

# Barrières pré-zygotiques chez les hybrides entre formes sauvages du niébé, *Vigna unguiculata* (L.) Walp.

Daouda Kouadio <sup>(1)</sup>, André Toussaint <sup>(1)</sup>, Rémy S. Pasquet <sup>(2)</sup>, Jean-Pierre Baudoin <sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> Unité de Phytotechnie tropicale et Horticulture. Faculté universitaire des Sciences agronomiques de Gembloux. Passage des Déportés, 2. B-5030 Gembloux (Belgique). E-mail : daoudak70@hotmail.com

<sup>(2)</sup> International Center of Insect Physiology and Ecology, P.O. Box 30772, Nairobi (Kenya).

Reçu le 15 mars 2005, accepté le 6 octobre 2005

Les formes sauvages du niébé, *Vigna unguiculata*, constituent un pool génétique important jusque là insuffisamment exploité pour l'amélioration de la forme cultivée. Dans le but de favoriser l'utilisation de ces formes sauvages dans les programmes d'amélioration génétique, nous avons entrepris de comprendre les différentes réactions d'incompatibilité qui se manifestent entre elles. Nous nous sommes particulièrement intéressés à la compréhension des causes des avortements massifs observés au cours des hybridations entre la sous-espèce *baoulensis* NI 933 et les autres formes sauvages de *V. unguiculata*. Les réactions d'incompatibilité détectées grâce à l'utilisation de la fluorescence du bleu d'aniline, sont pour la plupart d'ordre pré-zygotiques. Elles se manifestent en trois sites ; à savoir le tiers supérieur et inférieur du style et au sein de l'ovaire. Cependant, ces réactions ou barrières d'incompatibilité ne sont pas absolues. En effet, au cours des hybridations réalisées durant nos travaux, plus de 4 % des ovules ont été fécondés chez les différentes combinaisons étudiées.

**Mots-clés.** *Vigna unguiculata*, formes sauvages, hybridation intra-spécifique, germination du pollen, croissance du tube pollinique, barrière d'incompatibilité pré-zygotique.

**Hybrids pre-zygotic barriers between wild forms of cowpea.** The wild forms of cowpea, *Vigna unguiculata*, constitute an important gene pool insufficiently exploited for the improvement of the cultivated form. In order to promote the use of these wild forms in the genetic improvement programmes, we undertook to understand the various incompatibility reactions which appear in the crosses between wild forms. Efforts were concentrated to understand the incompatibility barriers in the hybridizations between subsp. *baoulensis* NI 933 and the other wild forms of *V. unguiculata*. Thanks to the use of the aniline blue fluorescence, we observed a high frequency of pre-zygotic barriers. They appear in three sites, i.e. the higher and lower third of the style, and within the ovary. However, these incompatibility barriers are not absolute. Indeed, in our hybridizations, more than 4% of the ovules were fertilized in the various studied combinations.

**Keywords.** *Vigna unguiculata*, wild forms, intraspecific hybridization, pollen germination, pollen tube growth, barriers of pre-zygotic incompatibility.

## 1. INTRODUCTION

Le niébé, *Vigna unguiculata* (L.) Walp. (*Fabaceae*) est la principale légumineuse alimentaire cultivée dans les zones de basse altitude d'Afrique. Les formes sauvages sont largement répandues en Afrique, des régions subdésertiques aux forêts de montagne. Cette diversité de milieux se traduit par une importante diversité tant moléculaire que morphologique qui permet d'identifier une douzaine de taxons infraspécifiques, dont certains pourraient être élevés au rang d'espèce sur la base des distances génétiques observées (Pasquet, 1999). Néanmoins, *V. unguiculata* est très bien caractérisée morphologiquement, l'espèce est bien séparée de ses voisines, *Vigna schlechteri* Harms et *Vigna vexillata* (L.)

A. Rich., et l'unité de *V. unguiculata* mise en place par Maréchal *et al.* (1978) n'a jamais été remise en question.

À l'intérieur de *V. unguiculata*, on distingue douze taxons séparés au niveau subspécifique. Ces douze sous-espèces peuvent être classées en trois groupes sur la base de leur écologie (forêts ou savanes) et de leur mode de reproduction (morphologie florale favorisant l'allogamie ou l'autogamie), mais ces trois groupes ne peuvent être séparés sur la base de critères morphologiques. On distingue ainsi un groupe allogame, un groupe allo-autogame et un groupe autogame (Pasquet, 1994 ; 1999 ; Pasquet, Baudoin, 1997).

Un premier groupe, phylogénétiquement primitif, inclut des sous-espèces pérennes rencontrées dans les zones forestières (forêts guinéennes ou forêts

d'altitude), qui présentent toujours un mode de reproduction allogame. Il s'agit de subsp. *baoulensis* (A. Chev.) Pasquet (forêts guinéennes de la Sierra Leone au Cameroun), subsp. *letouzeyi* Pasquet (forêts guinéennes du bassin congolais), subsp. *burundiensis* Pasquet (forêt d'altitude de la région des grands lacs), subsp. *pawekiae* Pasquet (forêts d'altitude du sud de l'Ethiopie au Zimbabwe) et de subsp. *aduensis* Pasquet (forêts d'altitude du nord de l'Ethiopie).

Un second groupe, phylogénétiquement plus évolué, inclut des sous-espèces pérennes rencontrées dans les zones de savanes, qui présentent un mode de reproduction plus autogame, chaque taxon présentant des populations allogames et des populations plus ou moins autogames. On y distingue subsp. *alba* (G. Don) Pasquet du Gabon à l'Angola, subsp. *tenuis* (E. Mey.) Maréchal, Mascherpa & Stainier de la Zambie à l'Océan Indien, subsp. *stenophylla* (Harv.) Maréchal, Mascherpa & Stainier *sensu lato* de la Namibie à la province du Cap en Afrique du Sud, subsp. *pubescens* (R. Wilczek) Pasquet de la région des Grands Lacs au Mozambique. Subsp. *dekindtiana* (Harms) Verdc. *sensu stricto*, qui se rencontre du sud de l'Angola au Zimbabwe, fait sans doute partie de ce groupe mais aucun échantillon vivant n'a pu en être étudié pour le confirmer. *Vigna monantha* Thulin, localisé aux zones côtières de Somalie, appartient aussi à ce groupe même si le changement taxonomique n'a pas encore été effectué.

