctionnement de gènes indispensables à l'embryon

Objectifs de l'étude

Isoler et caractériser des transcrits différemment exprimés chez les embryons en voie d'avortement afin de mettre en évidence des gènes impliqués dans le déroulement normal de l'embryogenèse

- 1- Caractériser des embryons de *Phaseolus* en cours d'avortement
- 2- Identifier des ADNc différemment exprimés chez ces embryons en cours de dégénérescence

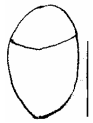
Deux types de matériels ont été utilisés

- 1- Les embryons en voie d'avortement issus des hybridations interspécifiques
- 2- Les embryons en voie d'avortement issus de la mutagenèse chimique à l'EMS (Éthyle Méthyle Sulfonate)

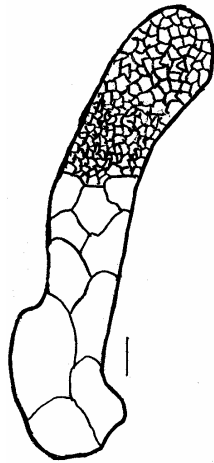
Développement embryonnaire chez *P. vulgaris* BAT93

Représentation schématique du développement embryonnaire de BAT93

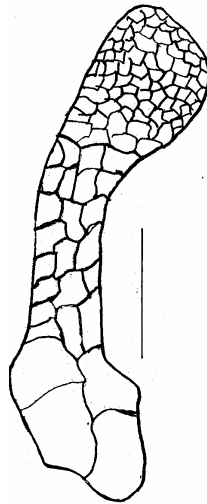
Barres d'échelle: 0 & 3 JAA = 100 μ m; 5 & 8 JAA = 500 μ m; 12 JAA = 1000 μ m



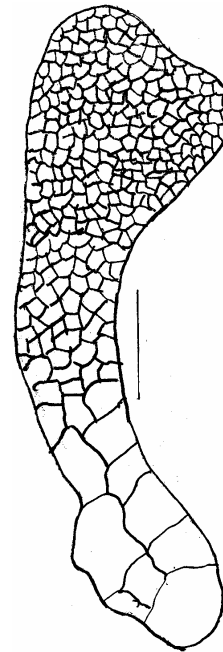
Après la 1^{ère}
division



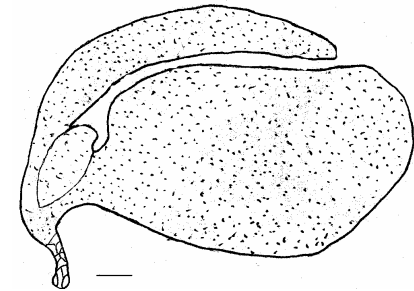
Embryon
à 3 jours



Embryon
à 5 jours



Embryon
à 8 jours



Embryon
à 12 jours

1: Caractérisation des embryons *Phaseolus* en cours d'avortement

1-1 Hybridations interspécifiques

Identifier des génotypes compatibles

<i>Phaseolus vulgaris</i> (♂):	NI637	cultivé	Brésil
	BAT93	cultivé	Colombie
	G21245	sauvage	Pérou
	NI622	sauvage	Pérou
<i>Phaseolus coccineus</i> (♀):	NI16	cultivé	Rwanda
	NI889	sauvage	Mexique
	NI1111	sauvage	Guatemala
<i>Phaseolus polyanthus</i> (♀):	G35348	cultivé	Mexique
	NI1015	cultivé	Guatemala
	NI1123	sauvage	Guatemala

Conditions de culture:

Cellules: 24/20°C, 75% d'humidité, 12h de photopériode

Serres: Septembre-Avril, 21/16,5°C, 80% d'humidité

1: Caractérisation des embryons *Phaseolus* en cours d'avortement

1-1 Hybridations interspécifiques

Pollinisations

Castration des fleurs femelles un jour avant l'ouverture

Hybridation le même jour ou le lendemain

Caractérisation

Suivi de la croissance des gousses avant et après 8 jours

Embryons en cours d'avortement

Plantes issues des hybridations

1: Caractérisation des embryons *Phaseolus* en cours d'avortement

1-1 Hybridations interspécifiques

Résultats des croisements *P. coccineus* (♀) x *P. vulgaris* (♂)

Croisements interspécifiques	Nombre d'hybridations	Gousses avortées après pollinisation				Gousses mûres	
		À 8 jours		Après 8 jours		Nombre	Pourcentage
		Nombre	Pourcentage	Nombre	Pourcentage		
PC (♀) x PV							
NI889 x NI637	58	48	82,76	8	13,79	2	3,45
NI889 x BAT93	24	24	100,00	0	0,00	0	0,00
NI889 x G21245	74	59	79,73	12	16,22	1 + 2	4,05
Sous total	156	131	83,97	20	12,82	5	3,21
NI16 x NI637	464	410	88,36	51	10,99	3	0,65
NI16 x BAT93	113	100	88,50	13	11,50	0	0,00
NI16 x G21245	142	118	83,10	24	16,90	0	0,00
NI16 x NI622	10	10	100,00	0	0,00	0	0,00
Sous total	729	638	87,52	88	12,07	3	0,41
NI1111 x NI637	15	14	93,33	1	6,67	0	0,00
NI1111 x G21245	20	17	85,00	2	10,00	1	5,00
NI1111 x NI622	18	14	77,78	4	22,22	0	0,00
Sous total	53	45	84,91	7	13,21	1	1,89
Total	938	814	86,78	115	12,26	9	0,96

1: Caractérisation des embryons *Phaseolus* en cours d'avortement

1-1 Hybridations interspécifiques

Résultats des croisements *P. polyanthus* x *P. vulgaris*

Croisements interspécifiques	Nombre d'hybridations	Gousses avortées après pollinisation				Gousses mûres	
		À 8 jours		Après 8 jours		Nombre	Pourcentage
PP (♀) x PV		Nombre	Pourcentage	Nombre	Pourcentage		
G35348 x NI637	240	200	83,33	40	16,67	0	0,00
G35348 x G21245	177	146	82,49	30	16,95	1	0,56
G35348 x NI622	20	13	65,00	7	35,00	0	0,00
Sous total	437	359	82,15	77	17,62	1	0,23
NI1015 x NI637	159	123	77,36	36	22,64	0	0,00
NI1015 x G21245	50	37	74,00	13	26,00	0	0,00
Sous total	209	160	76,56	49	23,44	0	0,00
NI1123 x NI637	37	33	89,19	4	10,81	0	0,00
NI1123 x BAT93	15	15	100,00	0	0,00	0	0,00
NI1123 x G21245	25	22	88,00	3	12,00	0	0,00
NI1123 x NI622	10	8	80,00	2	20,00	0	0,00
Sous total	87	78	89,66	9	10,34	0	0,00
Total	733	597	81,45	135	18,42	1	0,14

1: Caractérisation des embryons *Phaseolus* en cours d'avortement

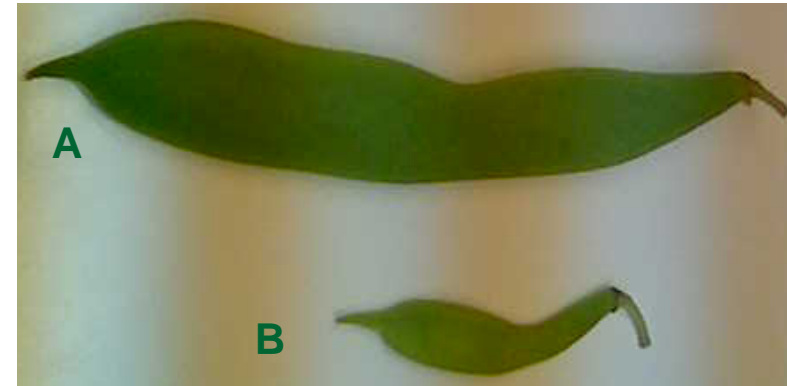
1-1 Hybridations interspécifiques

Caractérisation des embryons en cours d'avortement

Génotypes choisis

NI16 de *P. coccineus*

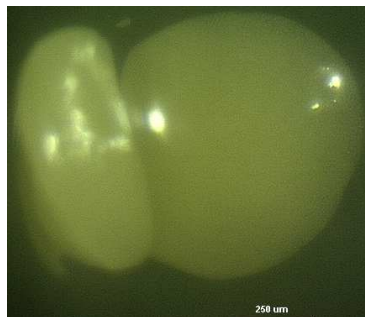
NI637 & BAT93 de *P. vulgaris*



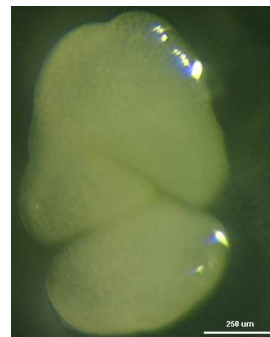
Gousses âgées de 20 jours

A: NI16

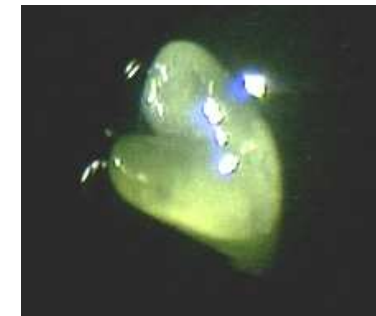
B: NI16xNI637



Embryon de NI16 âgé de 20 jours
issu d'une autofécondation



Embryons de NI16 âgés de 20 jours
issus de l'hybridation avec NI637



Embryon de NI16 âgé de 20 jours
issu de l'hybridation avec BAT93

1: Caractérisation des embryons *Phaseolus* en cours d'avortement

1-1 Hybridations interspécifiques

Caractérisation phénotypique des hybrides issus des croisements *P. coccineus* (♀) x *P. vulgaris* (♂)

NI889 x G21245:

2 graines hybrides

NI1111 x G21245:

