

# LES HYBRIDATIONS INTERSPECIFIQUES DANS LE GENRE *Phaseolus* : SELECTION DES GENOTYPES COMPATIBLES ET CARACTERISATION DES HYBRIDES INTERSPECIFIQUES

S. SILUE<sup>1,2</sup>, I. J. FOFANA<sup>1</sup>, N. DIARRASSOUBA<sup>1</sup>, A. TOUSSAINT<sup>2</sup>, G. MERGEAI<sup>2</sup> et J. P. BAUDOIN<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Université Péléforo Gon Coulibaly de Korhogo. UFR Sciences Biologiques BP 1328 Korhogo, Côte d'Ivoire.  
E-mail : silsouley@hotmail.com, souleymane.silue@upgc.edu.ci

<sup>2</sup>Université de Liège - Gembloux Agro-Bio Tech. Unité de Phytotechnie Tropicale et d'Horticulture.  
Passage des Déportés, 2. B-5030 Gembloux, Belgium

## RESUME

La réussite de l'introgression de caractères utiles chez le haricot commun *P. vulgaris* à partir des deux espèces *P. coccineus* et *P. polyanthus* dépend en partie des génotypes utilisés. Ce travail vise à identifier des génotypes de *Phaseolus* compatibles lors des hybridations interspécifiques et à identifier les hybrides issus des croisements entre *P. vulgaris* utilisé comme parent mâle et les deux autres espèces utilisées comme parents femelles. Dans les croisements *P. coccineus* x *P. vulgaris*, le taux de gousses avortées au-delà de 8 JAP est d'environ 12 %. Quatre gousses supposées hybrides ont été obtenues. Pour les hybridations *P. polyanthus* x *P. vulgaris*, le taux de gousses avortées au-delà de 8 JAP est d'environ 18 % et une seule gousse supposée hybride a été produite. Les hybrides issus des deux combinaisons interspécifiques ont été mis en évidence au moyen de caractères morphologiques et grâce à un marqueur moléculaire microsatellite. Les génotypes retenus pour leur bonne aptitude à la combinaison, en tenant compte des taux d'avortement au-delà de 8 JAP, sont les suivants : NI637 et G21245 pour *P. vulgaris*, NI889 et NI16 pour *P. coccineus*, NI1015 et G35348 pour *P. polyanthus*.

**Mots clés** : *Phaseolus*, hybridations interspécifiques, caractères morphologiques, marqueur microsatellite (SSR).

## ABSTRACT

### INTERSPECIFIC HYBRIDIZATIONS WITHIN THE GENUS *Phaseolus*

Successful introgression of useful traits in common bean *P. vulgaris* from the two species *P. coccineus* and *P. polyanthus* depends in part to genotypes used. This work aims to identify genotypes of *Phaseolus* compatible during interspecific crosses and to identify hybrids from crosses between *P. vulgaris* used as male parent and the other two species used as female parents. In crosses *P. coccineus* x *P. vulgaris*, the rate of pod abortion 8 days after pollination (DAP) is around 12 %. Four putative hybrid pods were obtained. For hybridizations *P. polyanthus* x *P. vulgaris*, the rate of pod abortion 8 DAP is around 18 % and one putative hybrid pod was produced. The hybrid nature of one plant from each interspecific combination was confirmed using morphological characters and one microsatellite molecular marker. Genotypes selected for good combining abilities, considering pod abortion rates 8 DAP are NI637 and G21245 for *P. vulgaris*, NI889 and NI16 for *P. coccineus*, NI1015 and G35348 for *P. polyanthus*.