Le troisième groupe est réduit à la sous-espèce *unguiculata* qui comprend les formes cultivées (var. *unguiculata*) et leur progéniteur sauvage (var. *spontanea* (Schweinf.) Pasquet). Même si subsp. *unguiculata* pourrait être considérée comme une sous-espèce allo-autogame, les plantes pérennes allogames sont réduites à quelques populations des plaines côtières de l'Océan Indien alors que les plantes annuelles et autogames se rencontrent presque partout en Afrique. Var. *spontanea* est aussi une plante adventice et colonisatrice qui aime les milieux perturbés, en particulier les champs cultivés où, jusqu'à la fructification, elle est difficilement distinguable de var. *unguiculata*.

Dans la perspective de l'amélioration génétique des formes cultivées, les formes sauvages apparaissent comme une source de gènes utiles pour ce qui est de la résistance/tolérance aux pathogènes et autres facteurs biotiques et abiotiques (Fatokun, Singh, 1987). Cependant, leur utilisation dans les programmes d'amélioration nécessite d'identifier de manière précise les barrières d'incompatibilité entre toutes les formes sauvages et cultivées. Chez *Vigna*, ces barrières peuvent intervenir avant la fécondation de l'ovule (barrières pré-zygotiques) ou après la fécondation de l'ovule (barrières post-zygotiques).

Dans le premier cas, l'incompatibilité peut se manifester par une faible germination du pollen sur le stigmate comme cela fut observé par Barone *et al.*

(1992) au cours des croisements entre *V. vexillata* et *V. unguiculata*. Elle peut également se manifester par un échec à la pénétration des tubes polliniques dans le stigmate comme cela fut observé par Chen *et al.* (1983) au cours des hybridations entre *V. umbellata* (Thunb.) Ohwi & Ohashi et *Vigna radiata* (L.) Wilczek. Enfin, l'incompatibilité pré-zygotique peut se manifester par un ralentissement de la croissance du tube pollinique dans les tissus stylaires et/ou par la distorsion du tube pollinique (Chowdhury, Chowdhury, 1983 ; Barone *et al.* 1992).

Quant aux barrières d'incompatibilité post-zygotiques, elles peuvent se manifester par l'absence de développement de l'embryon hybride ou par une stérilité complète ou partielle des graines hybrides, ou encore par une stérilité des hybrides F1 obtenus (Biswas, Dana, 1976 ; Ahn, Hartmann, 1978 ; Chen *et al.* , 1983 ; Fatokun, 1991 ; Barone *et al.*, 1992).

Au niveau intra-spécifique, très peu de travaux ont été consacrés à la compréhension de la nature des barrières d'incompatibilité existantes entre les différents taxa que comporte l'espèce *Vigna unguiculata* et particulièrement entre les formes sauvages. Echikh (2000) a notamment réalisé une étude sur les barrières d'incompatibilité, mais en n'utilisant que les trois taxons : subsp. *baoulensis*, subsp. *letouzeyi* et subsp. *tenuis* sur la dizaine des taxons indiqués dans la classification de Pasquet (1994). Elle a mis en évidence des barrières d'incompatibilité pré-zygotiques, se caractérisant, notamment, par des difficultés de germination des grains de pollen sur le stigmate et le ralentissement du tube pollinique lors de la pénétration dans les tissus stigmatiques. Ces différentes anomalies sont surtout observées lors de l'utilisation de la sous-espèce *baoulensis* originaire de l'Afrique de l'Ouest et dont l'aire de distribution s'étend dans cette contrée (Pasquet, 1994 ; 1996). Des taux d'avortements très élevés (de 70 à 100 %) sont observés lorsque la subsp. *baoulensis* est croisée avec les autres formes sauvages.

Le but de notre travail est de déterminer si les barrières d'incompatibilité de type pré-zygotiques se manifestent au cours des hybridations entre la subsp. *baoulensis* et d'autres formes sauvages de *V. unguiculata*. Les résultats de ces croisements pourront contribuer à mieux comprendre l'organisation de la diversité génétique du niébé. Ces informations seront aussi utiles dans l'amélioration variétale de *V. unguiculata*.

## 2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 2.1. Matériel végétal

La liste des génotypes parentaux de *V. unguiculata* se trouve au **tableau 1**.

**Tableau 1.** Liste des génotypes parentaux de *V. unguiculata* — List of *V. unguiculata* parental genotypes.

Taxons	Numéros d'introduction de l'institut donneur <sup>1</sup>	Pays d'origine
<b>Spontanée autogame</b> var. <i>spontanea</i>	NI 945	Niger
<b>Allo-autogame</b> subsp. <i>alba</i>	NI 1388 NI 1657	Congo Angola
<b>Allogame</b> subsp. <i>burundensis</i> subsp. <i>baoulensis</i>	NI 456 NI 933 NI 993	Burundi Ghana Nigeria

(<sup>1</sup>) Jardin Botanique National de Meise, Belgique.

## 2.2. Semis en serres

Pour chaque génotype, deux à trois graines ont été scarifiées pour faciliter la germination puis placées dans des boîtes de Petri et mises à l'étuve à 25 °C. Deux à trois jours après la germination, elles ont été placées dans des « jiffy pots » et mises au germeoir à température de 7 °C et 100 % d'humidité relative. Après le développement des feuilles primaires, les plantules ont été transplantées dans des serres tropicalisées de la Faculté universitaire des Sciences agronomiques de Gembloux. La température des serres est réglée à 21 °C le jour et 16,5 °C la nuit, avec une humidité relative de 80 %. Les travaux se sont déroulés de février à août 2004, ils ont débuté par les semis répétés des génotypes parentaux aux mois de février, mars et avril afin de favoriser la synchronisation des floraisons entre les génotypes identifiés comme tardifs (NI 456, NI 933 et NI 993) et les génotypes identifiés comme précoces (NI 945, NI 1388, NI 1657) par Echikh (2000).

## 2.3. Estimation de la fertilité pollinique

Pour chaque génotype parental, la fertilité pollinique a été estimée sur une moyenne de trois fleurs (pendant les mois d'avril, de juin et d'août) grâce à un test de coloration des grains de pollen à l'acétocarmin. Les grains de pollen colorés et bien ronds sont considérés comme viables (Alexander, 1980).

