

# Mise au point d'une technique de culture *in vitro* d'embryons immatures de *Phaseolus*

Guy Mergeai <sup>(1)</sup>, Véronique Schmit <sup>(2)</sup>, Béatrice Lecomte <sup>(1)</sup>, Jean-Pierre Baudoin <sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> Unité de Phytotechnie des Régions intertropicales. Faculté universitaire des Sciences agronomiques de Gembloux. Passage des Déportés, 2. B-5030 Gembloux (Belgique). <sup>(2)</sup> Upland Rice Programme. International Rice Research Institute. P.O. Box 933, 1099 Manila (Philippines).

Reçu le 10 octobre 1995, accepté le 7 mars 1996.

Lors des croisements *Phaseolus polyanthus* (ou *P. coccineus*) (♀) × *P. vulgaris*, l'avortement des embryons hybrides se manifeste généralement dès les stades globulaires et cordiformes jeunes. La culture *in vitro* des proembryons est indispensable pour surmonter les barrières d'incompatibilité qui s'opposent à la réalisation de ces croisements. À l'issue de plusieurs essais portant sur la composition minérale, la teneur en sucre et la concentration en acides aminés de différents milieux de culture *in vitro*, une technique de sauvetage d'embryons cordiformes jeunes de *Phaseolus* a été mise au point. Ce protocole comporte deux étapes. Dans une première phase, les embryons sont mis en culture à l'obscurité sur un milieu favorable à leur maturation et à leur germination. Ce premier milieu de culture comprend les sels minéraux de Gamborg *et al.* (1968), 400 mg · l<sup>-1</sup> (5mM · l<sup>-1</sup>) de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 1 mg · l<sup>-1</sup> de thiamine HCl, 5 mg · l<sup>-1</sup> d'acide nicotinique, 0,5 mg · l<sup>-1</sup> de pyridoxine, 1 000 mg · l<sup>-1</sup> de L-glutamine, 1 000 mg · l<sup>-1</sup> d'hydrolysate de caséine, 100 mg · l<sup>-1</sup> de myo-inositol, 0,028 mg · l<sup>-1</sup> de N6-benzyladénine, 30 g · l<sup>-1</sup> de saccharose et 8 g · l<sup>-1</sup> d'agar DIFCO. Les embryons qui germent au terme de cette première phase sont ensuite mis en culture à la lumière dans un milieu de repiquage dont la composition diffère du milieu initial par l'absence d'un complément de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> aux sels de Gamborg et par une moins forte concentration en acides aminés (100 mg · l<sup>-1</sup> de L-glutamine). Mis au point à partir d'embryons obtenus par autofécondation de la variété Bico de Ouro de *P. vulgaris* (NI 637), cette technique s'est avérée efficace pour assurer la production de plantes adultes à partir d'embryons cordiformes jeunes provenant d'autres génotypes de *P. vulgaris* et *P. polyanthus*. Tous génotypes confondus, le pourcentage de régénération obtenu atteint 30 % de l'effectif total des embryons cordiformes jeunes mis en culture.

**Mots-clés.** Culture de tissus, embryoculture, hybridation interspécifique, *Phaseolus*.

**Development of an *in vitro* culture technique for immature *Phaseolus* embryos.** In the interspecific crosses *Phaseolus polyanthus* (or *P. coccineus*) (♀) × *P. vulgaris*, the hybrid embryos abort very early. Therefore, it is essential to develop an *in vitro* culture technique that allows the rescue of bean embryos at globular or early heart-shaped stages. After several trials concerning the salts composition, the sugar rate and the amino acid concentration of different *in vitro* culture media, a technique has been developed for heart-shaped *Phaseolus* embryos. This technique consists of two stages. In a first step, embryos are cultivated under darkness until their germination on a medium containing the salts of Gamborg *et al.* (1968), 400 mg · l<sup>-1</sup> (5mM · l<sup>-1</sup>) NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 1 mg · l<sup>-1</sup> thiamine HCl, 5 mg · l<sup>-1</sup> nicotinic acid, 0.5 mg · l<sup>-1</sup> pyridoxine, 1,000 mg · l<sup>-1</sup> L-glutamine, 1,000 mg · l<sup>-1</sup> casein hydrolysate, 100 mg · l<sup>-1</sup> myo-inositol, 0.028 mg · l<sup>-1</sup> N6-benzyladenine, 30 g · l<sup>-1</sup> sucrose, and 8 g · l<sup>-1</sup> DIFCO agar. After germination, the embryos are cultivated under light on a second medium that does not contain any NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> complement and is poorer in amino acids (100 mg · l<sup>-1</sup> L-glutamine). Developed with six days old heart-shaped embryos of the *P. vulgaris* Bico de Ouro (NI 637) variety, this technique has proved its efficiency with other *P. vulgaris* and *P. polyanthus* genotypes. It allows an average regeneration rate of 30% from the total number of cultivated embryos.

**Keywords.** Tissue culture, embryoculture, interspecific hybrids, *Phaseolus*.

## INTRODUCTION

La réalisation d'hybrides interspécifiques dans le genre *Phaseolus* exige fréquemment le recours au sauvetage d'embryons (*embryo rescue*). En effet, si l'obtention de zygotes est généralement observée chez tous les croisements interspécifiques impliquant des espèces de haricot, on assiste pour plusieurs d'entre eux à une dégénérescence rapide des embryons hybrides. Cet avortement précoce est généralement dû à un mauvais développement de l'albu-

men ; il se produit d'autant plus tôt que la distance génique entre les espèces croisées est grande.

Jusqu'à présent, les techniques de culture *in vitro* mises en oeuvre pour le sauvetage d'embryons hybrides de *Phaseolus* ont permis de régénérer des plantes à partir d'embryons bien différenciés, c'est-à-dire ayant atteint les stades cordiformes tardifs ou cotylédonnaires (Braak, Kooistra, 1975 ; Mok *et al.*, 1978 ; Alvarez *et al.*, 1981 ; Belivanis, Doree, 1986 ; Weilenmann *et al.*, 1986 ; Camarena, Baudoin, 1987 ; Kuboyama *et al.*, 1991).