**Keywords** : *Phaseolus*, interspecific hybridizations, morphological characters, microsatellite marker (SSR).

## INTRODUCTION

Dans le genre *Phaseolus*, le haricot commun (*Phaseolus vulgaris* L.) est l'espèce économiquement la plus importante avec plus de 90 % de la production mondiale. Il constitue la principale légumineuse alimentaire de plus de 300 millions de personnes en Amérique latine et en Afrique centrale et orientale (Godderis, 1995 ; Broughton *et al.*, 2003). La production mondiale de haricot sec, en 2012, a été estimée à environ 23,14 millions de tonnes. La surface totale consacrée à la production représentait environ 29 millions d'hectares pour un rendement moyen de 0,80 t/ha. Les rendements sont en Amérique du Nord de 2,14 t/ha et de 1,85 t/ha dans l'Union Européenne contre 0,66 t/ha en Afrique (Tableau 1, source : FAO, <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx>). Ce faible rendement dans les pays en développement est dû, d'une part, aux contraintes biotiques et abiotiques de production auxquelles le haricot commun est très sensible, et d'autre part, à l'absence de variétés résistantes ou tolérantes à ces contraintes au sein du pool génique primaire du haricot commun. En effet, plus de 200 agents pathogènes (fongiques, bactériens et viraux) sont connus chez le haricot commun et certains d'entre eux causent des pertes économiques considérables (Mahuku *et al.*, 2002 ; Caixeta *et al.*, 2003). Les facteurs abiotiques tels que les hautes températures, la sécheresse contribuent aussi à réduire les rendements du haricot (Sharma & Lavanya, 2002 ; Rainey & Griffiths, 2005).

Dans les travaux d'amélioration variétale du haricot commun, les hybridations interspécifiques ont été exploitées pour introduire des gènes utiles absents ou faiblement exprimés chez la légumineuse. Les croisements ont été réalisés surtout avec les deux espèces donneuses *P. coccineus* L. et *P. polyanthus* Greenm. qui sont phylogénétiquement les plus proches de *P. vulgaris*. En outre, ils ont été utilisés comme parents maternels car la

présence du cytoplasme de ces deux espèces donneuses favoriserait une meilleure transmission des caractères utiles vers l'espèce récurrente *P. vulgaris* (Debouck & Smartt, 1995 ; Busogoro *et al.*, 1999 ; Baudoin, 2001). Malheureusement les embryons hybrides avortent très précocement (Camarena & Baudoin, 1987 ; Baudoin *et al.*, 2004). Cela est attribué en partie à un dysfonctionnement des relations nutritionnelles entre l'albumen, le suspenseur et les tissus maternels. Ce dysfonctionnement entraînerait une compétition entre l'albumen et l'embryon, d'une part, et entre le suspenseur et l'embryon, d'autre part. Ces différentes anomalies de fonctionnement entravent l'alimentation normale de l'embryon hybride et le maintien d'un équilibre minéral et hormonal nécessaire au métabolisme de l'embryogenèse (Lecomte, 1997 ; Geerts *et al.*, 2002 ; Toussaint *et al.*, 2004). L'utilisation de l'embryoculture a permis la régénération de plantes hybrides issues de ces différents croisements. Les embryons hybrides mis en culture étaient âgés de 7 à 33 jours et avaient tous atteint le stade cordiforme tardif ou cotylédonaire (Alvarez *et al.*, 1981 ; Prendota, 1984 ; Camarena & Baudoin, 1987 ; Camarena, 1988 ; Geerts *et al.*, 2002). Les degrés des anomalies constatées chez les embryons hybrides en dégénérescence et l'obtention des embryons hybrides favorables à une régénération *in vitro*, dépend en grande partie des génotypes de *P. vulgaris* d'une part et de *P. coccineus* et *P. polyanthus* d'autre part intervenant dans les croisements interspécifiques.

Ce travail s'inscrit dans le cadre général de l'étude du développement des embryons chez le genre *Phaseolus*. Il a pour objectifs d'identifier des génotypes parentaux de *Phaseolus* compatibles en permettant un développement des embryons hybrides, au moins jusqu'au stade cordiforme lors des croisements interspécifiques, et d'identifier aux niveaux morphologique et moléculaire les plantes issues des hybridations interspécifiques entre *P. vulgaris* et les deux autres espèces.

**Tableau 1** : Productions, surfaces cultivées et rendements de haricot sec dans les régions du monde en 2012.*Production, cultivated area and yields of dry beans in regions of the world in 2012.*

Régions	Productions (t*)	Surfaces cultivées (ha**)	Rendements (t/ha)
Afrique	4740016	7198019	0,66
Amérique du Nord	1720950	804482	2,14
Amérique Sud	3583840,49	3419068,73	1,05
Asie	10670688	14499325	0,74
Europe	488408	263487	1,85
Monde	23140276,49	28780376,73	0,80

\*t : tonnes, \*\*ha : hectares (Source FAO, 2012)

## MATERIEL ET METHODES

### MATERIEL VEGETAL

Le matériel végétal est constitué des génotypes des espèces *P. vulgaris* L., *P. polyanthus* Greenm et *P. coccineus* L. dont les caractéristiques sont indiquées dans le tableau 2. Ces différents génotypes ont été retenus sur la base de l'abondance de la floraison, du bon comportement au cours des hybridations interspécifiques lors des travaux antérieurs et

surtout de la résistance de *P. polyanthus* et de *P. coccineus* à diverses contraintes du haricot commun *P. vulgaris* (Camarena, 1988 ; Baudoin et al., 1992 ; Lecomte, 1997 ; Geerts, 2001).