## 2.4. Hybridations, germination du pollen et croissance du tube pollinique

Les premières hybridations ont débuté en avril et se sont poursuivies jusqu'en août. Elles ont été effectuées selon la technique utilisée par Echikh (2000). Les

fleurs pollinisées destinées aux observations microscopiques ont été recueillies pour chaque combinaison réalisée à raison de 10 à 19 fleurs après l'échec de la nouaison, 24 heures après pollinisation (HAP). Dans le but de suivre la vitesse de germination du pollen, deux fleurs pollinisées ont été également prélevées pour chaque combinaison à 1, 2, 4, 6, 8, 10 et 16 heures après pollinisation. Des génotypes parentaux ont été autofécondés et prélevés également à différentes heures à raison de 10 à 15 fleurs afin d'être observés comme témoins. La méthode utilisée pour suivre la germination du pollen sur le stigmate et la croissance du tube pollinique dans le style et dans l'ovaire est la méthode de fluorescence du bleu d'aniline (Dumas, Knox, 1983). Pour les différents échantillons à traiter, le gynécée complet est fixé pendant 24 heures à 4 °C dans une solution 1 : 1 glutaraldéhyde et acide formique (v/v). Après la fixation, le matériel est mis à macérer dans de la soude caustique concentrée (8 N) pendant au moins 12 heures. Le style est par la suite rincé plusieurs fois à l'eau courante avant l'observation.

Les styles et les ovaires sont ensuite séparés et traités différemment à cause de leur différence de structure et de consistance. Les styles sont disséqués longitudinalement et la face sectionnée est disposée vers le haut pour recevoir la lumière incidente. Les ovaires sont ouverts délicatement sur toute la ligne de suture du carpelle, de manière à maintenir les ovules sur les deux demi-carpelles selon l'alternance de leur implantation sur le placenta. Les échantillons sont déposés sur des lames et reçoivent une goutte de fluorochrome de bleu d'aniline qui forme un complexe avec la callose dont l'ensemble émet une fluorescence jaune-vert (Eschrich, Currier, 1964).

L'ensemble est recouvert d'une lamelle pour observation sur un microscope Nikon (Elipse E 800) fluorescent en lumière réfléchie. Les images sont prises à l'aide d'une camera JVC (3-CCD) et gérée par le programme Image Archive Plus de Sony.

La mise en évidence des barrières d'incompatibilité pré-zygotiques est faite à partir de l'observation de la germination du pollen sur le stigmate, la croissance des tubes polliniques dans le style et dans l'ovaire, ainsi que la présence du tube pollinique à l'entrée du micropyle de l'ovule. Nous avons considéré comme fécondé tout ovule pénétré par un tube pollinique ou ayant un tube pollinique à l'entrée du côté micropylaire. Le nombre total d'ovules observés et le nombre d'ovules avec un tube pollinique à l'entrée du micropyle ont été comptés. Le pourcentage d'ovules fécondés a été calculé à partir de la formule suivante :

$$\frac{\text{nombre d'ovules ayant un tube pollinique à l'entrée}}{\text{nombre total d'ovules observés}} \times 100$$



### 3. RÉSULTATS

#### 3.1. Fertilité pollinique et croissance du tube pollinique des parents

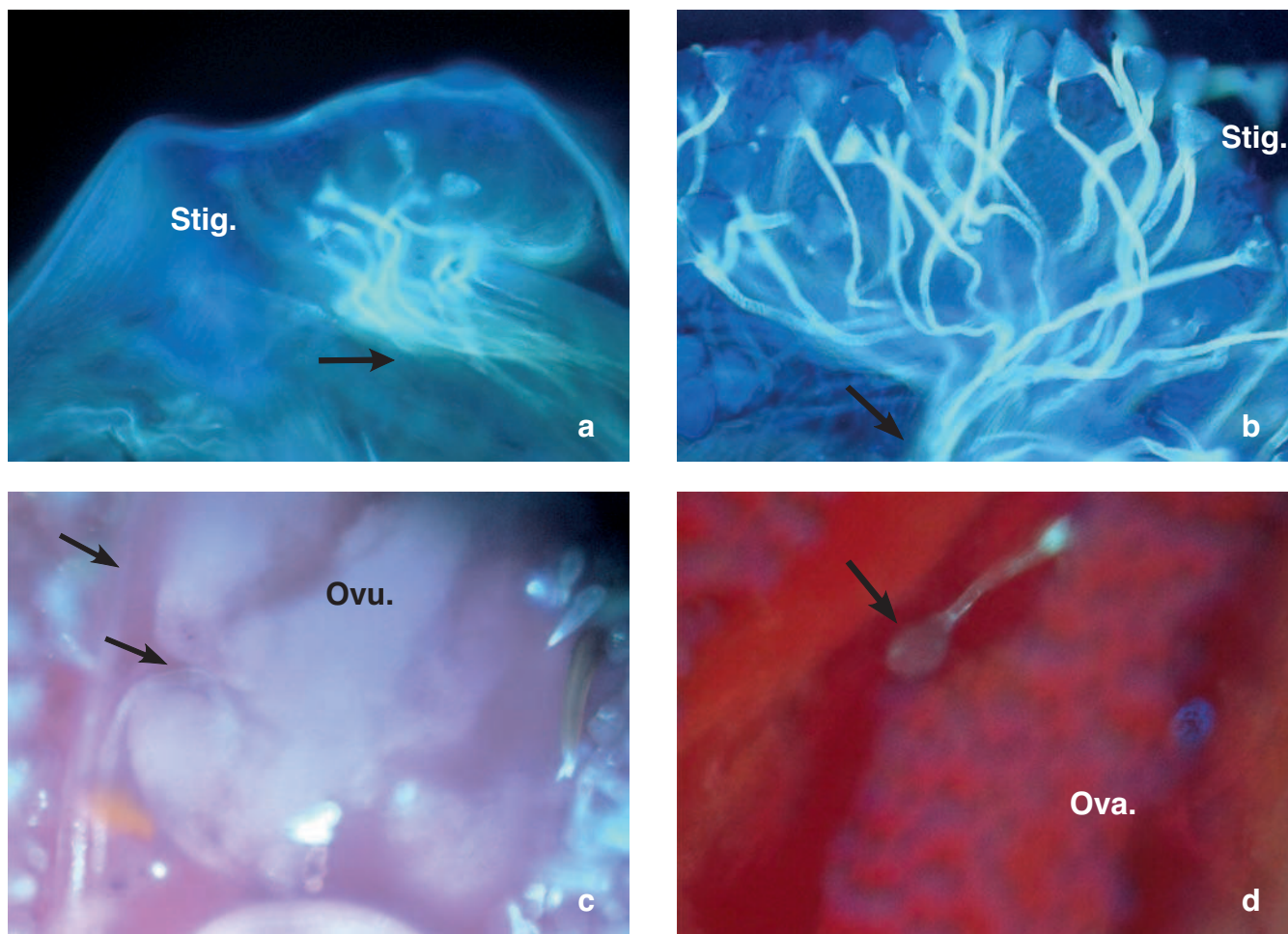
La fertilité pollinique des différents génotypes parentaux est élevée : elle varie entre 90 et 98 %.