Cependant, pour certains croisements, l'avortement des embryons survient à des stades de développement moins avancés : cordiforme jeune ou globulaire (Alvarez *et al.*, 1981). C'est notamment le cas chez les hybrides interspécifiques utilisant *Phaseolus coccineus* ou *Phaseolus polyanthus* comme parent femelle et *Phaseolus vulgaris* comme parent mâle (Baudoin *et al.*, 1992). La réussite de ces croisements très intéressants pour l'amélioration du haricot commun nécessite la mise au point d'une méthode de culture *in vitro* adaptée aux embryons de *Phaseolus* les moins développés.

En général, plus les embryons sont petits plus ils sont sensibles à la composition du milieu de culture. Il est donc indispensable d'optimiser les composantes de ce milieu pour favoriser leur croissance et leur développement *in vitro*. Les principaux facteurs à considérer dans ce cadre sont : la composition minérale du milieu, sa teneur en sucre, en acides aminés et en régulateurs de croissance. En général, deux milieux de culture successifs sont utilisés pour obtenir la régénération de plantes adultes. Le premier permet une certaine maturation des embryons et le second est favorable au développement des plantules après germination.

La présente publication expose les résultats des recherches que nous avons menées dans le but de mettre au point une technique de régénération des embryons cordiformes jeunes de *Phaseolus*. Partant d'une version légèrement modifiée du milieu utilisé par Rabakoarihanta *et al.* (1980) pour la culture d'embryons hybrides de *Phaseolus*, nous avons réalisé plusieurs essais portant sur la composition minérale, la teneur en sucre et la concentration en acides aminés de deux milieux de culture *in vitro* utilisés successivement pour la régénération de plantes adultes.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### Conditions de culture des plantes donneuses

Pour la mise au point d'une technique performante de culture *in vitro* d'embryons cordiformes jeunes, nous avons utilisé dans un premier temps l'introduction NI 637 (variété Bico de Ouro) de l'espèce *Phaseolus vulgaris* provenant de la banque de *Phaseolineae* de la Faculté universitaire des Sciences agronomiques de Gembloux. Une fois la technique de culture éprouvée, elle a été appliquée à la culture d'embryons de quatre autres introductions de *P. vulgaris*, ainsi qu'à cinq introductions de l'espèce *P. polyanthus* (Tableau 1).

Les génotypes de *P. vulgaris* ont été cultivés dans une chambre de culture conditionnée dont les caractéristiques climatiques étaient les suivantes : une température jour/nuit de 24°C/20°C, une humidité relative de 60 à 70 %, une photopériode de 11 h 30, et une intensité lumineuse de 160 W · m<sup>-2</sup> (mesure effectuée au niveau du sommet des plantes). Les génotypes de *P. polyanthus* ont été cultivés

dans une serre munie d'une couverture plastique du type Richel et équipée d'un mécanisme de conditionnement de l'air permettant d'obtenir des températures moyennes diurnes et nocturnes respectives d'environ 24 et 20°C en été, et 21 et 17°C en hiver. L'humidité relative de l'air est en moyenne de 80 % en hiver et de 50 % en été. Un éclairage d'appoint est fourni par des lampes HPL 400 W à vapeur de mercure fonctionnant 12 h par jour entre l'équinoxe d'automne et l'équinoxe du printemps. Les plantes mères, dans la serre et dans la chambre conditionnée, ont été cultivées dans un substrat composé de terreau, de tourbe et de sable en proportions égales.

Les essais de culture *in vitro* ont été réalisés avec des embryons se trouvant au stade cordiforme. Selon les génotypes, ce matériel a été extrait de gousses âgées de 5 à 7 jours pour *P. vulgaris* et de 9 à 11 jours pour *P. polyanthus*. Avant d'entamer tout travail de dissection, la position des embryons cordiformes dans l'ovule a été déterminée par observation au stéréo-microscope de coupes minces réalisées sur des gousses de haricot prélevées toutes les 24 h après la fécondation.

### Techniques de culture *in vitro* des embryons

Toutes les manipulations relatives à l'extraction et la culture *in vitro* des embryons sont réalisées en conditions stériles dans une hotte à flux laminaire. Après stérilisation des gousses (1 min dans l'éthanol à 70 %, 5 min dans une solution d'hypochlorite de sodium à 1,5 % et 3 rinçages successifs à l'eau distillée stérile), les embryons sont mis en culture en utilisant une technique basée sur les travaux de Monnier (1976). Chaque ovule excisé est placé au fond d'une boîte de Pétri dans une goutte d'eau stérile contenant 120 g · l<sup>-1</sup> de saccharose et 1,75 g · l<sup>-1</sup> d'agar DIFCO (Bitek). L'excision de l'embryon s'effectue dans cette goutte, sous binoculaire, en utilisant deux aiguilles montées. Une fois excisé de l'ovule, l'embryon est aspiré en même temps qu'un peu de liquide d'extraction en utilisant une pipette Pasteur à pointe effilée ; il est ensuite propulsé avec le liquide qui l'accompagne à la surface d'un milieu de culture gélosé contenu dans une boîte de Pétri de 90 mm de diamètre. La stérilisation de tous les milieux de culture est réalisée par autoclavage à 120°C pendant 20 minutes. Chaque boîte de Pétri est scellée par un film de Reynolon et contient huit embryons qui sont maintenus à l'obscurité sous une température continue de 26°C pendant 10 jours. Après ce délai, les embryons qui présentent un bourgeon terminal et des primordia foliaires entre les cotylédons sont repiqués dans des tubes en verre contenant un milieu destiné à favoriser le développement des systèmes racinaire et aérien. Chaque tube (150 × 25 mm) contient 10 ml du milieu de repiquage et est hermétiquement fermé au moyen d'un film de Reynolon. La culture se déroule sous une intensité lumineuse de 45 W · m<sup>-2</sup> et une température constante de 26°C. Lorsque les plantules développent