1 graine hybride qui n'a pas germé



Graines et fleur du génotype maternel NI889 de *P.c.*



Fleur et graines du génotype mâle G21245 de *P.v.*



Fleur et graines de l'hybride F1 NI889 x G21245

1: Caractérisation des embryons *Phaseolus* en cours d'avortement

1-1 Hybridations interspécifiques

Caractérisation phénotypique des hybrides issus des croisements *P. polyanthus* (♀) x *P. vulgaris* (♂)

G35348 x G21245:

3 graines hybrides



Graines et fleurs du génotype maternel G35348 de *P.p.*



Fleur et graines du génotype mâle G21245 de *P.v.*



Fleur et graines de l'hybride F1 NI889 x G21245

1: Caractérisation des embryons *Phaseolus* en cours d'avortement

1-1 Hybridations interspécifiques

Caractérisation moléculaire des hybrides issus des croisements

Marqueur microsatellite BM160

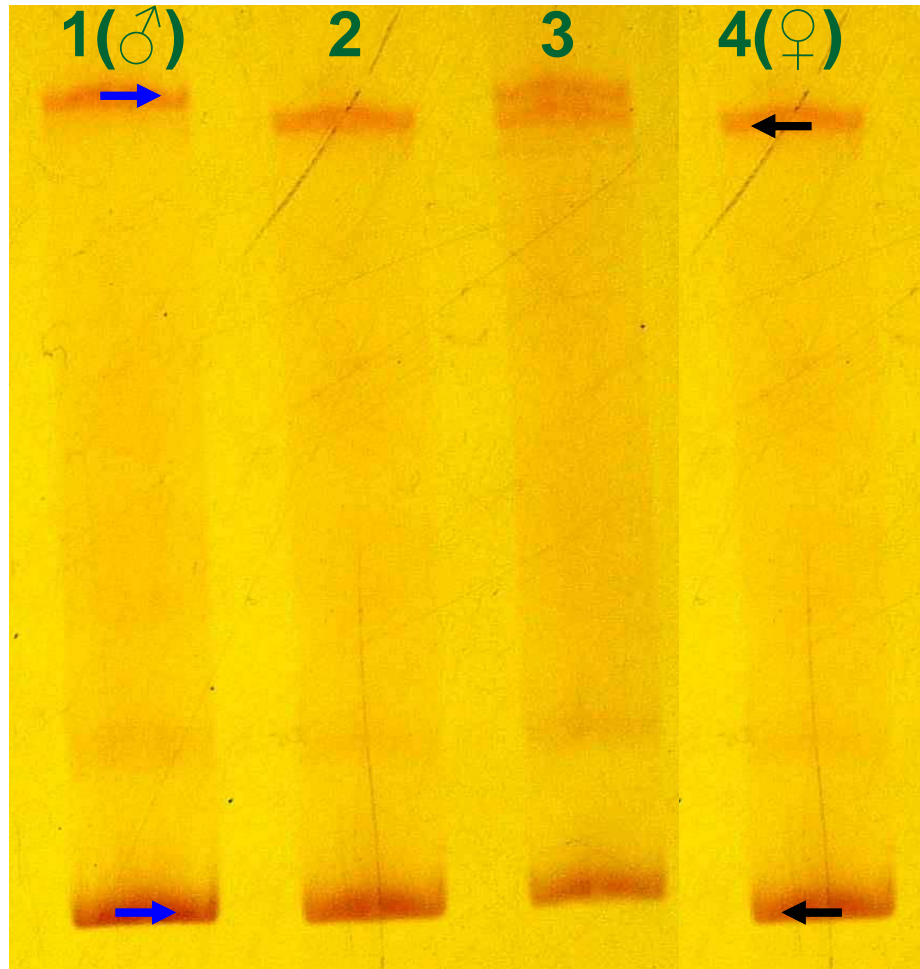
PCR sur l'ADN des plantes hybrides et ceux des plantes parentales

La révélation des fragments amplifiés sur un gel de polyacrylamide

1: Caractérisation des embryons *Phaseolus* en cours d'avortement

1-1 Hybridations interspécifiques

Caractérisation moléculaire des hybrides issus des croisements *P. coccineus* (♀) x *P. vulgaris* (♂)



Gel de polyacrylamide de séparation des fragments amplifiés par l'amorce BM160 sur l'ADN extrait des plantes

1 : plante de *P. vulgaris* G21245

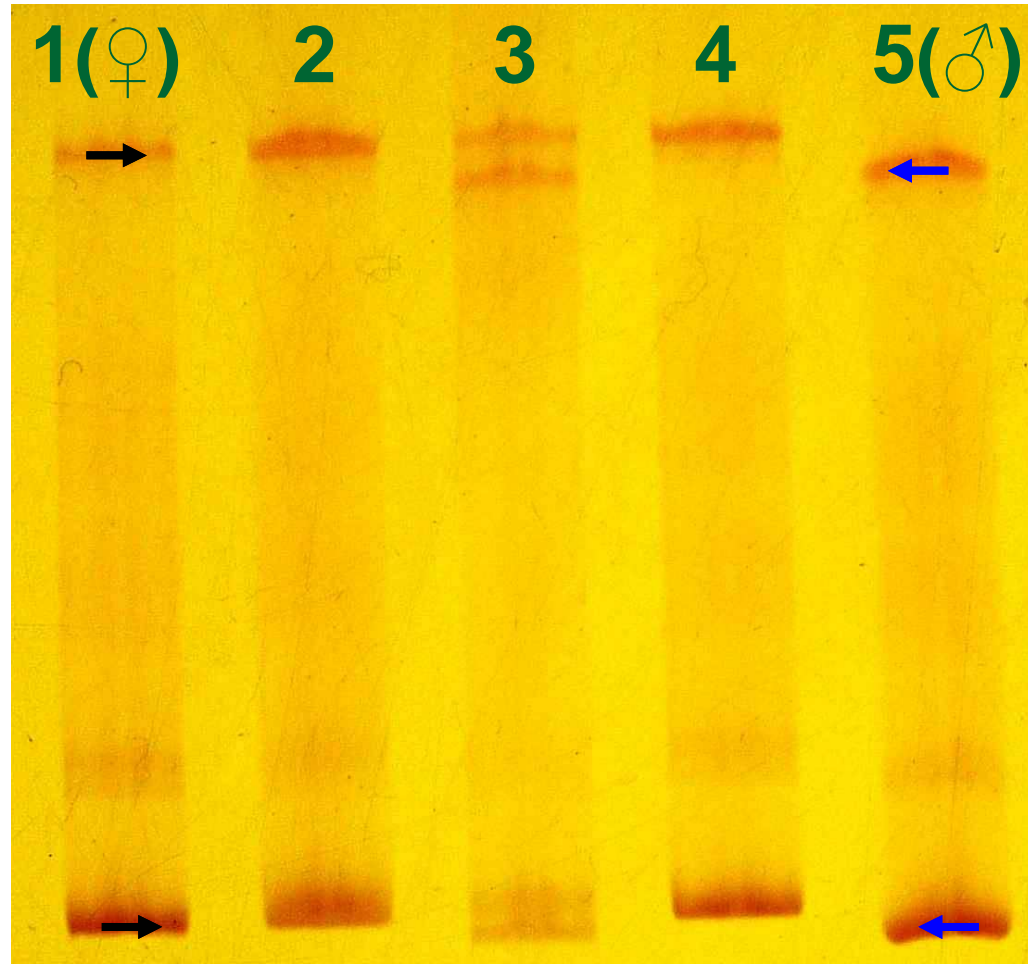
2, 3: plantes hybrides NI889 x G21245

4 : plante de *P. coccineus* NI889

1: Caractérisation des embryons *Phaseolus* en cours d'avortement

1-1 Hybridations interspécifiques

Caractérisation moléculaire des hybrides issus des croisements *P. polyanthus* (♀) x *P. vulgaris* (♂)



Gel de polyacrylamide de séparation des fragments amplifiés par l'amorce BM160 sur l'ADN extrait des plantes

1 : plante de *P. polyanthus* G35348

2, 3, 4 plantes hybrides G35348 x G21245

5 : plante de *P. vulgaris* G21245

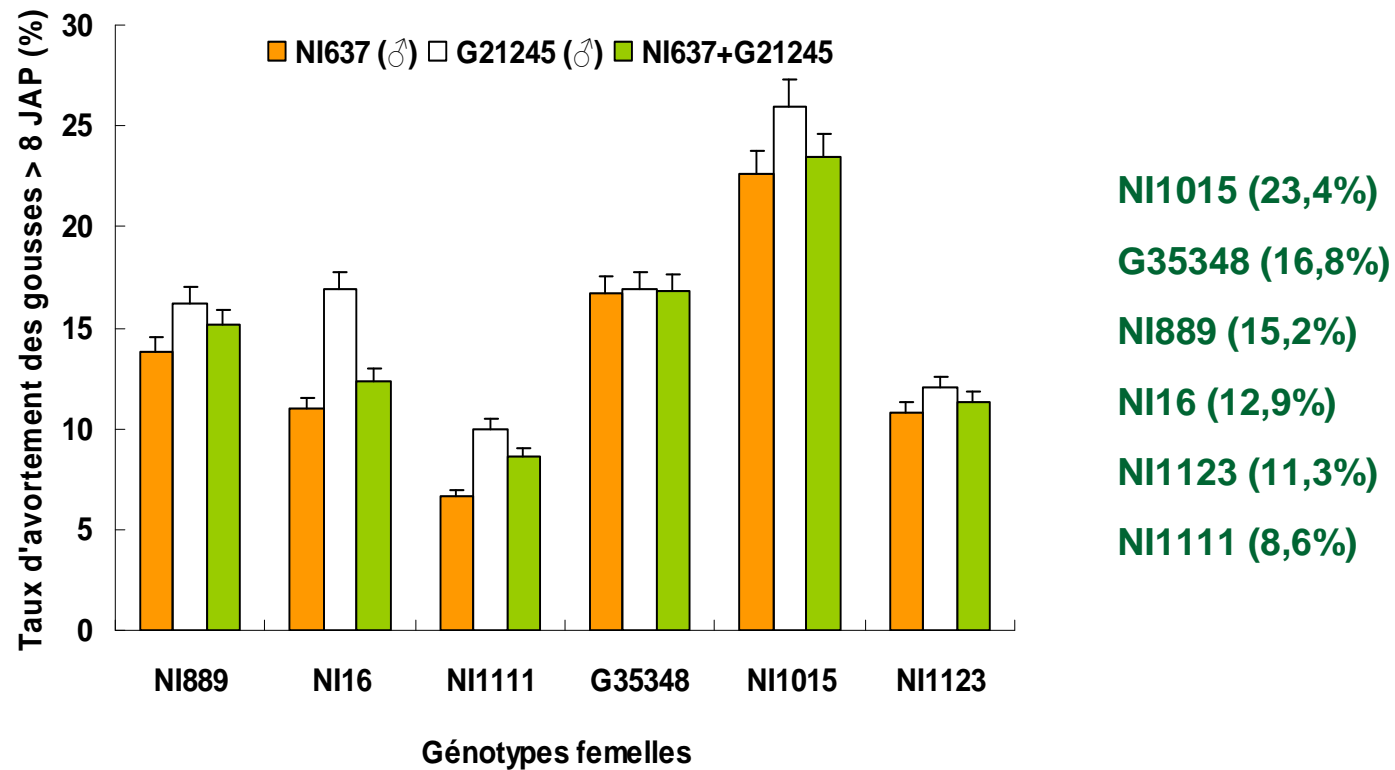
1: Caractérisation des embryons *Phaseolus* en cours d'avortement