Lors des autofécondations dans nos conditions de culture, on observe un début de germination des grains de pollen des génotypes parentaux une à deux heures après pollinisation (**Figure 1a et 1b**). Ces tubes polliniques atteignent l'ovaire, en général, 4 à 6 heures après pollinisation. Le taux de grains de pollen germés sur le stigmate, 24 heures après pollinisation, lors des

autofécondations varie entre 87 à 95 % (**Tableau 2**). Le taux d'ovules avec un tube pollinique à l'entrée est élevé : il varie, en effet, entre 81,4 et 97,4 % (**Figure 1c**). Cependant, on observe lors de certaines autofécondations du génotype NI 933, la présence d'une boursouffure à l'extrémité du tube pollinique bloquant ainsi sa croissance dans l'ovaire (**Figure 1d**).

#### 3.2. Suivi de la croissance du tube pollinique chez les différentes combinaisons

Pour les différentes combinaisons étudiées, nous avons observé un taux de germination élevé du pollen sur le stigmate. En effet, la germination du pollen débute 1 à



**Figure 1.** Germination du pollen sur le stigmate et croissance du tube pollinique dans l'ovaire au cours des autofécondations de génotypes parentaux — *Germination of pollen on the stigma and growth of the pollen tube in the ovary during self-fertilization of parental genotypes.*

a et b : germination du grain de pollen sur le stigmate (Stig.) et pénétration des tubes polliniques au sein des tissus stigmatiques, deux heures après pollinisation respectivement chez subsp. *alba* NI 1657 et subsp. *burundensis* NI 456 (100 ×) — *germination of the pollen grain on the stigma (Stig.) and penetration of the pollen tubes within the stigma, two hours after pollination respectively at subsp. alba NI 1657 and subsp. burundensis NI 456 (100 ×)* ; c : pénétration du tube pollinique par le micropyle de l'ovule (Ovu.) et poursuite de la croissance d'un autre vers un deuxième ovule chez subsp. *alba* NI 1657 (200 ×) — *penetration of the pollen tube in the micropyle of the ovule (Ovu.) and growing of another towards a second ovule at subsp. alba NI 1657 (200 ×)* ; d : croissance interrompue du tube pollinique dans l'ovaire (Ova.), avec une boursouffure à son extrémité chez subsp. *baoulensis* NI 933 autofécondé (200 ×) — *pollen tube stopped growth in the ovary (Ova.), with a blister at its end in the self-fertilization of subsp. baoulensis NI 933 (200 ×).*

**Tableau 2.** Autofécondations des génotypes parentaux : fertilité pollinique, pourcentage de germination du pollen sur le stigmate et pourcentage d'ovules avec un tube pollinique à l'entrée du micropyle — *Self-fertilizations of the parental genotypes: pollinic fertility, percentage of pollen germination on the stigma and percentage of ovules with a pollen tube at the entry of micropyle.*

Génotypes autofécondés	Fertilité pollinique (%)	Nombre de pistils observés	% de germination du pollen sur le stigmate 24 HAP <sup>(1)</sup>	Nombre total d'ovules observés	% d'ovules avec un tube pollinique à l'entrée du micropyle
<b>Forme spontanée autogame</b>					
NI 945	93	10	92 ± 0,03	157	97,5
<b>Formes allo-autogames</b>					
NI 1388	92	10	87 ± 0,03	157	76,4
NI 1657	90	12	89 ± 0,02	190	87,4
<b>Formes allogames</b>					
NI 933	98	15	93 ± 0,02	237	81,4
NI 993	94	10	89 ± 0,02	147	85,0
NI 456	97	10	95 ± 0,02	162	75,3

<sup>(1)</sup> HAP = heures après pollinisation — *hours after pollination*

2 heures après le dépôt sur le stigmate suivant la combinaison ; 24 heures après le dépôt, cette germination est de 83 à 95 % chez la plupart des combinaisons étudiées (**Tableau 3**). Ce taux est presque identique à celui observé lors des autofécondations. Chez toutes les combinaisons étudiées, les tubes polliniques au cours de leur croissance ont traversé les tissus stigmatiques et ont été aperçus dans le tiers supérieur du style 4 heures environ après pollinisation

et 8 à 10 heures successivement dans le tiers inférieur du style et dans l'ovaire. Le pourcentage d'ovaires avec au moins un tube pollinique 24 heures après pollinisation varie d'une combinaison à l'autre. Il varie entre 62 et 70 % chez les combinaisons entre la forme allogame NI 933 et la forme spontanée autogame NI 945. Ce pourcentage varie entre 47 et 90 % chez les combinaisons entre la forme allogame NI 933 et les formes allo-autogames NI 1656 et NI 1657. Enfin au

**Tableau 3.** Hybridations entre les formes sauvages de *V. unguiculata* 24 heures après pollinisation (HAP) : germination du pollen sur le stigmate et croissance du tube pollinique dans le style et l'ovaire — *Hybridizations between the wild forms of V. unguiculata 24 hours after pollination (HAP): germination of pollen on the stigma and growth of the pollen tube in the style and the ovary.*