**Tableau 1.** Génotypes de *P. vulgaris* et *P. polyanthus* utilisés pour la culture *in vitro* des embryons — *Genotypes of P. vulgaris and P. polyanthus, used for in vitro embryo culture.*

Espèces	Numéro d'introduction (1)	Origine	Donneur	Pays du donneur	Numéro dans la collection du donneur
<i>P. vulgaris</i>	NI 637	Brésil (var. Bico de Ouro)	CIAT (2)	Colombie	603807
	X 1723	Colombie	CIAT (2)	Colombie	G 12582
	X 1756	Pérou	UNALM (3)	Pérou	Anc 182
	X 1751	Brésil (var. IPA 5)	CEBTEC (4)	Brésil	—
	X 1754	Brésil (var. Gordo)	CEBTEC (4)	Brésil	—
<i>P. polyanthus</i>	NI 1021	Colombie	B. Leroi	France	COL 8
	X 1118	Colombie	CIAT	Colombie	G 35337
	NI 519	Mexique	O.W. Norvell	USA	PI 201342
	NI 1024	Colombie	B. Leroi	France	COL 18
	X 1059	Mexique	inconnu	USA	G 35380

(1) Les sigles NI et X permettent de distinguer respectivement les numéros d'introduction définitifs et provisoires dans la banque de *Phaseolineae* de la Faculté universitaire des Sciences agronomiques de Gembloux. (2) Centro International de Agricultura Tropical, Cali (Colombie). (3) Universidad Nacional Agraria La Molina (Pérou). (4) Centro de Biotecnologia Agricola, Piracicaba (Brésil).

plusieurs racines secondaires et une première feuille trifoliolée, elles sont transplantées en Jiffy pots contenant un mélange de perlite, de sable et de terreau dans les proportions 1:1:1. Cette acclimatation est effectuée en salle de culture sous une température voisine de 24°C. Les explants sont maintenus à l'étouffée. L'humidité relative est réduite graduellement au cours de la reprise. L'apport de lumière (environ 13 W · m<sup>-2</sup>) est réalisé à l'aide de tubes de 40 W type Cool-Light. Un arrosage hebdomadaire avec une solution des sels minéraux de Murashige et Skoog (1962) diluée de moitié est effectué jusqu'à ce que le développement de la plantule soit suffisant pour autoriser son passage en serre.

### Déroulement des recherches

Les recherches réalisées ont porté sur la mise au point de deux milieux de culture *in vitro* adaptés aux exigences spécifiques des embryons depuis leur mise en culture jusqu'à leur germination et depuis leur germination jusqu'à leur acclimatation.

**Maturation et germination des embryons.** Partant des travaux réalisés par Mok *et al.* (1978) et par Rabakoarihanta *et al.* (1980) sur la culture *in vitro* d'embryons cordiformes de *Phaseolus*, nous avons tout d'abord étudié l'influence de la composition minérale et de la teneur en sucre du milieu sur la maturation et la germination des embryons. Au cours de cette première série d'essais, la composition en acides aminés, en vitamines et en régulateurs de croissance est restée constante pour tous les milieux testés. Cette composition était la suivante : L-glutamine (1 000 mg · l<sup>-1</sup>), hydrolysate de caséine (1 000 mg · l<sup>-1</sup>), thiamine HCl (1 mg · l<sup>-1</sup>), acide nicotinique (5 mg · l<sup>-1</sup>), pyridoxine (0,5 mg · l<sup>-1</sup>), myoinositol (100 mg · l<sup>-1</sup>) et N6-benzyladé-

nine (0,028 mg · l<sup>-1</sup>), avec une concentration en agar DIFCO de 8 g · l<sup>-1</sup>.

Les expérimentations relatives à l'influence de la teneur en sucre et de la composition minérale du milieu de culture se sont déroulées en deux étapes.

Dans une première étape, neuf milieux ont été testés. Huit de ces milieux avaient une composition constante au cours du temps tandis que la teneur en sucre et en éléments minéraux du dernier milieu était variable. Les milieux à composition constante contenaient les sels minéraux de Monnier (1976), de Gamborg *et al.* (1968), de Yeung et Sussex (1979) ou de Murashige et Skoog (1962). Pour chacune de ces compositions minérales, deux concentrations en saccharose (30 ou 120 g · l<sup>-1</sup>) ont été comparées. Le milieu à composition variable est celui conçu par Monnier (1976) pour l'embryoculture de *Capsella*. Il est obtenu par la juxtaposition dans une même boîte de Pétri de deux anneaux gélosés de compositions minérales et organiques différentes : l'anneau interne, où sont déposés les embryons, possède la pression osmotique la plus élevée. Au cours du temps, la pression osmotique de l'anneau interne diminue consécutivement aux échanges entre les milieux, favorisant ainsi la poursuite du développement embryonnaire.

Dans une deuxième étape, l'absence ou l'apport de diverses concentrations en NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (0 ; 2,5 ; 5 et 7,5 mM · l<sup>-1</sup>) ont été testés afin d'améliorer les performances du meilleur milieu de germination identifié au cours de la première phase d'essais.

Au cours de ces expérimentations, l'efficacité des milieux comparés a été évaluée après 10 jours d'incubation à l'obscurité en considérant les taux de survie et de germination des embryons. Les explants manifestant une croissance de leur axe principal supérieure à 100 µm ont été considérés comme survivants. Les embryons présentant

un allongement de leur radicule et une ébauche d'axe caulino-foliaire entre les cotylédons ont été considérés comme germés. Ce dernier critère est fondamental car tout le développement ultérieur de la plante est tributaire de l'apparition d'un bourgeon apical fonctionnel entre les cotylédons. L'influence exercée par la composition du milieu de maturation-germination sur le développement ultérieur des embryons germés a également été considérée.