1-1 Hybridations interspécifiques

Pourcentage d'avortement des gousses au-delà de 8 jours dans les croisements

Génotypes femelles

Génotypes mâles NI637 et G21245



1: Caractérisation des embryons *Phaseolus* en cours d'avortement

1-1 Hybridations interspécifiques

Conclusions partielles

Génotypes compatibles

<i>P. vulgaris</i> :	G21245, NI637
<i>P. coccineus</i> :	NI889, NI16
<i>P. polyanthus</i> :	G35348, NI1015

Embryons en cours d'avortement

Cotylédons malformés

Retard de croissance des embryons

Hybrides interspécifiques

NI889 x G21245

G35348 x G21245



~ 15% de rétention de gousses après 8 jours

Mélange de graines hybrides et de graines autofécondées

Utilisation de la mutagenèse induite dans l'étude de l'embryogenèse

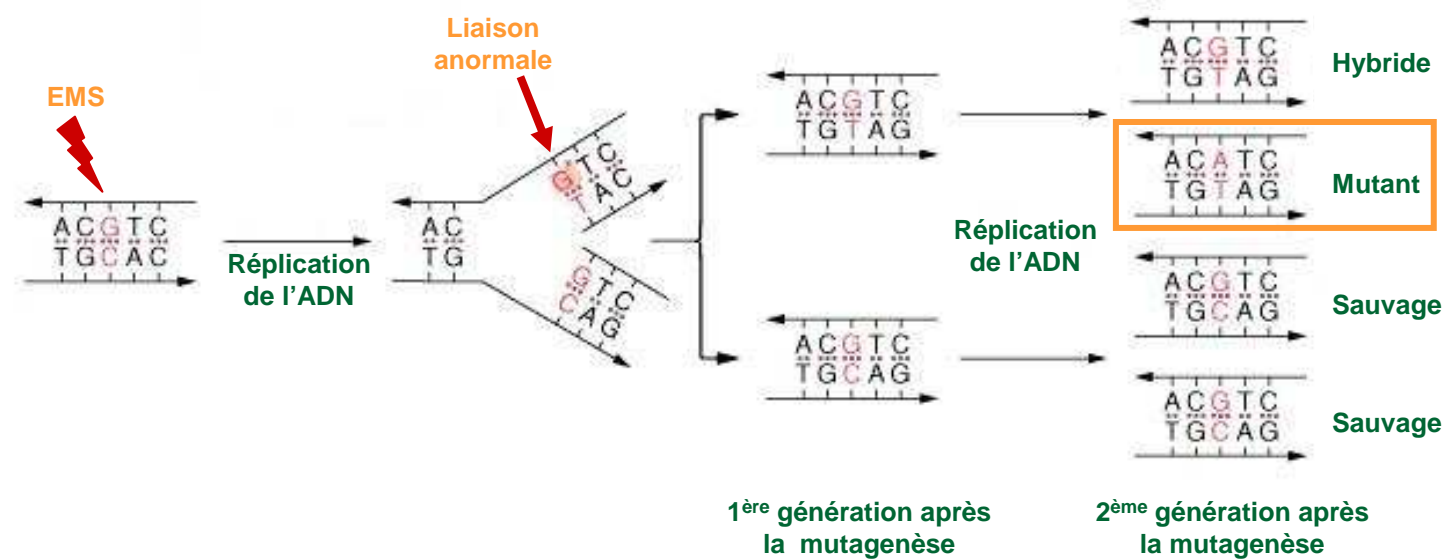
1: Caractérisation des embryons *Phaseolus* en cours d'avortement

1-2 Mutagenèse chimique

EMS (Éthyle Méthyle Sulfonate)

Induction des mutations ponctuelles dans l'ADN

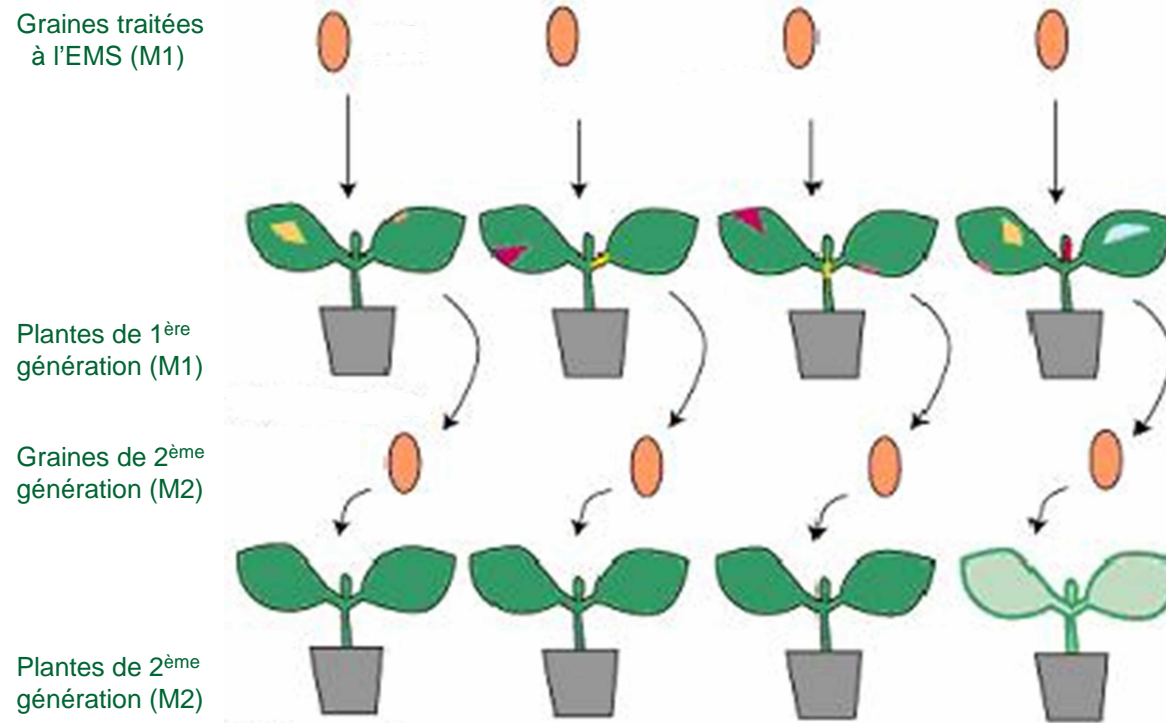
Favorise les transitions de type G/C → A/T



Action de l'EMS sur l'ADN

1: Caractérisation des embryons *Phaseolus* en cours d'avortement

1-2 Mutagenèse chimique



Principe de la mutagenèse à l'EMS

1: Caractérisation des embryons *Phaseolus* en cours d'avortement

1-2 Mutagenèse chimique

Traitement des graines

Université de Genève (Unité du professeur BROUGHTON)

Génotype BAT93 de *P. vulgaris*

30mM d'EMS sur 200 graines

Conditions de culture:

Cellules: 24/20°C, 75% d'humidité, 12h de photopériode

Caractérisation

Criblage de la 2ème génération de plantes

Recherche de plantes ne produisant pas de graines matures

Comparaison du développement embryonnaire

Déterminisme génétique du caractère avortement des graines

1: Caractérisation des embryons *Phaseolus* en cours d'avortement

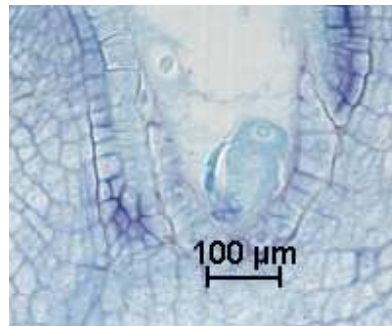
1-2 Mutagenèse chimique

Criblage de 365 plantes de 2ème génération (M2)

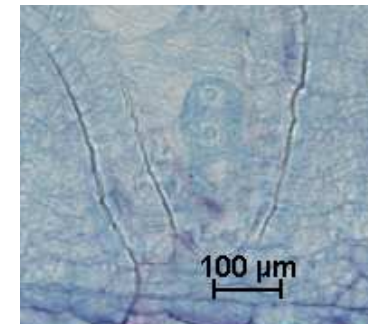
2 plantes présentaient le caractère recherché