Croisements (♂ x ♀)	Nombre de pistils observés	% de germination du pollen sur le stigmate 24 HAP	Nombre et (%) de styles et d'ovaires avec au moins un tube pollinique 24 HAP		Nombre total d'ovules observés	Nombre et (%) d'ovules avec un tube pollinique à l'entrée du micropyle
			Style	Ovaire		
Allogame x autogame spontanée						
NI 933 x NI 945	13	95 ± 0,02	13 (100)	8 (100)	204	14 (07)
NI 945 x NI 933	10	94 ± 0,01	10 (100)	7 (70)	155	12 (08)
Allogame x allo-autogame						
NI 933 x NI 1388	13	84 ± 0,04	13 (100)	11 (85)	205	15 (07)
NI 1388 x NI 933	10	83 ± 0,06	10 (100)	9 (90)	163	15 (09)
NI 933 x NI 1657	19	91 ± 0,02	19 (100)	9 (47)	298	13 (04)
NI 1657 x NI 933	11	84 ± 0,05	11 (100)	9 (82)	198	22 (11)
Allogame x allogame						
NI 933 x NI 993	10	91 ± 0,01	10 (100)	10 (100)	158	30 (19)
NI 993 x NI 933	10	89 ± 0,05	10 (100)	10 (100)	150	48 (32)
NI 933 x NI 456	10	88 ± 0,04	10 (100)	7 (70)	165	10 (06)
NI 456 x NI 933	10	88 ± 0,01	10 (100)	8 (80)	205	20 (10)

niveau des combinaisons réalisées entre la forme allogame NI 933 et les formes allogames NI 993 et NI 456, environ 70 à 100 % des ovaires ont montré la présence d'au moins un tube pollinique 24 heures après pollinisation.

**Combinaisons entre allogame et autogame spontanée.** On observe chez les fleurs pollinisées qui ont chuté au cours des hybridations entre var. *spontanea* (spontanée autogame) NI 945 et subsp. *baoulensis* (allogame) NI 933, qu'environ 94 à 95 % des grains de pollen ont germé normalement sur le stigmate (**Tableau 3**). Les tubes polliniques ont traversé les tissus stigmatiques et arrivent pour la plupart dans le tiers supérieur du style (**Figure 2a et 2b**). Cependant, leur croissance est ralentie dans le tiers inférieur du style et seulement 7 à 8 % des ovules sont fécondés 24 HAP. On observe un arrêt de la croissance des tubes polliniques au niveau de l'ovaire sans que la fécondation se produise. Ce blocage se manifeste parfois après une trajectoire sinueuse du tube pollinique, lequel montre des bouchons callosiques ou un renflement à son extrémité (**Figure 2c et 2d**).

**Combinaisons entre allogame et allo-autogame.** Au niveau des fleurs avortées chez les hybridations entre la forme allogame subsp. *baoulensis* NI 933 et les deux génotypes de la forme allo-autogame subsp. *alba* NI 1388 et NI 1657, on observe également une bonne germination du pollen sur le stigmate, avec des taux variant entre 83 et 91 % (**Tableau 3**). Les tubes polliniques parviennent, dans les différentes combinaisons, au niveau du tiers supérieur du style après avoir traversé les tissus stigmatiques. À ce niveau on observe l'arrêt de leur croissance dans le tiers supérieur du style dans certains cas (**Figure 3a**) et dans le tiers inférieur dans d'autres cas. Très peu d'entre eux parviennent à l'ovaire. Ainsi, seulement 4,4 à 11,1 % des ovules observés ont présenté un tube pollinique à leur entrée (**Figure 3b**).

**Combinaisons entre allogames.** Chez les hybridations entre les formes sauvages allogames, entre les deux génotypes NI 933 et NI 993 de subsp. *baoulensis*, et entre NI 933 de subsp. *baoulensis* et NI 456 de subsp. *burundensis*, on constate également une bonne germination du pollen sur le stigmate (**Figure 4a**). Le taux de germination varie entre 88 et 91 %. Cependant, pour ce qui est de la fécondation des ovules, les observations divergent suivant le type de combinaisons. Le taux d'ovules avec un tube pollinique à l'entrée est élevé lorsque l'hybridation est réalisée entre les deux génotypes de la sous-espèce *baoulensis* (NI 933 et NI 993), soit 19 et 32 % (**Figure 4b**). Par contre, le croisement entre NI 933 et NI 456 présente seulement 6 et 9,7 % d'ovules avec un tube pollinique à leur entrée.

#### 4. DISCUSSION ET CONCLUSION

Selon nos résultats, les causes des nombreux avortements observés au cours des hybridations entre les formes sauvages ne sont pas liées aux réactions d'incompatibilité de type pollen/stigmate. Chez les différentes combinaisons analysées, la germination du pollen et la pénétration du tube pollinique dans les tissus stigmatiques se sont bien déroulées. Cependant, c'est au niveau du style et de l'ovaire que des manifestations d'incompatibilité ont pu être identifiées.

La première manifestation d'incompatibilité a lieu dans le tiers supérieur du style. En effet, à ce niveau chez certaines combinaisons, la croissance du tube pollinique est ralentie puis bloquée comme cela fut observé au cours des croisements entre la forme allogame NI 933 et les formes allo-autogames.

La seconde manifestation d'incompatibilité a lieu au niveau du tiers inférieur du style, avec également un arrêt de la croissance des tubes polliniques comme cela fut observé chez la plupart des combinaisons étudiées. La troisième manifestation d'incompatibilité a lieu au sein de l'ovaire, avec un arrêt de la croissance du tube pollinique dont l'extrémité présente une boursouffure comme cela fut observé au cours des croisements entre la forme allogame NI 933 et la forme spontanée autogame NI 945.

Ces différentes barrières d'incompatibilité ne sont pas absolues. En effet, toutes les combinaisons réalisées montrent plus de 4 % d'ovules fécondés. Chez le genre *Medicago*, Sangduen *et al.* (1983) ont également observé un ralentissement de la croissance du tube pollinique dans le style chez des hybridations interspécifiques alors que la germination du pollen sur le stigmate s'était normalement déroulée. Chez le genre *Prunus*, Socias et Alonso (2004) ont aussi observé que les réactions d'incompatibilité pré-zygotiques pouvaient se manifester parfois par la formation d'une boursouffure à l'extrémité du tube pollinique bloquant, ainsi, sa croissance dans le style ou dans l'ovaire. Chez le genre *Phaseolus* également, Suy (1979) a mis en évidence la présence d'une boursouffure aussi bien chez des tubes polliniques à croissance normale et anormale.