Le meilleur milieu issu de cette première phase d'expérimentations a ensuite été évalué pour des embryons cordiformes provenant de quatre autres introductions de *P. vulgaris* et cinq introductions de l'espèce *P. polyanthus* (Tableau 1).

**Développement *in vitro* des embryons germés.** Les expérimentations relatives au développement *in vitro* des embryons germés ont porté sur la composition minérale, la teneur en sucre et la teneur en acides aminés du milieu.

Un premier essai a été réalisé avec les embryons ayant germé sur les milieux à haute teneur en saccharose (120 g · l<sup>-1</sup>) et sur le milieu de Monnier à composition variable des premières expérimentations relatives à la maturation et à la germination. Cet essai visait à évaluer l'influence du milieu d'origine sur le développement des plantules transférées en tube. Tous les embryons ont été transplantés sur un seul milieu de repiquage contenant les sels minéraux de Murashige et Skoog et 50 g · l<sup>-1</sup> de saccharose, les autres composants restant identiques à ceux du milieu de germination.

Un deuxième essai de repiquage a été réalisé à partir des embryons ayant germé sur les milieux contenant 30 g · l<sup>-1</sup> de saccharose des premières expérimentations sur la germination. Dans cet essai, les embryons ont été repiqués

sur des milieux dont la composition était identique à celle du milieu sur lequel ils avaient germé.

Les deux meilleurs milieux identifiés à l'issue des expérimentations précédentes ont été comparés en diminuant leur teneur en acides aminés à 100 mg · l<sup>-1</sup> de L-glutamine (au lieu de 1 000 mg · l<sup>-1</sup> de L-glutamine et 1 000 mg · l<sup>-1</sup> d'hydrolysate de caséine).

Enfin, ces deux milieux ont été testés avec les embryons des cinq génotypes de *P. polyanthus*. Au cours de ce dernier essai, la teneur en acides aminés a été réduite de 1 000 mg · l<sup>-1</sup> à 100 mg · l<sup>-1</sup> pour la L-glutamine et l'hydrolysate de caséine. Pour tous ces essais, l'évaluation de l'efficacité des milieux de repiquage a été basée sur l'apparition de racines secondaires et de feuilles trifoliolées en tube de culture ainsi que sur le nombre de plantules acclimatées (phase suivante).

### Traitement statistique des données

La méthode retenue pour le traitement statistique des données est le test  $\chi^2$  d'indépendance de proportions (Dagnelie, 1975).

## RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

### Maturation et germination des embryons

**Essai préliminaire sur NI 637.** Comme le montrent les résultats repris au tableau 2, la composition minérale et la teneur en saccharose du milieu de culture influencent fortement la survie et la germination des embryons de NI 637 prélevés au stade cordiforme jeune. À l'exception des milieux contenant les sels de Gamborg *et al.* ou de Mura-

**Tableau 2.** Survie et croissance des embryons de *Phaseolus vulgaris* NI 637 (var. Bico de Ouro), cultivés sur les différents milieux de germination — *Survival and growth of the cultivated embryos of NI 637 on different germination media.*

Milieux testés		Nombre d'embryons cultivés	Embryons survivants		Embryons germés	
Composition minérale	Teneur en saccharose (g · l <sup>-1</sup> )		Nombre	%	Nombre	%
Monnier	30	48	44	92	31	65
	120	59	57	97	24	41
Gamborg <i>et al.</i>	30	54	48	89	23	43
	120	60	43	72	24	40
Yeung et Sussex	30	52	46	88	32	61
	120	44	40	91	20	45
Murashige et Skoog	30	50	45	90	30	60
	120	47	40	85	20	42
Monnier var.	180/0	59	58	98	34	58
$\chi^2_{\text{obs}}$			132,8 (1)		123,8 (1)	

(1) Rejet de l'hypothèse d'indépendance au niveau de probabilité P = 0,999.

shige et Skoog et  $120 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  de saccharose, tous les milieux à composition constante ont présenté un pourcentage de survie proche de 90 %. Le dispositif de Monnier à composition variable a donné d'excellents résultats tant pour la survie (98 %) que pour la germination (58 %) des embryons cultivés. Pour les milieux à composition constante, le pourcentage de germination des embryons est plus influencé par la concentration en sucre que par la composition minérale du milieu. Pour une même concentration en saccharose, les pourcentages obtenus pour la germination des embryons mis en culture sont restés à peu près constants quelle que soit la composition minérale du milieu de culture. Ces taux de germination sont de l'ordre de 40 % sur les milieux contenant  $120 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  de saccharose et, à l'exception du milieu contenant les sels minéraux de Gamborg *et al.*, de 60 % sur ceux ne comportant que  $30 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  de saccharose. Ces données confirment l'effet défavorable qu'exerce habituellement le maintien d'une trop forte pression osmotique, sur la germination des embryons cultivés *in vitro* (Monnier, 1976 ; Stewart, Hsu, 1977 ; Raghavan, 1980). Pour les milieux les plus riches en sucre, l'augmentation de pression osmotique masque complètement l'influence des composants minéraux de chaque milieu comparé.

L'effet exercé sur la germination par le milieu contenant les sels de Gamborg *et al.* et du saccharose à la concentration de  $30 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  pourrait être lié à sa faible teneur en ions  $\text{NH}_4^+$ . Cette teneur est en effet cinq à quinze fois moins élevée que chez les autres milieux testés. Les différences sont beaucoup moins importantes pour les autres ions des milieux comparés : les plus grandes variations observées dépassent rarement les 100 %. Cette hypothèse concorde avec les résultats des travaux réalisés par de nombreux auteurs (Ammirato, Stewart, 1971 ; Stewart, Hsu, 1977 ; Han, Stephen, 1992) sur l'importance du rôle joué par l'azote réduit dans le développement et la germination des embryons immatures cultivés *in vitro*.

La prise en compte des résultats obtenus pour le développement des embryons germés lors des essais de repiquage (voir deuxième essai de repiquage) nous a amené à retenir le milieu contenant les sels de Gamborg *et al.* et  $30 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  de saccharose pour la suite de nos expérimentations.