Les graines de certaines gousses supposées hybrides ont été semées pour vérifier l'hybridité des plants qui en sont issus. Il s'agit de graines provenant des croisements NI889 (*P. coccineus*) x G21245 (*P. vulgaris*) (2 graines), NI1111 (*P. coccineus*) x G21245 (*P. vulgaris*) (1 graine) et G35348 (*P. polyanthus*) x G21245 (*P. vulgaris*) (3 graines).

**Tableau 2** : Matériel végétal utilisé et origine.*Plant material used and origin.*

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

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

### METHODES

#### Conditions de culture

Pour permettre une germination rapide, les semences ont d'abord été scarifiées et mises en pré-germination dans des boîtes de Pétri, à l'obscurité dans une enceinte climatisée où la température était de 26 °C. Lorsque la germination a été effective, à l'apparition de la

gémule et de quelques racines, les semences ont été mises dans des pots contenant du terreau et disposées dans des chambres de culture. Le substrat est composé de 80 % de terreau, de 15 % de tourbe, de 5 % de sable de Rhin et de 5 à 6 g d'engrais organique. Lorsque les plantules se sont normalement développées, c'est-à-dire avec présence du système racinaire et apparition des premières feuilles, elles ont été transférées dans de grands sachets en

polyéthylène (3 L) contenant le même substrat que les pots. Elles sont enfin mises dans des chambres de cultures pendant toute l'année ou dans les serres pendant les mois d'automne et d'hiver. Les caractéristiques des conditions dans les chambres de culture sont les suivantes : une température jour/nuit de 24/20 °C, une humidité relative d'environ 75 %, une photopériode jour/nuit de 12h/12h et une

intensité lumineuse d'environ 170  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Dans les serres, les expérimentations ont été menées entre les mois de Septembre et d'Avril, où les températures moyennes jour/nuit étaient de 21/16,5 °C avec une humidité relative moyenne d'environ 80 %. Un apport mensuel de solution nutritive (Traoré, 1980) (Tableau 3) a été effectué à partir du deuxième mois après les semis.

**Tableau 3** : Composition de la solution nutritive apportée aux plantes.

*The composition of the nutrient solution supplied to plants.*

Macroéléments (10 L / 100 L)	
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	89,9 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	59,0 g
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	18,3 g
KNO <sub>3</sub>	39,4 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	19,9 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,2 g
Microéléments (100 mL / 100 L)	
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	15 g
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	10 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	10 g
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	2 g
Fer (100mL / 100 L)	
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	35 g

### Hybridations interspécifiques

Les fleurs des plantes des génotypes utilisés comme parents femelles, *P. polyanthus* et *P. coccineus*, ont été sélectionnées et castrées un jour avant l'anthèse à l'aide d'une pince. La castration des fleurs femelles consiste d'abord à enlever la carène qui entoure le stigmate et les étamines. Ensuite, les étamines sont éliminées et enfin, la surface du stigmate est nettoyée à l'aide d'un pinceau. La pollinisation a été effectuée le même jour ou le lendemain avec les fleurs du parent mâle prélevées le jour de l'anthèse. La méthode de pollinisation a consisté à prélever la carène de la fleur du parent mâle, dont le style est retiré. La poche contenant les anthères déhiscentes a été alors utilisée pour recouvrir le stigmate de la fleur castrée du parent femelle. Ainsi, le pollen du parent mâle

est en contact avec le stigmate du parent femelle pour assurer la pollinisation. Durant l'opération, le maintien de l'humidité pendant les premiers jours après la pollinisation est déterminant. Avant et après chaque opération de castration, la pince et la brosse ont été plongées dans une solution d'éthanol absolu, afin d'éviter les contaminations de pollen non désiré. Après les hybridations, les gousses ont été suivies pendant leur croissance et celles qui avortent ont été comptabilisées. Une gousse qui est en cours d'avortement se caractérise par un ramollissement et un jaunissement suivis d'un arrêt de la croissance en longueur (Lecomte, 1997). Les taux d'avortement des gousses des différents génotypes femelles ont été comparés entre eux au moyen du test chi 2 de comparaison des proportions (Dagnelie, 2011).