Nos observations confirment l'existence des barrières d'incompatibilité pré-zygotiques entre les formes sauvages de *V. unguiculata*. Cependant, d'autres facteurs pourraient intervenir pour expliquer l'avortement massif des fleurs pollinisées, comme le taux de chute naturel des fleurs, le traumatisme floral dû à la castration et la présence de barrières d'incompatibilité post-zygotiques fréquemment observées chez le genre *Phaseolus* (Lukoki, Maréchal (1981) ; Weilenmann *et al.* 1987 ; Baudoin, Maréchal, 1991).



Malgré le fait que les formes sauvages utilisées dans nos croisements appartiennent à des groupes distincts selon la classification de Pasquet (1994 ; 1999), les barrières pré-zygotiques observées dans les hybridations ne sont pas insurmontables. Toutes ces formes appartiennent à un même réservoir génétique. Les sources sauvages constituent une source de gènes potentiellement utiles pour l'amélioration de la forme cultivée, *V. unguiculata* subsp. *unguiculata* var. *unguiculata*. Des recherches futures pourront être développées à plusieurs niveaux : évaluer agronomiquement ces formes sauvages et identifier des caractères intéressants en sélection variétale du niébé ; analyser les possibilités de croisements entre les génotypes sauvages les plus utiles et la forme cultivée, et profiter d'hybrides entre formes sauvages de *V. unguiculata* pour faciliter des transferts de gènes chez la forme cultivée.

Toutes les hybridations réalisées entre formes sauvages et cultivées du niébé permettront aussi de mieux comprendre l'organisation de la diversité génétique de *V. unguiculata* au sens large.

## Remerciements

Ces travaux ont été rendus possibles grâce à l'aide financière de la République de Côte d'Ivoire qui finance la bourse d'étude du premier auteur. Nous transmettons nos remerciements aux autorités de l'ambassade de Côte d'Ivoire en Belgique, ainsi qu'aux responsables de l'Unité de Phytotechnie Tropicale et d'Horticulture de la Faculté universitaire des Sciences agronomiques de Gembloux, pour leur aide précieuse dans la réalisation de ce travail.

## Bibliographie

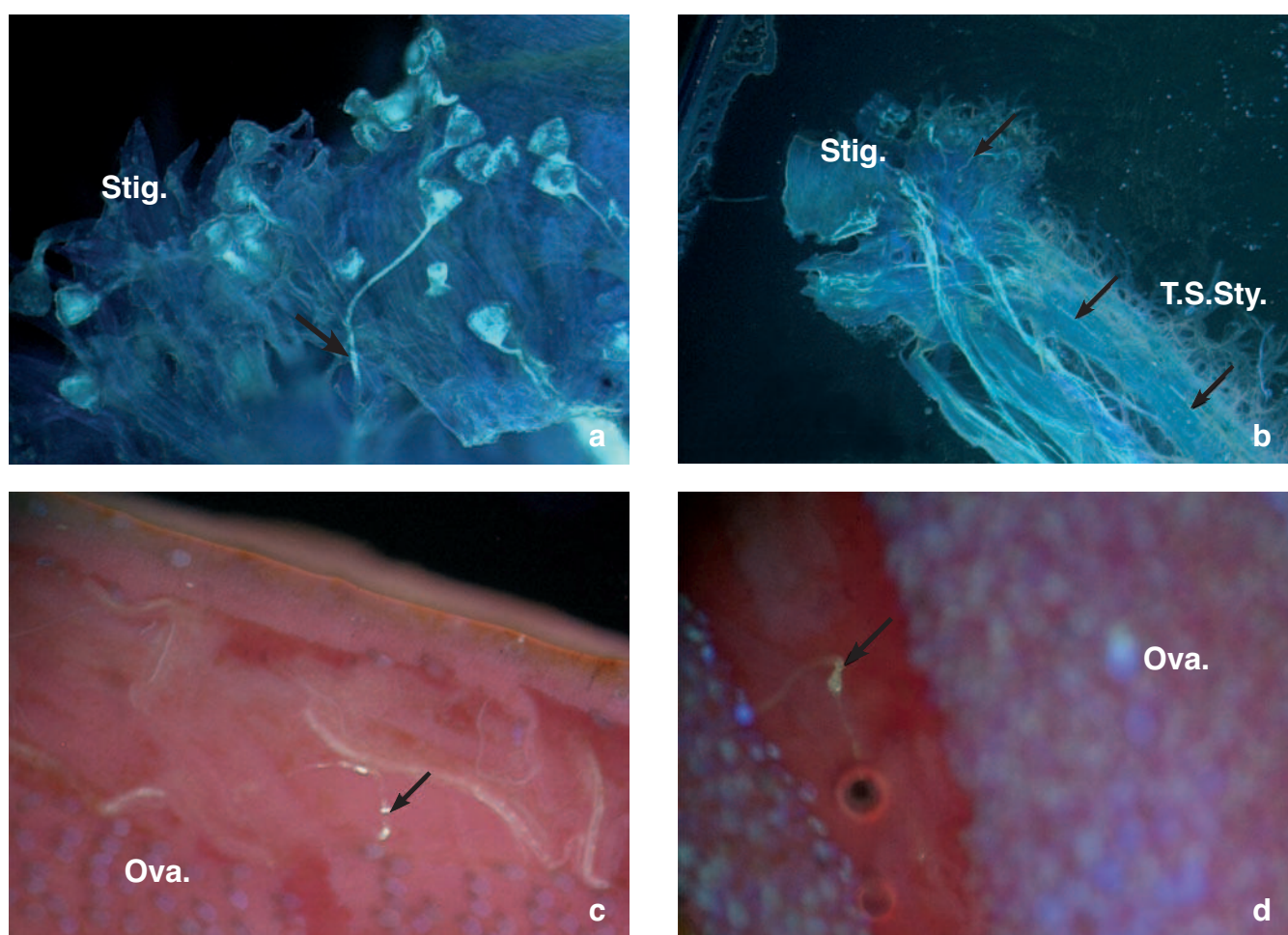
- Alexander MP. (1980). A versatile stain for pollen, fungi yeast and bacteria. *Stain techn.* **55**, p. 13–18.
- Ahn CS., Hartmann RW. (1978). Interspecific hybridization between mung bean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) and adzuki bean (*V. Angularis* (Wild) Ohwi and Ohashi). *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **103**, p. 3–6.
- Barone A., Del Guidice, Ng NQ. (1992). Barriers to interspecific hybridisation between *Vigna unguiculata* and *V. vexillata*. *Sex. Plant Reprod.* **5**, p. 195–200.
- Baudoin JP., Maréchal (1991). Taxonomy and wide crosses of pulse crops. In: Ng NQ., Perrino P., Attère F., Zedan H. *Crop Genet. Resour. of Africa*, vol. II, Conf. organized by IITA, CNR, IBPGR and UNEP. Ibadan, Nigeria, 17-20 oct. 1988. p. 287–302.
- Biswas MR., Dana S. (1976). *Phaseolus aconitifolia* x *P. trilobata* cross. *Indian J. Genet.* **36**, p. 125–131.
- Chen NC., Baker LR., Honma S. (1983). Interspecific crossability among four species of *Vigna* food legumes. *Euphytica* **32**, p. 925–937.
- Chowdhury RK., Chowdhury JB. (1983). Compatibility between *Vigna radiata* (L.) Wilczek and *V. umbellata*. *Genet. Agrar.* **37**, p. 257–266.
- Dumas C., Knox RB. (1983). Callose and determination of pistil viability and incompatibility. *Theor. Appl. Genet.* **67**, p. 1–10.
- Echikh N. (2000). *Organisation du pool génique de formes sauvages et cultivées d'une légumineuse alimentaire, Vigna unguiculata* (L.) Walp. Thèse de doctorat, Fac. Univ. Sci. Agron. Gembloux, Belgique, 307 p.
- Eschrich W., Currier HB. (1964). Identification of callose by its diachrome and fluorochrome reaction. *Stain Techn.* **39** (5), p. 303–308.
- Fatokun CA. (1991). Wide hybridization in cowpea: problems and prospects. *Euphytica* **54**, p. 137–140.
- Fatokun CA., Singh BB. (1987). Interspecific hybridization between *Vigna pubescens* and *V. unguiculata* (L.) Walp. through embryo rescue. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **9** (3), p. 229–233.
- Lukoki L., Maréchal R. (1981). Hybridations interspécifiques entre *Vigna radiata* (L.) Wilczek et *Vigna mungo* (L.) Hepper. *Bull. Rech. Agron. Gembloux* **16** (3), p. 233–248.
- Maréchal R., Mascherpa J-M. & Stainer F. (1978). Etude taxonomique d'un groupe d'espèces des genres *Phaseolus* et *Vigna* (*Papilionaceae*) sur la base de données morphologiques et polliniques traités par l'analyse informatique. *Boissiera* **28**, p. 10–231.
- Pasquet RS. (1994). *Organisation génétique et évolutive des formes spontanées et cultivées du niébé, Vigna unguiculata* (L.) Walp. *Biosystématique et processus de domestication*. Thèse de doctorat, Paris Grignon, Institut National Agronomique Paris-Grignon-ORSTOM, 284 p.
- Pasquet RS. (1996). Wild cowpea (*Vigna unguiculata*) evolution. In Pickersgill B., Lock JM. (eds). *Advances in legumes systematics 8 : Legumes of Economic Importance*, p. 95–100. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Pasquet RS. (1997). A new subspecies of *Vigna unguiculata* (*Leguminosae : Papilionoideae*). *Kew Bull.* **52**, p. 840.
- Pasquet RS. (1999). Genetic relationship among subspecies of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. Based on allozyme variation. *Theor. Appl. Genet.* **98**, p. 1104–1119.
- Pasquet RS., Baudoin JP. (1997). Le niébé, *Vigna unguiculata*. In Charrier A., Jacquot M., Hamon S., Nicolas D. (éd). *L'amélioration des plantes tropicales*. Montpellier, France : CIRAD-ORSTOM, p. 483–505.
- Sangduen N., Sorensen EL., Liang GH. (1983). Pollen germination and pollen tube growth following self-pollination and intra- and interspecific pollination of *Medicago* species. *Euphytica* **32**, p. 527–534.
- Socias RC., Alonso JM. (2004). Cross-incompatibility of 'ferragnès' and 'ferralise' and pollination efficiency for self-compatibility transmission in almond. *Euphytica* **135**, p. 333–338.