**Teneur en ion  $\text{NH}_4^+$  et germination des embryons.** Le **tableau 3** donne les résultats obtenus pour la survie et la germination d'embryons mis en culture sur des milieux contenant les sels minéraux de Gamborg *et al.*,  $30 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  de saccharose et des doses croissantes de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (0 ; 2,5 ; 5 et  $7,5 \text{ mM} \cdot \text{l}^{-1}$ ).

Le meilleur pourcentage de germination est obtenu avec l'addition de  $5 \text{ mM} \cdot \text{l}^{-1}$  de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . En deçà et au delà de cette quantité, on constate une diminution importante du pourcentage de germination. Pour l'adjonction de  $7,5 \text{ mM} \cdot \text{l}^{-1}$  de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , la baisse du taux de germination s'accom-

pagne aussi d'une diminution sensible du pourcentage de survie des embryons. Ces données confirment le rôle fondamental joué par l'ion  $\text{NH}_4^+$  dans la maturation et la germination des embryons immatures. Le pourcentage d'embryons germés obtenu avec l'addition de  $5 \text{ mM} \cdot \text{l}^{-1}$  de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  aux sels de Gamborg *et al.* est similaire à celui obtenu, lors de l'essai précédent (**Tableau 2**), avec la composition minérale de Monnier. Étant donné l'impact négatif des sels de Monnier sur la croissance et le développement des plantules transférées en tube (voir résultats des essais de repiquage), la composition minérale de Gamborg *et al.* additionnée de  $5 \text{ mM} \cdot \text{l}^{-1}$  de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  paraît la plus efficace parmi l'ensemble des milieux testés pour favoriser la maturation et la germination des embryons cordiformes jeunes de haricot.

**Essais avec d'autres génotypes de *P. vulgaris* et de *P. polyanthus*.** Le **tableau 4** reprend les résultats obtenus pour la culture d'embryons cordiformes jeunes de génotypes différents de *P. vulgaris* et *P. polyanthus* en utilisant le milieu de germination le plus performant pour NI 637 : c'est-à-dire le milieu contenant, outre les vitamines et les régulateurs de croissance habituels, les sels minéraux de Gamborg *et al.*,  $5 \text{ mM} \cdot \text{l}^{-1}$  de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  et  $30 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  de saccharose.

Les résultats sont encourageants : en effet, les pourcentages moyens de germination des embryons cordiformes jeunes mis en culture sur ce milieu sont respectivement de 57 % pour *P. vulgaris* et de 73 % pour *P. polyanthus*.

### Développement racinaire et aérien des plantules issues de la germination des embryons immatures

**Premier essai de repiquage.** Au cours de cet essai, tous les embryons ayant germé sur les milieux les plus riches en sucre ( $120 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ) et sur le milieu de Monnier à composition variable du premier essai de germination (**Tableau 2**) ont été repiqués dans un milieu contenant les sels minéraux de Murashige et Skoog et  $50 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  de saccharose, tous les autres composants restant identiques à ceux du milieu de germination.

Sur un total de 122 embryons germés transférés en tube, aucune plantule n'a atteint un développement suffisant pour être acclimatée. En fonction du milieu de germination dont ils provenaient, ces explants ont manifesté deux comportements distincts.

- Les embryons issus des quatre milieux à composition constante n'ont pratiquement pas développé de système racinaire. Dans la majorité des cas, l'axe hypocotylédonnaire s'allonge vers le sommet du tube tandis que l'extrémité de l'axe en contact avec le milieu noircit. Aucune racine secondaire ne se développe sur les quelques racines principales formées parmi l'ensemble des plantules.
- Les embryons issus du dispositif de Monnier assurant un milieu à composition variable ont manifesté un bon

**Tableau 3.** Influence de l'addition de quantités croissantes de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  à un milieu contenant les sels de Gamborg *et al.* et  $30 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  de saccharose sur la croissance et le développement d'embryons cordiformes jeunes de NI 637 (*P. vulgaris*) — Influence of the addition of rising quantities of  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  to a medium containing the minerals of Gamborg *et al.* and  $30 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  sucrose, on the growth and the development of early heart-shaped embryos of NI 637 (*P. vulgaris*).

Quantité de $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ajoutée aux sel de Gamborg <i>et al.</i> ( $\text{mM} \cdot \text{l}^{-1}$ )	Nombre d'embryons mis en culture	Embryons survivants		Embryons germés	
		Nombre	%	Nombre	%
0	68	58	85	36	53
2,5	64	52	81	36	56
5	66	53	80	43	65
7,5	66	49	74	33	50
$\chi^2_{\text{obs}}$			2,64		3,46

développement racinaire. Près de 60 % des plantules transférées en tube ont développé plusieurs racines secondaires. La partie aérienne de ces explants ne s'est, par contre, pas développée normalement. Les feuilles sont restées petites, rondes et recroquevillées tandis que les tiges avaient un aspect vitreux, parfois translucide.

L'abaissement progressif de la pression osmotique du milieu à composition variable favorise nettement le développement du système racinaire, comparativement aux résultats des milieux à composition constante. Par contre, tous les milieux testés, aussi bien au niveau de la germination qu'au niveau du repiquage, ne semblent pas influencer favorablement le développement de la partie aérienne des explants.

**Deuxième essai de repiquage.** Le tableau 5 reprend les résultats relatifs au développement racinaire et aérien des plantules mises en culture lors du deuxième essai de repiquage. Il donne également les taux de réussite enregistrés pour l'acclimatation de ces plantules. Pour chaque milieu testé, les pourcentages sont calculés par rapport au nombre d'embryons transférés en tube.

Ce tableau montre clairement que la composition minérale mise au point par Monnier pour la culture *in vitro* de très jeunes embryons de capselle ne convient pas pour le haricot. Dans ce cas, le transfert des embryons sur un milieu de repiquage de composition identique à celui du milieu de germination accentue l'atrophie des plantules (tiges et racines) et provoque une décoloration de la tige.