## CARACTERISATION DES HYBRIDES INTER-SPECIFIQUES

Deux types d'approche ont été utilisés pour la caractérisation des hybrides issus des différents croisements. La première a porté sur l'observation de caractères agromorphologiques présentant des différences entre les deux parents croisés, à savoir la couleur des fleurs (entre les parents et les hybrides F1), la couleur des graines issues des parents et celle des graines F2 issues des hybrides F1. La seconde a concerné la caractérisation moléculaire des hybrides à l'aide d'un marqueur microsatellite. L'ADN des plants supposés hybrides et celui des parents respectifs a été extrait à partir de jeunes feuilles suivant le protocole d'extraction d'ADN des tissus des plantes décrit par Ouédraogo (2003). Les ADN ont été amplifiés en utilisant les amorces du marqueur microsatellite BM160 (Droite : CGCGGTTCTGATCGTGACTTC, Gauche : CGTGCTTGGCGAATAGC-TTTG) du CIAT (Gaitan-Solis *et al.*, 2002). Le mélange réactionnel contenait 20 ng d'ADN, un tampon d'amplification concentré 1X, 0,1  $\mu$ M d'amorces, 0,25 mM de dNTPs, 1,5 U de Taq DNA polymérase. Le programme d'amplification était le suivant : 3 min à 94 °C, 35 cycles de (15 s à 94 °C, 15 s à 55 °C, 15 s à 72 °C) et 5 min à 72 °C. Les produits d'amplification ont été dénaturés 5 min à 90 °C en présence d'une même quantité de solution stop (10 mM d'hydroxyde de sodium, 95 % de formamide, 0,05 % de bleu de bromophénol, 0,05 % de xylène cyanol) et chargés dans un gel de polyacrylamide 6 %. Après migration d'1h à 1h30, le gel a été fixé dans une solution fix-stop (10 % d'éthanol absolu, 0,5 % d'acide acétique) pendant 7 min. Le gel a ensuite été coloré (0,1 % nitrate d'argent, 0,15 % formamide) pendant 5 min et rincé dans de l'eau désionisée pendant quelques secondes. Les bandes générées par les amorces ont enfin été révélées dans une solution de développement (1,5 % NaOH, 0,2 % formamide) (Ouédraogo, 2003).

## RESULTATS

### HYBRIDATIONS INTERSPECIFIQUES

Les tableaux 4 et 5 donnent une synthèse des croisements effectués entre les différents génotypes de *P. coccineus* et de *P. polyanthus* et ceux de *P. vulgaris*.

Pour les hybridations *P. coccineus* x *P. vulgaris*, sur un total de 938 croisements, il a été enregistré 65,88 % d'avortement des gousses entre 3 et 5 jours après pollinisation (JAP), 21 % entre 6 et 8 JAP et 12 % au-delà de 8 JAP. Des gousses matures supposées hybrides issues des croisements NI889 x NI637 (2 gousses), NI889 x G21245 (3 gousses), NI16 x NI637 (3 gousses) et NI1111 x G21245 (1 gousse) ont été obtenues. Les génotypes femelles NI1111, NI889 et NI16 ont donné sensiblement les mêmes résultats, avec respectivement 13,20 %, 12,82 % et 12,07 % de gousses avortées au-delà de 8 JAP (Tableau 4).

Quant aux croisements *P. polyanthus* x *P. vulgaris*, sur 733 hybridations, le taux de gousses avortées a été de 65,62 % entre 3 et 5 JAP, de 16 % entre 6 et 8 JAP et de 18 % au-delà de 8 jours. Une seule gousse mature supposée hybride issue du croisement G35348xG21245 a été obtenue. Le taux d'avortement des gousses au-delà de 8 jours chez les croisements impliquant les génotypes femelles a été variable (NI1015 : 22 % ; G35348 : 18 % et NI1123 : 10 %) (Tableau 5).

Les génotypes femelles ont été classés en fonction du taux d'avortement des gousses au-delà de 8 JAP lors des hybridations avec les deux génotypes mâles les plus utilisés : NI637 et G21245. Le test chi 2 a montré une différence significative entre les différents génotypes femelles ( $\chi^2 = 17,371$  ; ddl = 5 ; P = 0,004 < 0,05) qui se sont classés dans l'ordre décroissant suivant : NI1015 (23,4 %), G35348 (16,8 %), NI889 (15,2 %), NI16 (12,9 %), NI1123 (11,3 %) et NI1111 (8,6 %) (Figure 1).