Embryons après
la 1^{ère} division

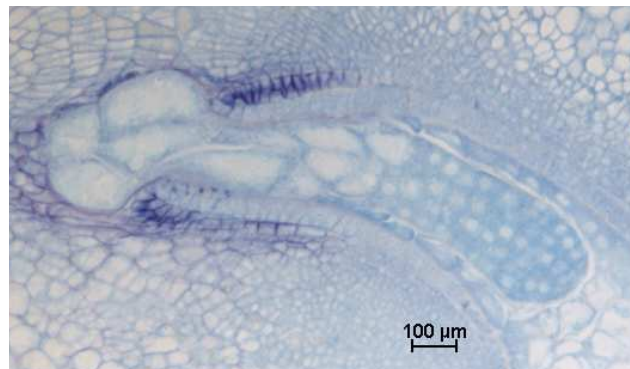
Embryons normaux



Embryons anormaux



Embryons âgés de 3 jours



1: Caractérisation des embryons *Phaseolus* en cours d'avortement

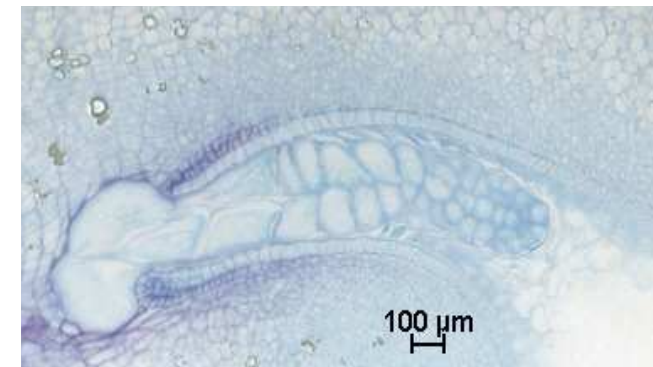
1-2 Mutagenèse chimique

Embryons âgés de 5 jours

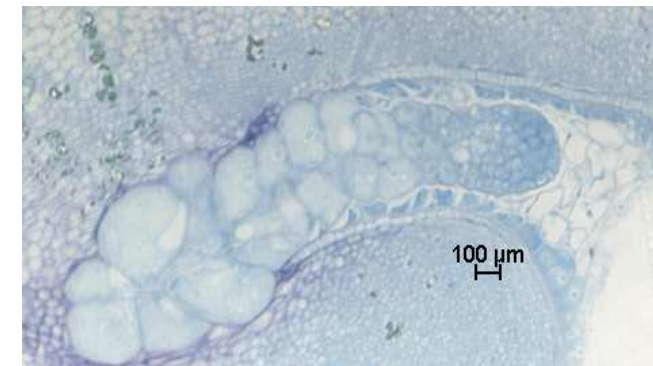
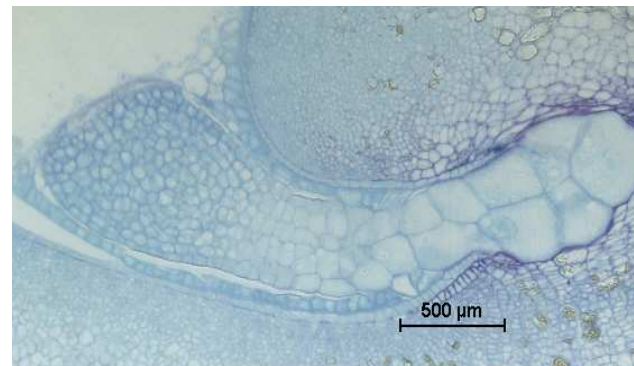
Embryons normaux



Embryons anormaux



Embryons âgés de 7 jours

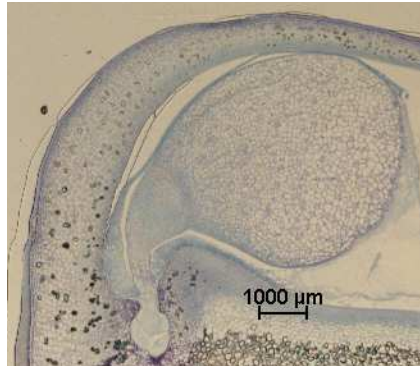


1: Caractérisation des embryons *Phaseolus* en cours d'avortement

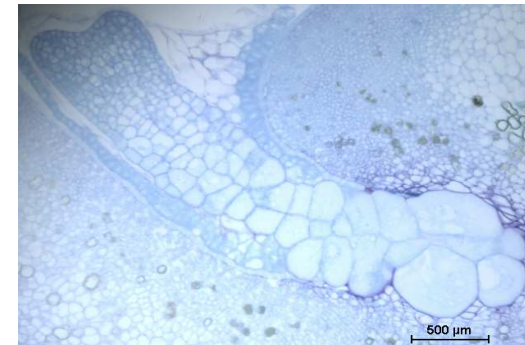
1-2 Mutagenèse chimique

Embryons âgés de 10 jours

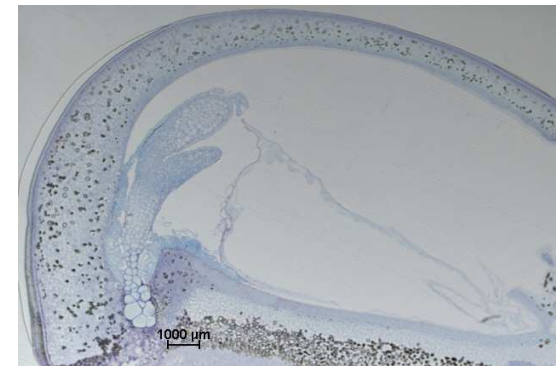
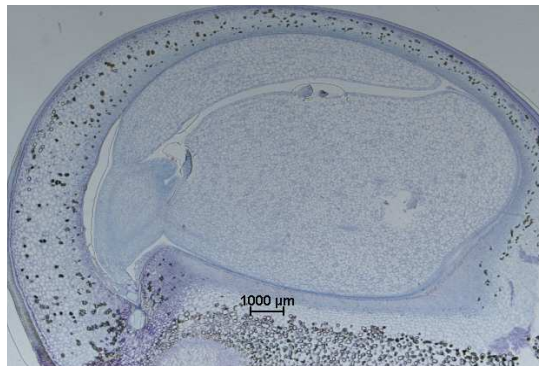
Embryons normaux



Embryons anormaux



Embryons âgés de 12 jours

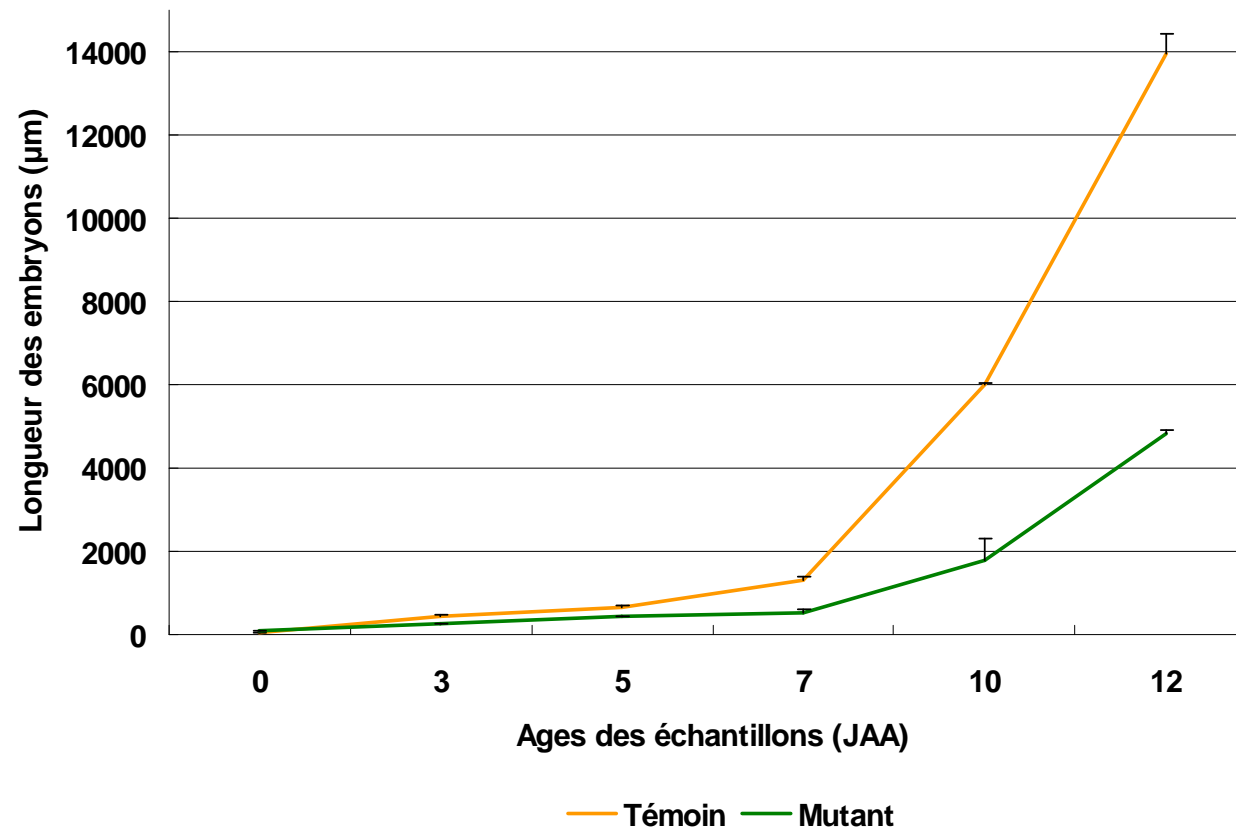


Comparaison de l'évolution du suspenseur et de l'embryon au cours du développement