**Tableau 4.** Comportement des embryons cordiformes jeunes de divers géotypes de *P. vulgaris* et de *P. polyanthus* sur le milieu de germination mis au point pour NI 637 — Behaviour of heart-shaped embryos from several genotypes of *P. vulgaris* and *P. polyanthus* on the germination media developed with NI 637.

Espèces et géotypes	Nombre d'embryons mis en culture	Embryons survivants		Embryons germés	
		Nombre	%	Nombre	%
<i>P. vulgaris</i>					
NI 637	202	196	97	142	70
X 1723	215	199	93	139	65
X 1756	167	145	87	96	58
X 1751	280	272	97	111	40
X 1754	72	70	97	47	65
Totaux	936	882	94	535	57
<i>P. polyanthus</i>					
NI 519	79	74	94	50	63
NI 1024	65	63	97	46	71
X 1059	66	64	97	47	71
X 1118	68	65	96	55	81
NI 1021	71	70	98	57	80
Totaux	349	336	96	255	73

**Tableau 5.** Comportement des embryons lors du deuxième essai de repiquage — *Behaviour of the embryos during the second rooting trial.*

Combinaisons testées pour les milieux de germination – de repiquage Sels minéraux et concentration en saccharose ( $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ )	Nombre d'embryons repiqués	Plantules présentant au moins une feuille trifoliolée bien développée		Plantules présentant plusieurs racines secondaires		Plantules acclimatées	
		Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%
		Monnier (30) – Monnier (30)	31	0	0	2	6
Gamborg <i>et al.</i> (30) – Gamborg (30)	23	21	91	21	91	6	28
YS (30) – YS (30) (1)	32	4	12	16	50	0	0
MS (30) – MS (30) (2)	30	4	13	13	43	1	3
$\chi^2_{\text{obs}}$		69,1 (3)		38,9 (3)		n.c. (4)	

(1) Sels minéraux de Yeung et Sussex. (2) Sels minéraux de Murashige et Skoog. (3) Rejet de l'hypothèse d'indépendance des proportions au niveau de probabilité  $P = 0,999$ . (4) Non calculé car 2 fréquences attendues inférieures à 5.

Ces données sont à mettre en parallèle avec celles observées au cours du premier essai de repiquage ; au cours de celui-ci, aucun des embryons ayant germé sur des milieux contenant la formule minérale de Monnier (1976) ne s'est développé suffisamment après transfert en tube pour autoriser son acclimatation ultérieure.

L'action défavorable de la composition minérale de Monnier sur le développement des plantules de haricot cultivées *in vitro* pourrait s'expliquer par les trois raisons suivantes.

– Tout d'abord, cette formule minérale est particulièrement riche en ions  $\text{Cl}^-$ . Elle en contient dix fois plus que la formule minérale de Gamborg *et al.* et près de trois fois plus que celle de Murashige et Skoog. Cet excès de chlore pourrait être responsable d'une intoxication des jeunes plantules. Selon Breuer (1986), les haricots sont notoirement chlorophobes.

– La composition de Monnier contient également une concentration relativement élevée en ion  $\text{NH}_4^+$ , ion dont l'impact défavorable sur la croissance racinaire des légumineuses est connu (Robin, Salsac, 1987).

– De plus, la très haute concentration ionique globale de cette formule ne favorise certainement pas le développement racinaire des plantules.

Parmi l'ensemble des compositions minérales testées, il apparaît que le milieu le plus performant pour obtenir des plantes acclimatées à partir d'embryons cordiformes jeunes de haricot est celui qui contient les sels minéraux de Gamborg *et al.* et  $30 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  de saccharose. Grâce à cette formule, sur un total de 23 embryons germés transférés en tube, 21 se sont suffisamment développés pour justifier leur acclimatation et 6 plantes adultes ont finalement pu être obtenues.

Deux autres compositions minérales ont également permis un développement suffisant des plantules pour

tenter leur acclimatation, celle de Murashige et Skoog et celle de Yeung et Sussex. Cependant, si ces dernières compositions n'ont pas provoqué de perturbations de la croissance et du développement des plantules aussi fortes que celles causées par la composition minérale de Monnier, leur capacité à induire la régénération de plantules est restée nettement plus faible que celle observée avec les sels minéraux de Gamborg *et al.* Parmi les plantules cultivées sur ces milieux, une seule a pu être acclimatée avec succès ; elle provenait du milieu contenant la composition minérale de Murashige et Skoog.

**Troisième essai de repiquage.** Le deuxième essai de repiquage a confirmé le rôle néfaste pour le développement des plantules de haricot d'une trop haute concentration en azote sous forme réduite. Les très fortes teneurs en acides aminés présentes dans les milieux de culture testés lors de cet essai ont pu contribuer à exacerber cet effet. En conséquence, nous avons réalisé un troisième essai de repiquage en reprenant les deux meilleurs milieux, c'est-à-dire les compositions minérales de Gamborg *et al.* et Murashige et Skoog associées à une teneur en saccharose de  $30 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ , mais en réduisant les teneurs en acides aminés ( $100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  de L-glutamine au lieu de  $1\,000 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  de L-glutamine et  $1\,000 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  d'hydrolysate de caséine). Les autres composants restent identiques. Les embryons utilisés pour cet essai proviennent du cultivar NI 637 et ont été préalablement cultivés sur le milieu de germination préconisé à l'issue de la première phase d'expérimentation. Les résultats obtenus à l'issue de ce troisième essai de repiquage sont repris au **tableau 6**.