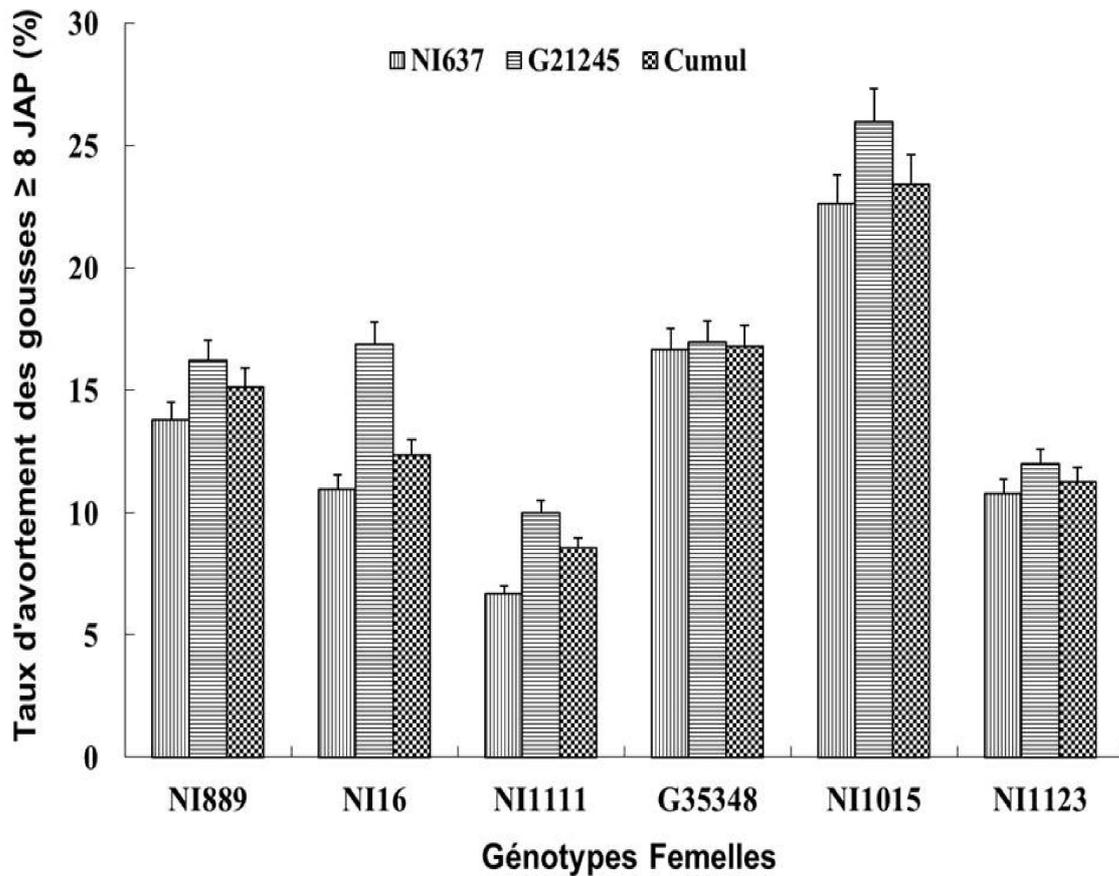
**Tableau 4** : Nombre de gousses issues des croisements interspécifiques P.c. ( ♀ x P.v. ( ♂ ) à différents intervalles de temps après la pollinisation.*Pod setting in interspecific crosses P.c. ( ♀ ) x P.v. ( ♂ ) at different time intervals after pollination.*