Suy TB. (1979). Observation par fluorescence de la croissance du gamétophyte mâle chez *Phaseolus lunatus* L. et chez un hybride interspécifique. *Bull. Rech. Agron. Gembloux* **14** (1), p. 97–108.

Weilenmann de Tau E., Mathieu A., Maréchal R., Baudoin JP. (1987). Observation par fluorescence de la croissance du gamétophyte mâle chez des allotétraploïdes

d'un hybride interspécifique entre *Phaseolus vulgaris* L. et *Phaseolus filiformis* Benth. *Bull. Rech. Agron. Gembloux* **22** (2), p. 143–151.

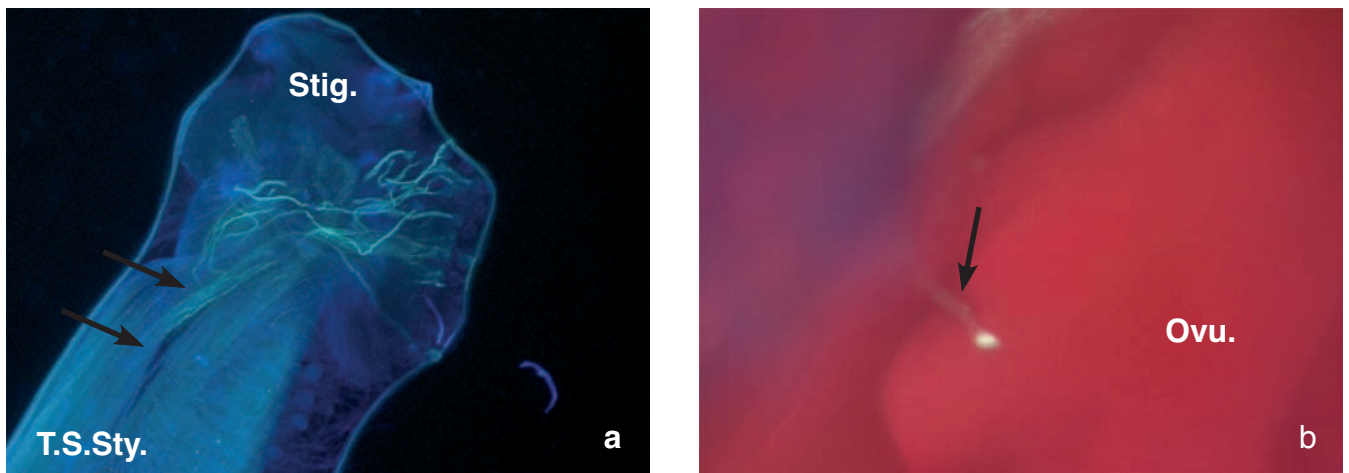
(23 réf.)