1: Caractérisation des embryons *Phaseolus* en cours d'avortement

1-2 Mutagenèse chimique

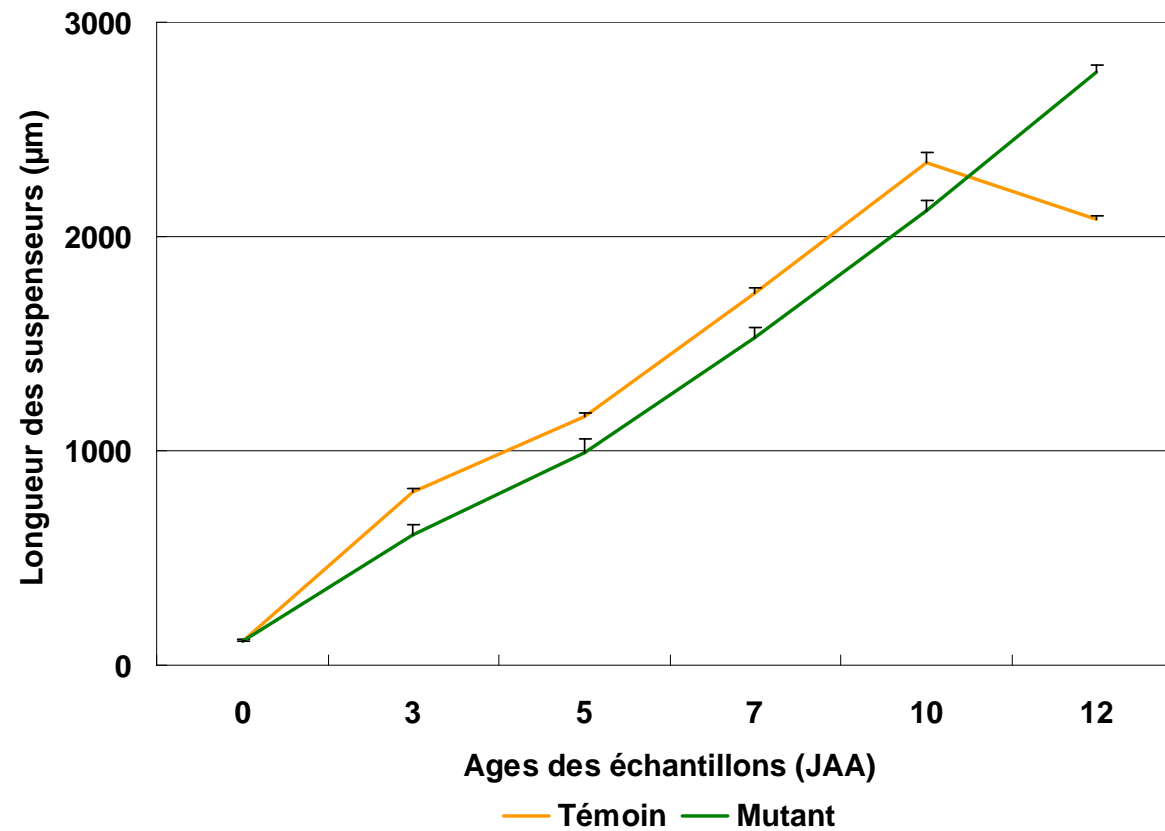
Évolution de la longueur des embryons au cours de la croissance de la graine



1: Caractérisation des embryons *Phaseolus* en cours d'avortement

1-2 Mutagenèse chimique

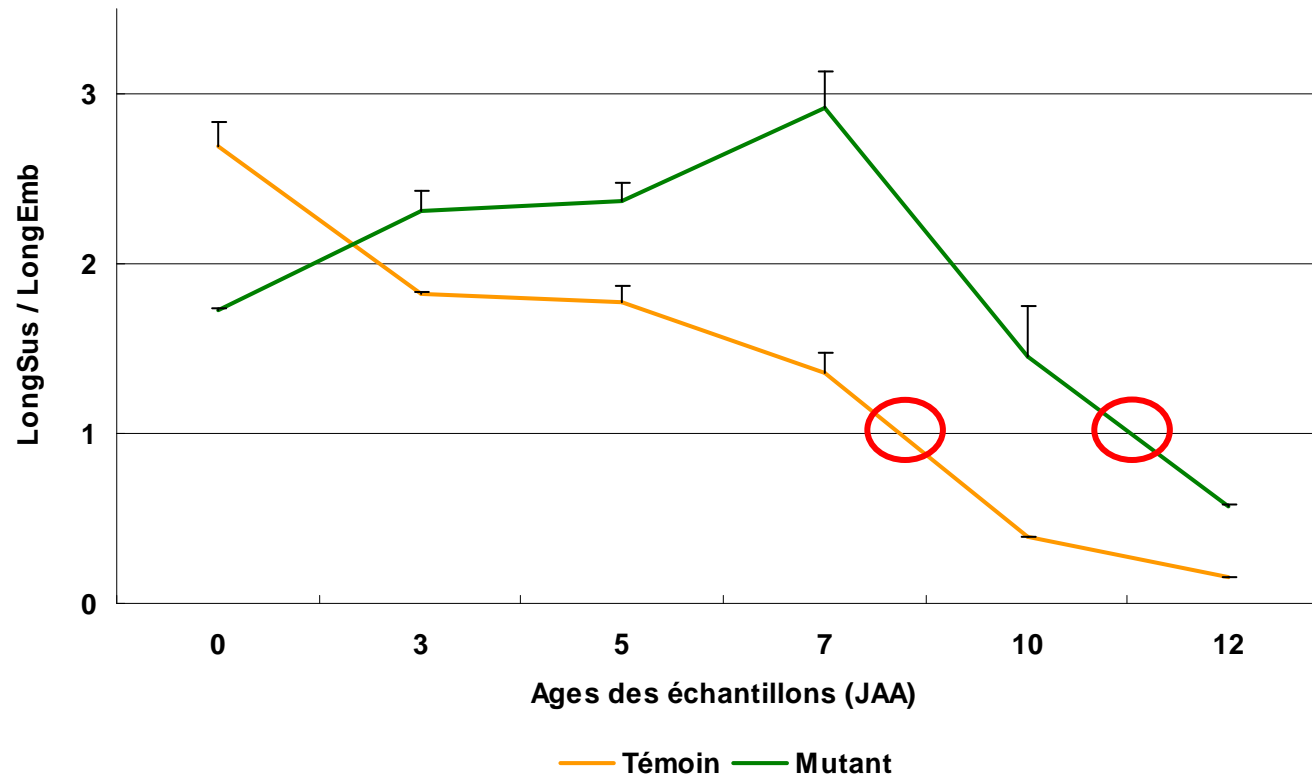
Évolution de la longueur des suspenseurs au cours de la croissance de la graine



1: Caractérisation des embryons *Phaseolus* en cours d'avortement

1-2 Mutagenèse chimique

Évolution du rapport longueur du suspenseur / longueur de l'embryon



1: Caractérisation des embryons *Phaseolus* en cours d'avortement

1-2 Mutagenèse chimique

Déterminisme génétique du caractère avortement

Croisements entre les plantes témoins et les plantes d'intérêt

L'analyse de la F1 montre que la transmission de ce caractère est maternelle

Sur un total de 96 plantes F2

73 plantes à phénotype normal

23 plantes à phénotype anormal

Proportion mendélienne 3:1

Le caractère serait récessif et gouverné par un couple d'allèles

1: Caractérisation des embryons *Phaseolus* en cours d'avortement

1-2 Mutagenèse chimique

Conclusions partielles

Identification de plantes qui produisent des graines qui n'arrivent pas à maturité

Des embryons en cours d'avortement avec des suspenseurs et des cotylédons anormaux

Caractère à hérédité maternelle et gouverné par un couple d'allèles récessifs

La mutagenèse chimique est donc un bon outil pour l'étude de l'embryogenèse

2- Identification des ADNc différemment exprimés chez les embryons en cours de dégénérescence

2- Identification des ADNc différemment exprimés chez les embryons en cours de dégénérescence

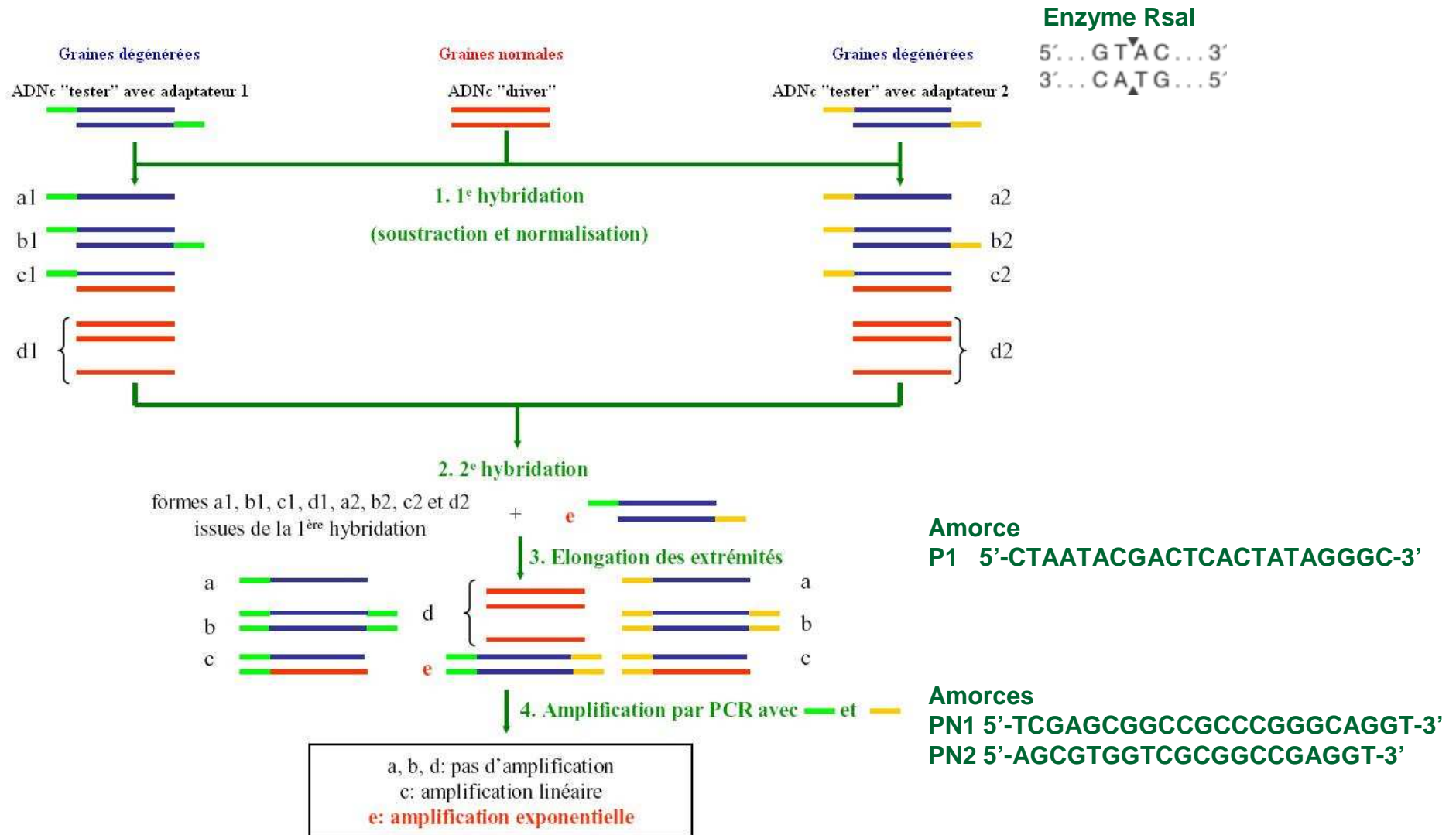
SSH (Hybridation Soustractive Suppressive)