Les résultats montrent une nette amélioration du taux d'acclimatation des plantules cultivées sur les deux milieux testés. Un abaissement de la teneur en acides aminés du milieu de repiquage est donc bénéfique à la croissance et

**Tableau 6.** Comportement des embryons lors du troisième essai de repiquage — *Behaviour of the embryos during the third rooting trial.*

Composition minérale des milieux de repiquage testés	Nombre d'embryons repiqués	Plantules acclimatées	
		Nombre	%
Murashige et Skoog	69	26	38
Gamborg <i>et al.</i>	29	14	48
$\chi^2_{\text{obs}}$		0,95	

au développement des jeunes plantules cultivées *in vitro*. Cette baisse de la teneur en acides aminés entraîne une diminution des différences observées entre les deux milieux testés pour l'acclimatation des plantules. La composition minérale de Gamborg *et al.* (1968) reste cependant la plus favorable. La différence de concentration en ion  $\text{NH}_4^+$  entre les deux milieux comparés pourrait expliquer cette divergence de comportement.

**Quatrième essai de repiquage.** Un quatrième essai a été réalisé avec cinq génotypes différents de *P. polyanthus*. Les embryons ont germé sur le meilleur milieu de germination ; ensuite ils ont été repiqués sur deux milieux qui ne

diffèrent entre eux que par leur composition minérale. Le premier contient les sels minéraux de Gamborg *et al.* et le second ceux de Murashige et Skoog. Chacun des deux milieux comprend en outre  $100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  de L-glutamine,  $100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  d'hydrolysate de caséine,  $30 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  de saccharose et les mêmes concentrations en vitamines, régulateurs de croissance et agar que le milieu de germination. Les résultats obtenus pour ce quatrième essai de repiquage sont donnés au **tableau 7**.

Les tendances observées confirment les résultats des expérimentations précédentes. Globalement, la composition minérale de Gamborg *et al.* associée à une concentration en saccharose de  $30 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  est la plus favorable à la croissance et au développement des explants transférés sur le milieu de repiquage. À l'exception des embryons du génotype NI 519, environ une plantule sur deux peut être acclimatée avec succès après avoir été cultivée sur ce milieu. Ces résultats confirment également l'effet favorable d'une diminution de la teneur en acides aminés du milieu de repiquage.

Les résultats varient cependant suivant les génotypes utilisés. Ainsi, les génotypes NI 519 et X 1059 semblent moins sensibles aux différences de composition minérale existant entre les deux milieux testés : les pourcentages de plantules acclimatées sont fort semblables pour les deux génotypes. Le génotype NI 519 se distingue par les plus faibles pourcentages de plantules acclimatées (22 à 26 %).

**Tableau 7.** Comportement des embryons de *P. polyanthus* lors du quatrième essai de repiquage — *Behaviour of the P. polyanthus embryos during the fourth rooting trial.*

Génotype	Composition minérale du milieu de culture	Nombre d'embryons repiqués	Plantules présentant plusieurs racines secondaires ramifiées		$\chi^2_{\text{obs}}$	Plantules acclimatées		$\chi^2_{\text{obs}}$
			Nombre	%		Nombre	%	
NI 519	MS (1) Gamborg <i>et al.</i>	39	15	38	0,11	10	26	0,16
		50	21	42		11	22	
NI 1021	MS Gamborg <i>et al.</i>	96	57	59	5,41	42	44	2,53
		117	87	74		64	55	
NI 1024	MS Gamborg <i>et al.</i>	55	37	67	1,51	25	45	1,76
		46	36	78		27	59	
X 1059	MS Gamborg <i>et al.</i>	42	31	74	0,01	25	60	0,17
		47	35	74		30	64	
X 1118	MS Gamborg <i>et al.</i>	146	84	58	7,83	62	42	6,12 (2)
		142	104	73		81	57	
Total	MS Gamborg <i>et al.</i>	378	224	59	10,62 (4)	164	43	7,19 (3)
		402	283	70		213	53	

(1) Sels de Murashige et Skoog. (2) (3) (4) Rejet de l'hypothèse d'indépendance des proportions respectivement aux niveaux de probabilité  $P = 0,95$  ;  $P = 0,99$  ;  $P = 0,999$ .



## CONCLUSIONS

Les recherches réalisées à Gembloux dans le domaine de la culture *in vitro* d'embryons immatures de haricots se situent dans le cadre plus large de l'amélioration de *P. vulgaris* par hybridation interspécifique. Elles visent à permettre le sauvetage précoce d'embryons hybrides qui avortent habituellement dès les stades globulaire ou cordiforme jeune, notamment lors des croisements réalisés entre *P. polyanthus* (ou *P. coccineus*) utilisés comme parent femelle et *P. vulgaris*.

Après des travaux préliminaires visant à adapter au cas du haricot les techniques d'extraction et de mise en culture des très jeunes embryons immatures élaborées par Monnier (1976) pour la capselle, les expériences ont été conduites en deux étapes. Dans une première étape, elles ont porté sur la recherche de la composition minérale et de la teneur en sucre les plus favorables à la maturation et à la germination d'embryons cordiformes jeunes. Dans une seconde étape, elles ont concerné l'influence de la composition minérale, de la teneur en sucre et de la concentration en acides aminés sur la croissance et le développement de plantules issues de la germination d'embryons cordiformes jeunes.

Au terme des essais réalisés, nous avons montré qu'il est possible d'obtenir des plantes adultes à partir d'embryons cordiformes jeunes de haricot cultivé *in vitro*. Le pourcentage moyen de réussite est de 30 % de l'effectif total des embryons mis en culture.

Ces bons résultats reposent sur trois facteurs.

- La mise au point d'une technique d'extraction et de transfert efficace pour les embryons immatures de haricot. L'adaptation de la méthode proposée par Monnier (1976) pour la capselle a permis d'obtenir un taux de survie de 90 % pour l'ensemble des embryons mis en culture.

- La mise au point d'un milieu induisant en moyenne la maturation et la germination de 60 % des embryons cordiformes jeunes mis en culture (avec des valeurs extrêmes allant de 30 à 80 %). Outre la composition en acides aminés, en vitamines et en régulateurs de croissance préconisée par Mok *et al.* (1978) et Rabakoarihanta *et al.* (1980), ce milieu se compose des sels minéraux de Gamborg *et al.* (1968) additionnés de 5 mM · l<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> et de 30 g · l<sup>-1</sup> de saccharose. Cette composition est efficace pour différents génotypes de *P. vulgaris* et *P. polyanthus*.