Combinaisons interspécifiques	Nombre d'hybridations réalisées	Intervalles de temps après pollinisation (Jours)				Gousses matures
		3-5	6-8	9-13	≥ 14	
<i>P.c. ( ♀ ) x P.v. ( ♂ )</i>						
NI889 x NI637	58	31	17	8	0	2
NI889 x BAT93	24	18	6	0	0	0
NI889 x G21245	74	43	16	4	8	3
<i>Sous total</i>	<i>156</i>	<i>92</i>	<i>39</i>	<i>12</i>	<i>8</i>	<i>5</i>
<i>NI16 x NI637</i>						
NI16 x NI637	464	325	85	36	15	3
NI16 x BAT93	113	72	28	6	7	0
NI16 x G21245	142	94	24	15	9	0
NI16 x NI622	10	5	5	0	0	0
<i>Sous total</i>	<i>729</i>	<i>496</i>	<i>142</i>	<i>57</i>	<i>31</i>	<i>3</i>
<i>NI1111 x NI637</i>						
NI1111 x NI637	15	8	6	0	1	0
NI1111 x G21245	20	13	4	2	0	1
NI1111 x NI622	18	9	5	3	1	0
<i>Sous total</i>	<i>53</i>	<i>30</i>	<i>15</i>	<i>5</i>	<i>2</i>	<i>1</i>
<b>Total P.c. ( ♀ ) x P.v. ( ♂ )</b>	<b>938</b>	<b>618</b>	<b>196</b>	<b>74</b>	<b>41</b>	<b>9</b>

P.v. = *Phaseolus vulgaris*, P.c. = *P. coccineus***Tableau 5** : Nombre de gousses issues des croisements interspécifiques P.p. ( ♀ x P.v. ( ♂ ) à différents intervalles de temps après la pollinisation.*Pod setting in interspecific crosses P.p. ( ♀ ) x P.v. ( ♂ ) at different time intervals after pollination.*

Combinaisons interspécifiques	Nombre d'hybridations réalisées	Intervalles de temps après pollinisation (Jours)				Gousses matures
		3-5	6-8	9-13	≥ 14	
<i>P.p. ( ♀ ) x P.v. ( ♂ )</i>						
G35348 x NI637	240	175	25	17	23	0
G35348 x G21245	177	128	18	14	16	1
G35348 x NI622	20	10	3	7	0	0
<i>Sous total</i>	<i>437</i>	<i>313</i>	<i>46</i>	<i>38</i>	<i>39</i>	<i>1</i>
<i>NI1015 x NI637</i>						
NI1015 x NI637	159	87	36	15	21	0
NI1015 x G21245	50	25	12	7	6	0
<i>Sous total</i>	<i>209</i>	<i>112</i>	<i>48</i>	<i>22</i>	<i>27</i>	<i>0</i>
<i>NI1123 x NI637</i>						
NI1123 x NI637	37	22	11	4	0	0
NI1123 x BAT93	15	10	5	0	0	0
NI 1123 x G21245	25	18	4	3	0	0
NI1123 x NI622	10	6	2	1	1	0
<i>Sous total</i>	<i>87</i>	<i>56</i>	<i>22</i>	<i>8</i>	<i>1</i>	<i>0</i>
<b>Total P.p. ( ♀ ) x P.v. ( ♂ )</b>	<b>733</b>	<b>481</b>	<b>116</b>	<b>68</b>	<b>67</b>	<b>1</b>

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



**Figure 1** : Pourcentage d'avortement des gousses au-delà de 8 jours après pollinisation des génotypes femelles NI889, NI16 et NI1111 de *P. coccineus* et G35348, NI1015 et NI1123 de *P. polyanthus* dans les croisements avec les génotypes NI637 et G21245 de *P. vulgaris*. Cumul représente le taux d'avortement des gousses avec les deux génotypes mâles.