Déterminer les ADNc propres à l'échantillon d'intérêt en éliminant les ADNc qu'il a en commun avec l'échantillon témoin

Tester: échantillon d'intérêt, graines en voie d'avortement

Driver: échantillon témoin, graines normales

2- Identification des ADNc différemment exprimés chez les embryons en cours de dégénérescence



Principe de l'Hybridation Soustractive Suppressive

2- Identification des ADNc différemment exprimés chez les embryons en cours de dégénérescence

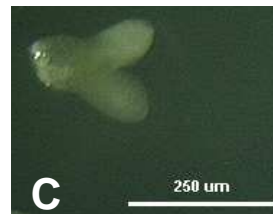
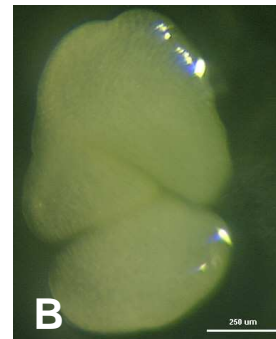
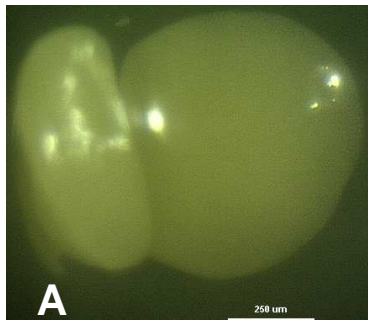
2-1 Hybridations interspécifiques

Génotypes choisis

NI16 de *P. coccineus* & NI637 de *P. vulgaris*

Tester: graines hybrides NI16xNI637 en cours d'avortement

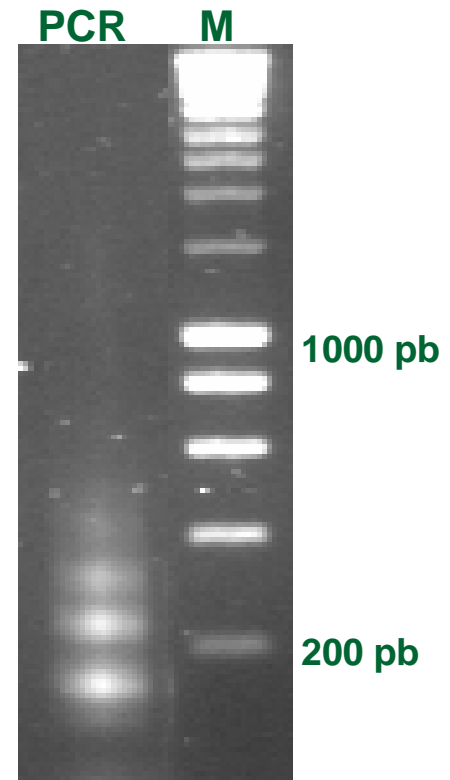
Driver: graines autofécondées de NI16



Embryons de NI16 âgés de 20 jours

A: embryon issu d'une autofécondation

B & C: embryons issus de l'hybridation avec NI637



Gel d'agarose de migration des produits PCR après la SSH

Purification et clonage des fragments PCR

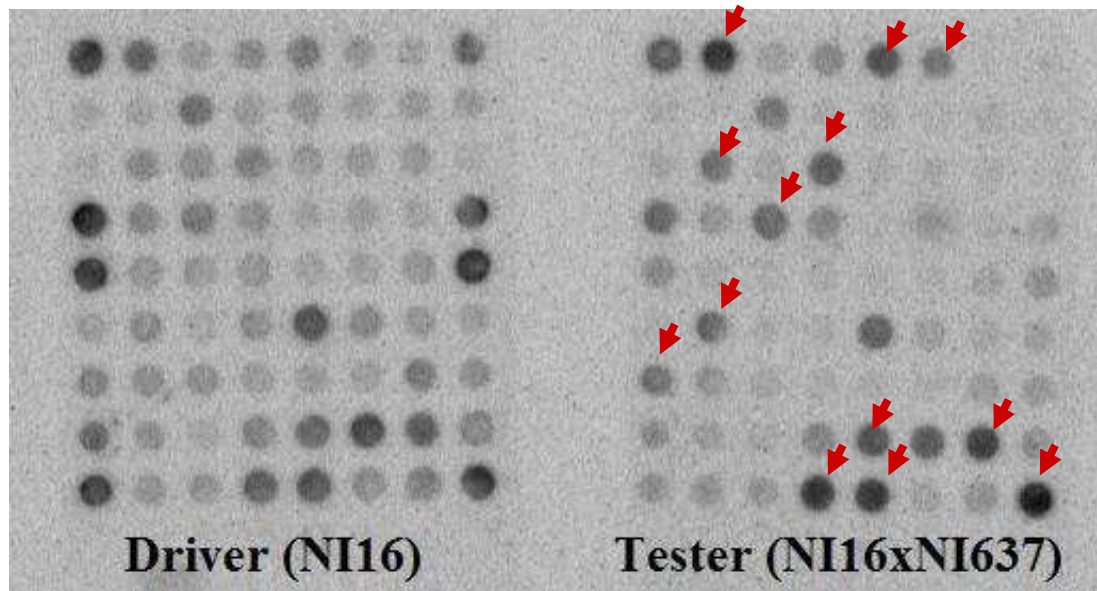
Fixation sur 2 membranes pour l'hybridation avec les sondes *Tester* et *Driver*

2- Identification des ADNc différemment exprimés chez les embryons en cours de dégénérescence

2-1 Hybridations interspécifiques

Hybridation des fragments avec les sondes: réaction de *dot blot*

Visualisation des membranes après l'hybridation avec les sondes



Séquençage des 13 clones spécifiques à l'échantillon *Tester*

2- Identification des ADNc différemment exprimés chez les embryons en cours de dégénérescence

Séquençage des clones et analyse des séquences

Séquenceur de type LICOR

Recherche d'homologies à l'aide des programmes BLAST ((Basic Local Alignment Search Tool)

BLASTN: Séquences nucléotidiques - Base de séquences nucléotidiques

BLASTX: Séquences nucléotidiques traduites en protéines - Base de séquences protéiques

2- Identification des ADNc différemment exprimés chez les embryons en cours de dégénérescence

2-1 Hybridations interspécifiques

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

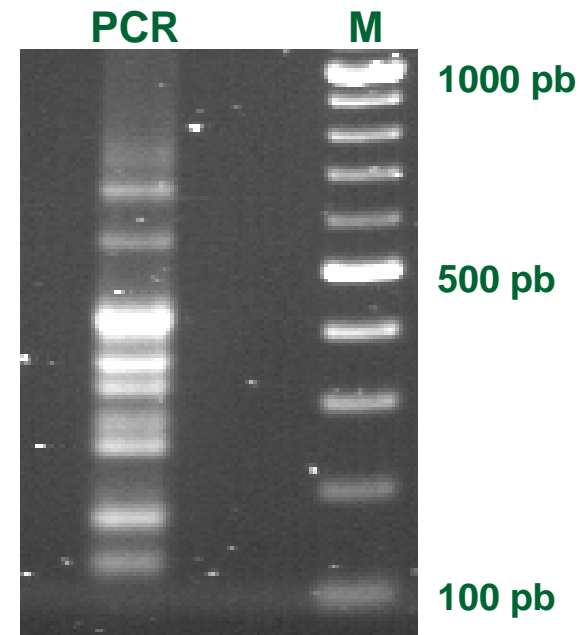
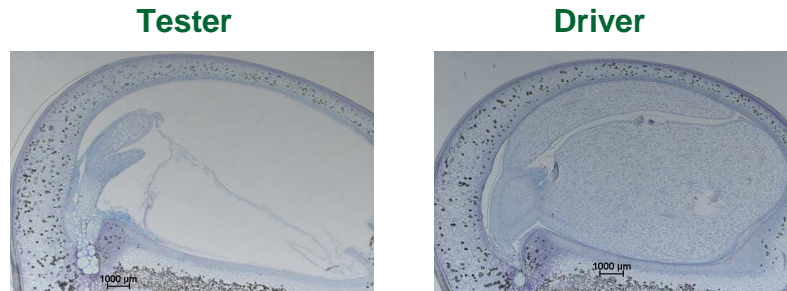
Clones	Taille (pb)	Recherche d'homologie	Meilleures homologies et numéros d'accèsion des séquences	Identité %
SSH_PcPv1 (1, 2, 5, 8, 10, 11, 12 et 13)	320	BLASTN	<i>Glycine max</i> cDNA, clone: GMFL01-21-C10 (AK286061)	100 % (319)*
		BLASTX	<i>Nicotiana tabacum</i> cytochrome P450 (BAA10929)	84 % (51)
SSH_PcPv2 (3)	293	BLASTN	<i>Glycine max</i> cDNA, clone: GMFL01-21-C10 (AK286061)	96 % (293)
		BLASTX	<i>Pisum sativum</i> putative senescence-associated protein (BAB33421)	92 % (81)
SSH_PcPv3 (4)	315	BLASTN	<i>Sesbania drummondii</i> clone SSH-36_01_A09_T3 mRNA sequence (DQ465789)	84 % (315)
		BLASTX	<i>Lilium longiflorum</i> putative senescence-associated protein (ABO20851)	76 % (82)
SSH_PcPv4 (6)	234	BLASTN	<i>Sesbania drummondii</i> clone SSH-62_02_C05_T3 mRNA sequence (DQ465815)	93 % (234)
		BLASTX	<i>Pisum sativum</i> putative senescence-associated protein (BAB33421)	95 % (45)
SSH_PcPv5 (7)	111	BLASTN	<i>Limonium bicolor</i> 18S ribosomal RNA gene, partial sequence (EU039827)	95 % (111)
		BLASTX	<i>Vitis vinifera</i> hypothetical protein (CAN65763)	82 % (23)
SSH_PcPv6 (9)	193	BLASTN	<i>Cratylia argentea</i> 18S ribosomal RNA gene, partial sequence (AF525294)	98 % (193)
		BLASTX	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> hypothetical protein (XP_001698950)	100 % (30)