**Figure 2.** Germination du pollen sur le stigmate et croissance du tube pollinique dans le style et dans l'ovaire au cours des hybridations entre subsp. *baoulensis* NI 933 et var. *spontanea* NI 945 — *Germination of pollen on the stigma and growth of the pollen tube in the style and the ovary during hybridizations between subsp. baoulensis NI 933 and var. spontanea NI 945.*

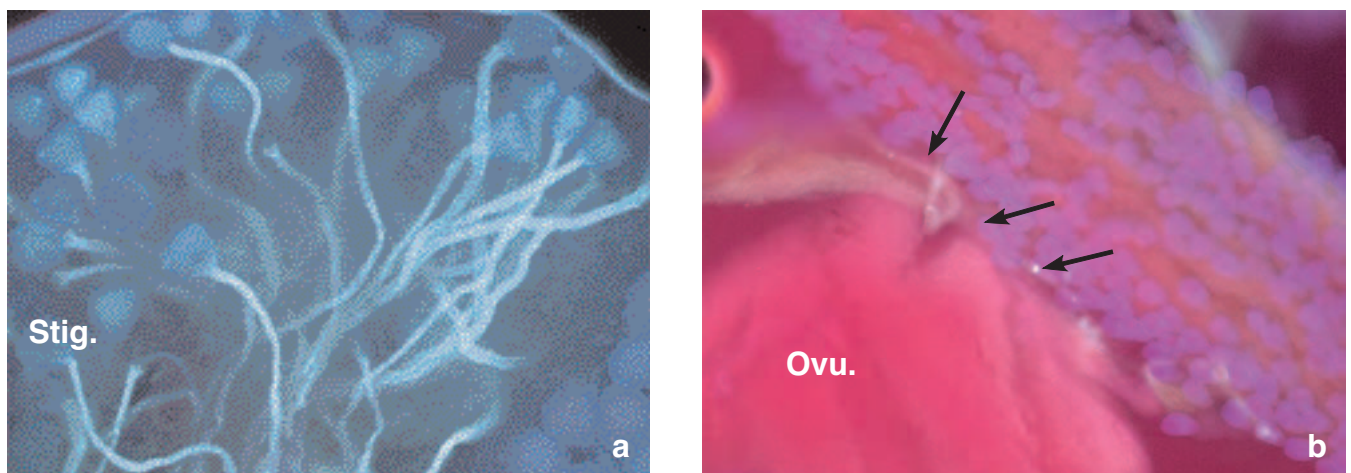
a : bonne germination du pollen sur le stigmate (Stig.) chez le croisement NI 933 ♀ × NI 945 (100 ×) — *good germination of pollen on the stigma (Stig.) in the crossing NI 933 × NI 945 (100 ×)* ; b : croissance du tube pollinique dans le tiers supérieur du style (T.S. Sty.) chez le croisement NI 933 ♀ × NI 945 (20 ×) — *pollen tube growth in the third higher of the style (T.S. Sty.) in the crossing NI 933 × NI 945 (20 ×)* ; c : trajectoire sinueuse d'un tube pollinique à croissance interrompue dans l'ovaire (Ova.) et présence de bouchon callosique très fluorescent chez des croisements NI 933 ♀ × NI 945 (200 ×) — *sinuous trajectory of a pollen tube with growth stopped in the ovary (Ova.) and presence of very fluorescent callosic in crossing NI 933 × NI 945 (200 ×)* ; d : croissance interrompue du tube pollinique dont l'extrémité se termine par une boursouffure dans l'ovaire au cours du croisement NI 945 ♀ × NI 933 (200 ×) — *stopped growth of the pollen tube whose end with a blister in the ovary during the crossing NI 945 × NI 933 (200 ×).*





**Figure 3.** Germination du pollen sur le stigmate (Stig.) et croissance du tube pollinique dans l'ovaire chez les hybridations entre subsp. *baoulensis* NI 933 et la forme allo-autogame subsp. *alba* — *Germination of pollen on the stigma (Stig.) and growth of the pollen tube in the ovary in hybridizations between subsp. baoulensis NI 933 and the out-inbred form subsp. alba.*

a : ralentissement de la croissance du tube pollinique dans le tiers supérieur du style (T.S.Sty.) au cours des croisements NI 933 ♀ × NI 1388 (100 ×) — *pollen tube growth slowly in the higher third of the style (T.S.Sty.) during crossing NI 933 ♀ × NI 1388 (100 ×)* ; b : entrée du tube pollinique au niveau du micropyle de l'ovule (Ovu.) au cours des croisements NI 933 ♀ × NI 1388 (200 ×) — *entry of the pollen tube in the micropyle of the ovule (Ovu.) during crossing NI 933 ♀ × NI 1388 (200 ×).*



**Figure 4.** Germination du pollen sur le stigmate (Stig.) et croissance du tube pollinique dans l'ovaire chez des hybridations entre, d'une part NI 933 et NI 456 de la subsp. *burundiensis* et, d'autre part, NI 933 et NI 993 de la subsp. *baoulensis* — *Germination of pollen on the stigma (Stig.) and growth of the pollen tube in the ovary in hybridizations between, on the one hand NI 933 and NI 456 of the subsp. burundiensis and, on the other hand, NI 933 and NI 993 of the subsp. baoulensis.*

a : bonne germination du pollen sur le stigmate chez les croisements NI 456 ♀ × NI 933 (200 ×) — *good germination of pollen on the stigma in the crossing NI 456 ♀ × NI 933 (200 ×)* ; b : présence d'un tube pollinique à l'entrée de l'ovule (Ovu.) et poursuite de la croissance d'un autre vers un deuxième ovule chez les croisements NI 933 ♀ × NI 993 (200 ×) — *presence of a pollen tube at the entry of the ovule (Ovu.) and growing of another towards a second ovule in the crossing NI 933 ♀ × NI 993 (200 ×).*