- Le choix d'un milieu de repiquage des embryons germés se distinguant du milieu de maturation et de germination par l'absence d'un complément de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> aux sels de Gamborg *et al.* et par une forte diminution de la teneur en acides aminés.

Au cours de ces différents essais, nous avons montré qu'un transfert brutal d'un milieu de germination à forte pression osmotique vers un milieu de repiquage à pression osmotique nettement plus faible, était préjudiciable à la

croissance embryonnaire. De même, il est également apparu qu'une concentration ionique trop importante nuisait au développement du système racinaire et par voie de conséquence, au développement harmonieux de la partie aérienne.

Nos travaux confirment le rôle fondamental joué par l'ion NH<sub>4</sub><sup>+</sup> dans la maturation et la germination des embryons immatures. Ils corroborent les données existantes sur l'action négative qu'exerce cet élément sur le développement du système racinaire des haricots. Cet impact néfaste semble être exacerbé par une forte concentration du milieu en acides aminés.

D'autres essais sont en cours pour confirmer l'adéquation du milieu de germination à la régénération de plantes à partir d'embryons cordiformes jeunes provenant de divers génotypes et espèces de *P. vulgaris*, *P. polyanthus* et *P. coccineus*. Des expérimentations sont actuellement réalisées pour améliorer le pourcentage de régénération de plantes à partir d'embryons cordiformes jeunes et pour aboutir à la production de plantes au départ d'embryons globulaires.

## Remerciements

Ces travaux ont été réalisés dans le cadre du projet TS2-0028-B (GDF) "Amélioration génétique des légumineuses vivrières du genre *Phaseolus* pour les zones tropicales de basses et de hautes altitudes du Pérou et de Colombie", financé par la Commission des Communautés européennes.

## Bibliographie

- Alvarez HN, Asher PD, Davis DW (1981). Interspecific hybridization in *Euphaseolus* through embryo rescue. *HortScience* **16**, 541-543.
- Ammirato PV, Steward FC (1971). Some effects of the environment on the development of embryos from cultured free cells. *Bot. Gaz.* **132**, 149-158.
- Baudoin JP, Camarena FM, Schmit V (1992). Contribution à une meilleure connaissance de la position phylétique de la légumineuse alimentaire *Phaseolus polyanthus* Greenm. *Bull. Rech. Agron. Gembloux* **27**, 167-198.
- Belivannis T, Dore C (1986). Interspecific hybridization of *Phaseolus vulgaris* L. and *P. angustissimus* A. Gray using *in vitro* embryo culture. *Plant Cell Rep.* **5**, 329-331.
- Braak JP, Kooistra EK (1975). A successful cross between *Phaseolus vulgaris* L. and *Phaseolus ritensis* Jones with the aid of embryo culture. *Euphytica* **24**, 669-679.
- Breuer R (1985). Somatic embryogenesis in *Phaseolus vulgaris*. *Inst. Genet. Univ. Bonn. Phaseolus Inform. Exch.* **1**, 9-13.
- Camarena F, Baudoin JP (1987). Obtention des premiers hybrides interspécifiques entre *Phaseolus vulgaris* et *Phaseolus polyanthus* avec le cytoplasme de cette dernière forme. *Bull. Rech. Agron. Gembloux* **22**, 43-55.
- Dagnelie P (1975). "Théories et méthodes statistiques", vol. 2. Les Presses agronomiques de Gembloux, Belgique.

- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* **50**, 151–158.
- Han K, Stephen LC (1992). Carbohydrate and nitrogen sources affect respectively *in vitro* germination of immature ovules and early seedling growth of *Impatiens platypetala* Lindl. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **31**, 211–214.
- Kuboyama T, Shintaku Y, Takeda G (1991). Hybrid plant of *Phaseolus vulgaris* and *P. lunatus* L. obtained by means of embryo rescue and confirmed by restriction endonuclease analysis of rDNA. *Euphytica* **54**, 177–182.
- Mok DWS, Mok MC, Rabakoarihanta A (1978). Interspecific hybridization of *Phaseolus vulgaris* with *P. lunatus* and *P. acutifolius*. *Theor. Appl. Genet.* **52**, 209–215.
- Monnier M (1976). Culture *in vitro* de l'embryon immature de *Capsella bursa-pastoris* Moench. *Rev. Cyt. Végét.* **39**, 1–120.
- Murashige T, Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* **15**, 473–497.
- Rabakoarihanta A, Shii CT, Mok MC, Mok DWS (1980). Meiosis and fertility of interspecific hybrids between *Phaseolus vulgaris* L. and *Phaseolus acutifolius* A. Gray. *Theor. Appl. Genet.* **57**, 59–64.
- Raghavan V (1980). Embryo culture. *Int. Rev. Cytol.* (suppl. 11B), 209–240.
- Robin P, Salsac L (1987). Interaction entre approches biochimiques et approches agronomiques de la nutrition azotée. In "Nutrition azotée des légumineuses, Versailles, 19–21 nov. 1985" (P. Guy, ed.), pp. 79–99. Les colloques no. 37, INRA, Paris.
- Stewart JMcD, Hsu CL (1977). *In-ovulo* embryo culture and seedling development of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Planta* **137**, 113–117.
- Weilenmann de Tau E, Baudoin JP, Maréchal R (1986). Obtention d'allopolypléïdes fertiles chez le croisement entre *Phaseolus vulgaris* et *Phaseolus filiformis*. *Bull. Rech. Agron. Gembloux* **21**, 35–46.
- Yeung EC, Sussex IM (1979). Embryogeny of *Phaseolus*: the suspensor and the growth of the embryo-proper *in vitro*. *Z. Pflanzenphysiol.* **91**, 423–433.

(20 réf.)