*: Les nombres entre parenthèses représentent la longueur de l'alignement

2- Identification des ADNc différemment exprimés chez les embryons en cours de dégénérescence

2-2 mutagenèse à l'EMS

Hybridation Soustractive Suppressive avec des graines âgées de 12 jours



Gel d'agarose de migration des produits PCR après la SSH

Purification des produits PCR et séquençage

Recherche d'homologie dans les banques de gènes

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

Clones	Taille (pb)	Recherche d'homologie	Meilleures homologies et numéros d'accèsion des séquences	Identité %
SSH_Pv_E1	618	BLASTN	<i>Glycine max</i> cDNA, clone: GMFL01-21-C10 (AK286061)	99 % (619) *
		BLASTX	<i>Lilium longiflorum</i> cytochrome P450-like TBP protein (ABO20848)	91 % (84)
SSH_Pv_E2	519	BLASTN	<i>Phaseolus vulgaris</i> chloroplast, complete genome (EU196765)	99 % (519)
		BLASTX	<i>Oryza sativa</i> retrotransposon protein (ABR26094)	94 % (55)
SSH_Pv_E3	489	BLASTN	<i>Phaseolus vulgaris</i> myo-inositol 1-phosphate synthase mRNA (mips gene) (AJ853494)	99 % (489)
		BLASTX	<i>Phaseolus vulgaris</i> myo-inositol 1-phosphate synthase protein (CAH68559)	100 % (162)
SSH_Pv_E4	385	BLASTN	<i>Medicago truncatula</i> clone mth2-7h6, complete sequence (AC145156)	98 % (386)
		BLASTX	<i>Oryza sativa</i> hypothetical protein OsJ_020094 (EAZ36611)	91 % (35)
SSH_Pv_E5	382	BLASTN	<i>Vitis vinifera</i> contig VV78X190503.7, whole genome shotgun sequence (AM466733)	69 % (269)
		BLASTX	<i>Vitis vinifera</i> hypothetical protein (CAN68148)	65 % (44)
SSH_Pv_E6	315	BLASTN	<i>Glycine max</i> cationic peroxidase 2 (Prx2) mRNA, complete cds (AF039027)	94 % (315)
		BLASTX	<i>Glycine max</i> cationic peroxidase 2 protein (AAC83463)	96 % (104)
SSH_Pv_E7	295	BLASTN	<i>Lotus corniculatus</i> voltage-dependent anion channel 1.3 mRNA, complete cds (AY316739)	77 % (279)
		BLASTX	<i>Lotus corniculatus</i> voltage-dependent anion channel 1.3 protein (AAQ87021)	87 % (58)
SSH_Pv_E8	292	BLASTN	<i>Glycine max</i> cDNA, clone: GMFL01-21-C10 (AK286061)	100 % (292)
		BLASTX	<i>Lilium longiflorum</i> putative senescence-associated protein (ABO20851)	96 % (85)
SSH_Pv_E9	285	BLASTN	<i>Phaseolus vulgaris</i> sucrose synthase mRNA, complete cds (AF315375)	99 % (285)
		BLASTX	<i>Phaseolus vulgaris</i> sucrose synthase protein (AAN76498)	98 % (94)
SSH_Pv_E10	210	BLASTN	<i>Vitis vinifera</i> complete mitochondrial genome, clone ENTAV115 (FM179380)	99 % (209)
		BLASTX	<i>Arachis hypogaea</i> serine rich protein (ABH09320)	94 % (19)

*: Les nombres entre parenthèses représentent la longueur de l'alignement

2- Identification des ADNc différemment exprimés chez les embryons en cours de dégénérescence

2-2 mutagenèse à l'EMS

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

Clones	Taille (pb)	Recherche d'homologie	Meilleures homologies et numéros d'accèsion des séquences	Identité %
SSH_Pv_E1	618	BLASTN	<i>Glycine max</i> cDNA, clone: GMFL01-21-C10 (AK286061)	99 % (619) *
		BLASTX	<i>Lilium longiflorum</i> Cytochrome P450-like TBP protein (ABO20848)	91 % (84)
SSH_Pv_E3	489	BLASTN	<i>Phaseolus vulgaris</i> myo-inositol 1-phosphate synthase mRNA (mips gene) (AJ853494)	99 % (489)
		BLASTX	<i>Phaseolus vulgaris</i> myo-inositol 1-phosphate synthase protein (CAH68559)	100 % (162)
SSH_Pv_E6	315	BLASTN	<i>Glycine max</i> cationic peroxidase 2 (Prx2) mRNA, complete cds (AF039027)	94 % (315)
		BLASTX	<i>Glycine max</i> cationic peroxidase 2 protein (AAC83463)	96 % (104)
SSH_Pv_E7	295	BLASTN	<i>Lotus corniculatus</i> voltage-dependent anion channel 1.3 mRNA, complete cds (AY316739)	77 % (279)
		BLASTX	<i>Lotus corniculatus</i> voltage-dependent anion channel 1.3 protein (AAQ87021)	87 % (58)
SSH_Pv_E9	285	BLASTN	<i>Phaseolus vulgaris</i> sucrose synthase mRNA, complete cds (AF315375)	99 % (285)
		BLASTX	<i>Phaseolus vulgaris</i> sucrose synthase protein (AAN76498)	98 % (94)

*: Les nombres entre parenthèses représentent la longueur de l'alignement

Deux séquences ont été enregistrées dans la banque de gènes du NCBI

SSH_Pv_E6, EF660341 pour la peroxydase cationique

SSH_Pv_E7, EF672105 pour la VDAC

2- Identification des ADNc différemment exprimés chez les embryons en cours de dégénérescence

2-2 mutagenèse à l'EMS

>SSH_PvE6, 315 pb (EF660341)

5' **ACATTGAGACCATCAAAGAAGCTGTGGAAAGGGAGTGCCCAGGAGTTGTTTCCTGTGCTGATATACTCGTTCTCTCTGCCA**
GAGATGGCATTGTTTCGCTAGGAGGCCCCCATATCCCTCTTAAACTGGAAGAAGGGATGGTAGAAGGAGCAGAGCTGATGT
GGTGAAGAGTTCCCTCCAGACCACAATGAGTCCATTTCTCAGTTCTTGACAAGTTTGGTGCCATGGGAATTGACACTCCCG
GGGTGGTTGCATTGCTTGAGACACGCAGTGTTGGTAGAACCCATTGTGTGAAGTTGGTGCACCGTTTGT_3'

Alignement de la séquence SSH_PvE6 avec deux séquences de la peroxydase cationique du soja Gm_p1 (AF039027, 94%) et Gm_p2 (AF145348, 93%)

```
PvE6 : ACATTGAGACCATCAAAGAAGCTGTGGAAAGGGAGTGCCCAGGAGTTGTTTCCTGTGCTGATATACTCGTTCTCTCTGCCAGAGATGGCATTGTTTCGCTAGGAG : 105
Gm_p1 : ACATTGAGACCATCAAAGAAGCTGTGGAAAGGGAGTGCCCAGGAGTTGTTTCCTGTGCTGATATACTCGTTCTCTCTGCCAGAGATGGCATTGTTTCGCTAGGAG : 105
Gm_p2 : ACATTGAGACCATCAAAGAAGCTGTGGAAAGGGAGTGCCCAGGAGTTGTTTCCTGTGCTGATATACTCGTTCTCTCTGCCAGAGATGGCATTGTTTCGCTAGGAG : 105
```

```
PvE6 : GCCCCATATCCCTCTTAAACTGGAAGAAGGGATGGTAGAAGGAGCAGAGCTGATGTGGTGGAGAGTTCCCTCCAGACCACAATGAGTCCATTTCTCAGTTC : 210
Gm_p1 : GCCCCATATCCCTCTTAAACTGGAAGAAGGGATGGTAGAAGGAGCAGAGCTGATGTGGTGGAGAGTTCCCTCCAGACCACAATGAGTCCATTTCTCAGTTC : 210
Gm_p2 : GCCCCATATCCCTCTTAAACTGGAAGAAGGGATGGTAGAAGGAGCAGAGCTGATGTGGTGGAGAGTTCCCTCCAGACCACAATGAGTCCATTTCTCAGTTC : 210
```

```
PvE6 : TTGACAAGTTTGGTGCCATGGGAATTGACACTCCCGGGGTGGTTGCAATGCTTGGAGCACACAGTGTGGTGAACCCATTGTGTGAAGTTGGTGCACCGTTTGT : 315
Gm_p1 : TTGACAAGTTTGGTGCCATGGGAATTGACACTCCCGGGGTGGTTGCAATGCTTGGAGCACACAGTGTGGTGAACCCATTGTGTGAAGTTGGTGCACCGTTTGT : 315
Gm_p2 : TTGACAAGTTTGGTGCCATGGGAATTGACACTCCCGGGGTGGTTGCAATGCTTGGAGCACACAGTGTGGTGAACCCATTGTGTGAAGTTGGTGCACCGTTTGT : 315
```

2- Identification des ADNc différemment exprimés chez les embryons en cours de dégénérescence

2-2 mutagenèse à l'EMS

Expression des gènes au cours du développement des graines

Graines normales et graines anormales âgées de 3, 5 , 7, 10 et 12 jours

Myo-inositol 1-phosphate synthase : MIPS

Sucrose synthase : SUS

Voltage-dependent anion channel : VDAC

Cytochrome P450 : CYT

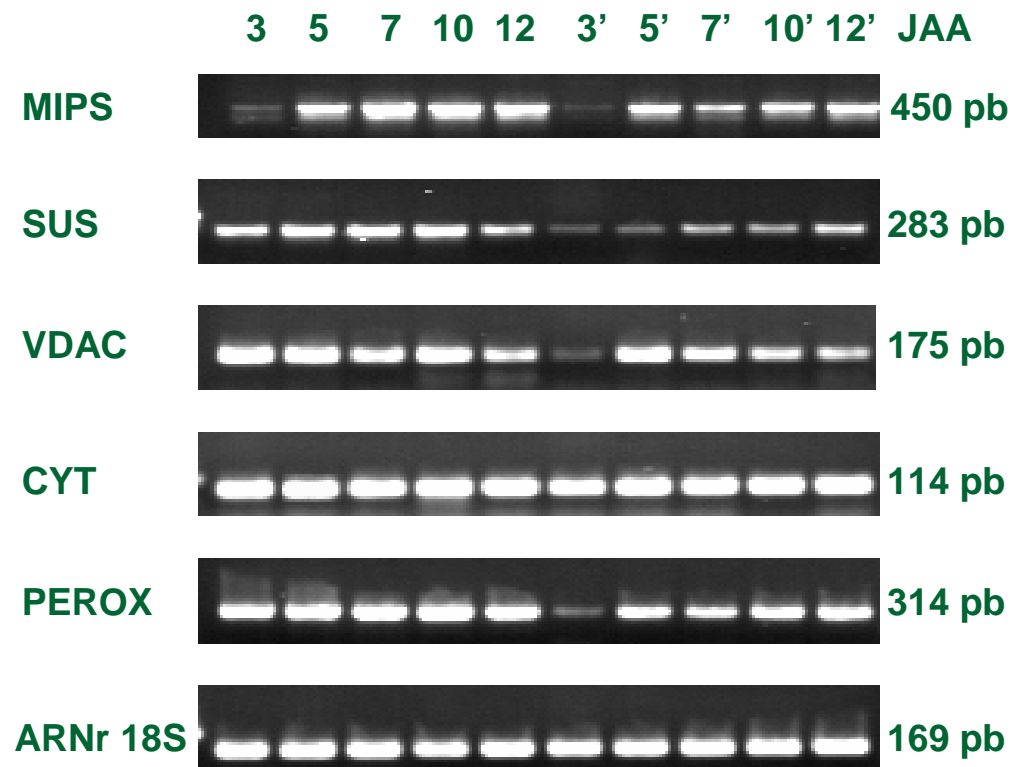
Peroxydase cationique : PER

RT-PCR avec l'ARNr 18S comme témoin

2- Identification des ADNc différemment exprimés chez les embryons en cours de dégénérescence

2-2 mutagenèse à l'EMS

Expression des gènes au cours du développement des graines



Quantification des bandes

Standardisation des quantités sur base du témoin l'ARNr 18S

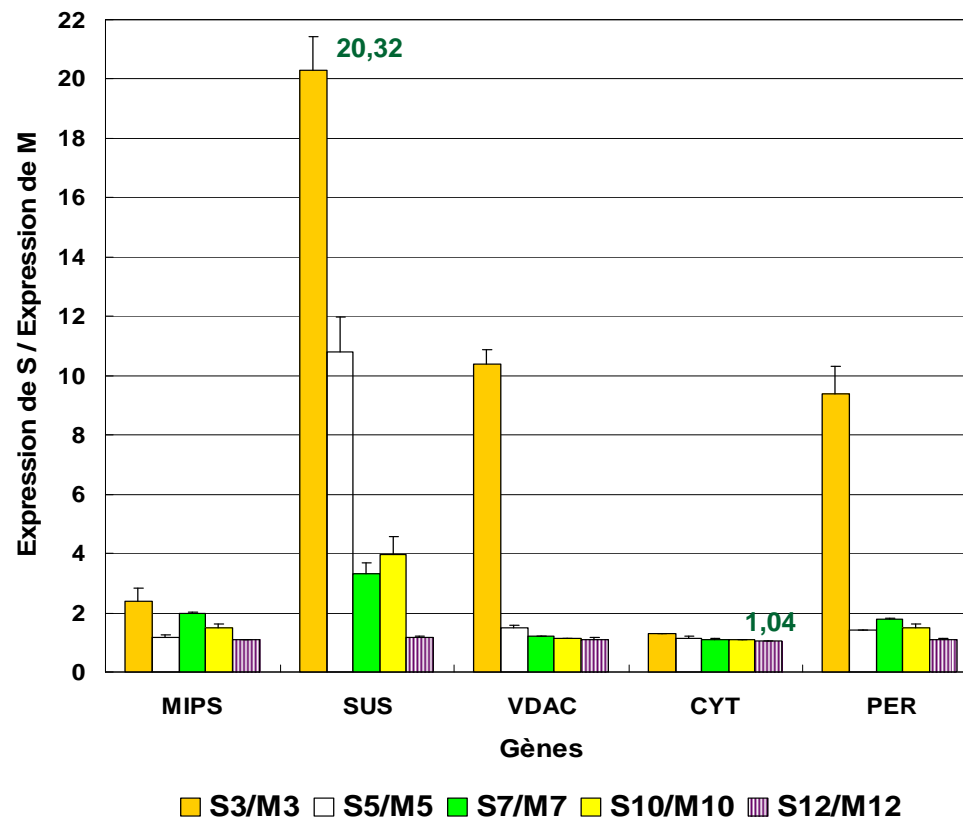
Calcul du facteur de réduction (n/n') au niveau des graines issues de la mutagenèse

Niveaux d'expression des gènes au cours du développement des graines chez les plantes témoins (n) et les plantes d'intérêt (n') après 30 cycles de PCR

2- Identification des ADNc différemment exprimés chez les embryons en cours de dégénérescence

2-2 mutagenèse à l'EMS

Facteurs de réduction (S/M) de l'expression des gènes dans les graines des plantes d'intérêts par rapport aux plantes témoins



Les niveaux d'expression de la plus part des gènes sont plus faibles dans les graines en voie d'avortement

La réduction de l'expression est plus marquée au début du développement des graines

2- Identification des ADNc différemment exprimés chez les embryons en cours de dégénérescence

Conclusions partielles

Les séquences codent pour des protéines ayant des homologues avec d'autres protéines connues

Cytochrome P450

Peroxydase cationique

Voltage-dependent anion channel

Sucrose synthase

Myo-inositol 1-phosphate synthase

Les ADNc identifiés sont présents dans les graines de *P. vulgaris*

Leurs niveaux sont plus faibles dans les graines en cours d'avortement issues de la mutagenèse

La réduction de l'expression est plus marquée au début de la croissance des graines

Conclusions

1- Caractériser des embryons de *Phaseolus* en cours d'avortement

2- Identifier des ADNc différemment exprimés chez ces embryons en voie d'avortement

Conclusions

1- Caractériser des embryons de *Phaseolus* en cours d'avortement

Embryons issus des hybridations interspécifiques

Croisements NI16xNI637 et NI16xBAT93

Cotylédons malformés

Retard de croissance de l'embryon

Embryons issus de la mutagenèse chimique à l'EMS

Génotype BAT93 de *P. vulgaris*

Cotylédons malformés et de petite taille

Suspenseurs malformés et de grande taille

Retard de croissance de l'embryon

Le caractère avortement des graines serait récessif, à hérédité maternelle et gouverné par un couple d'allèles

Conclusions

2- Identifier des ADNc différemment exprimés chez ces embryons en voie d'avortement

Séquences identifiées

Croisement interspécifique NI16xNI637 et la mutagenèse à l'EMS

Cytochrome P450

Peroxydase cationique (EF660341)

Voltage-dependent anion channel (EF672105)

Sucrose synthase

Myo-inositol 1-phosphate synthase

Expression des gènes dans les graines issues de la mutagenèse à l'EMS

Les ADNc identifiés sont présents dans les graines de *P. vulgaris*

Leurs niveaux sont plus faibles dans les graines en cours d'avortement

La réduction de l'expression est plus marquée au début de la croissance des graines

Conclusions

Des génotypes sélectionnés pour leur bonne aptitude à la combinaison

<i>P. vulgaris:</i>	NI637 et G21245
<i>P. coccineus:</i>	NI889 et NI16
<i>P. polyanthus:</i>	NI1015 et G35348

Des plantes hybrides ont été obtenues

NI889 x G21245

G35348 x G21245

La mutagenèse chimique à l'EMS a permis de produire des plantes dont les graines avortent avant la maturité et ces plantes constituent un excellent matériel pour l'étude du développement embryonnaire chez le genre *Phaseolus*.

Perspectives

Déterminisme génétique du caractère «avortement des graines»

Analyse de la descendance F3

Confirmation si 2/3 de plantes hétérozygotes et 1/3 de plantes homozygotes normales sur les 73 plantes F2

Séquences complètes des ADNc et identification des mutations ponctuelles

Technique RACE (amplification rapide d'extrémités d'ADNc)

Alignement des séquences

Identification de nouveaux gènes impliqués dans le développement des embryons chez *Phaseolus*

Enzymes à bouts francs: Alul, Afel, etc.

Gènes déjà mis en évidence chez les plantes modèles (Heat Shock Protein, Lipid Transfer Protein, etc.)

Lieux d'expression des différents gènes identifiés à l'intérieur des graines

Hybridation *in situ*: étude de l'expression spatiale

Perspectives

Hybridations interspécifiques

Mélange de grains de pollen des génotypes mâles et femelles

Prégermination des grains de pollen avant la pollinisation

Régénération des embryons en voie d'avortement issus de la mutagenèse chimique

Mise au point d'un milieu de régénération adéquat qui servira en hybridation interspécifique

Merci de votre
attention