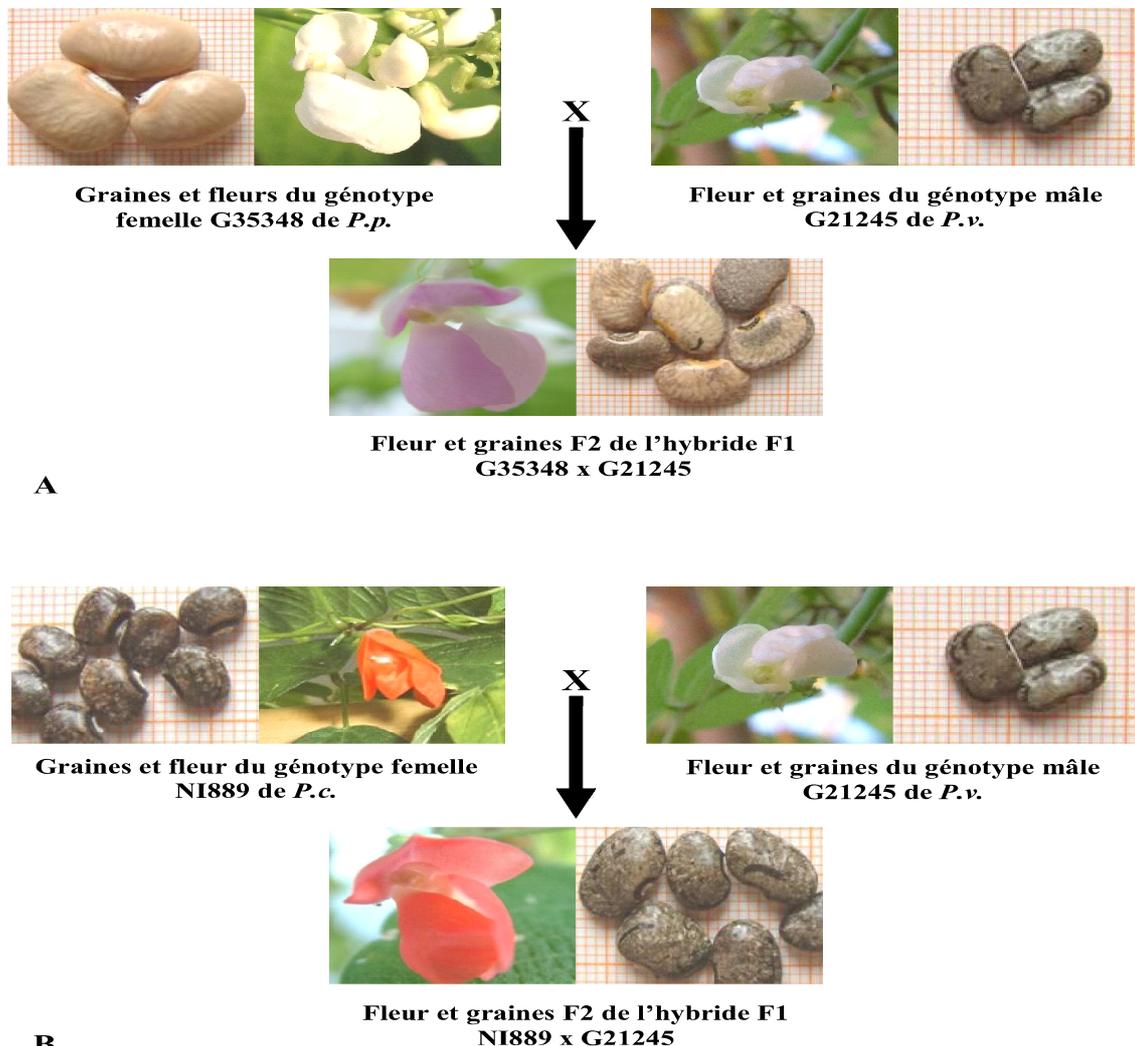
*Percentage of pod abortion 8 days after pollination of female genotypes NI889, NI16 and NI1111 of P. coccineus and G35348, NI1015 and NI1123 of P. polyanthus in crosses with genotypes NI637 and G21245 of P. vulgaris. Cumul is the rate of pod abortion with both male genotypes.*

## CARACTERISTIQUES DES HYBRIDES OBTENUS

### Caractéristiques morphologiques

Sur les six graines semées, à l'exception de la graine issue de la gousse provenant du croisement NI1111 x G21245 qui n'a pas germé, toutes les autres graines ont germé et donné des plantes fertiles. Deux des cinq plantes obtenues après germination, issues l'une du croisement G35348 x G21245 (Figure 2A) et l'autre du croisement NI889 x G21245 (Figure 2B) ont présenté des caractères (couleur des fleurs et des graines) différents de ceux des

parents dont elles sont issues. L'hybride F1 G35348 x G21245 se différencie de ces parents *P. polyanthus* G35348 et *P. vulgaris* G21245 par la couleur des fleurs et des graines produites ; tandis que l'hybride F1 NI889 x G21245 est différent de ces parents *P. coccineus* NI889 et *P. vulgaris* G21245 par la couleur des fleurs. L'hybride F1 G35348 x G21245 est caractérisé par des fleurs violettes et des graines rousses ou grises tachetées de noir, tandis que chez l'hybride F1 NI889 x G21245 les fleurs ont été roses. Les trois autres plantes ont montré les mêmes caractères que ceux des parents femelles G35348 (*P. polyanthus* : deux plantes) et NI889 (*P. coccineus* : une plante).



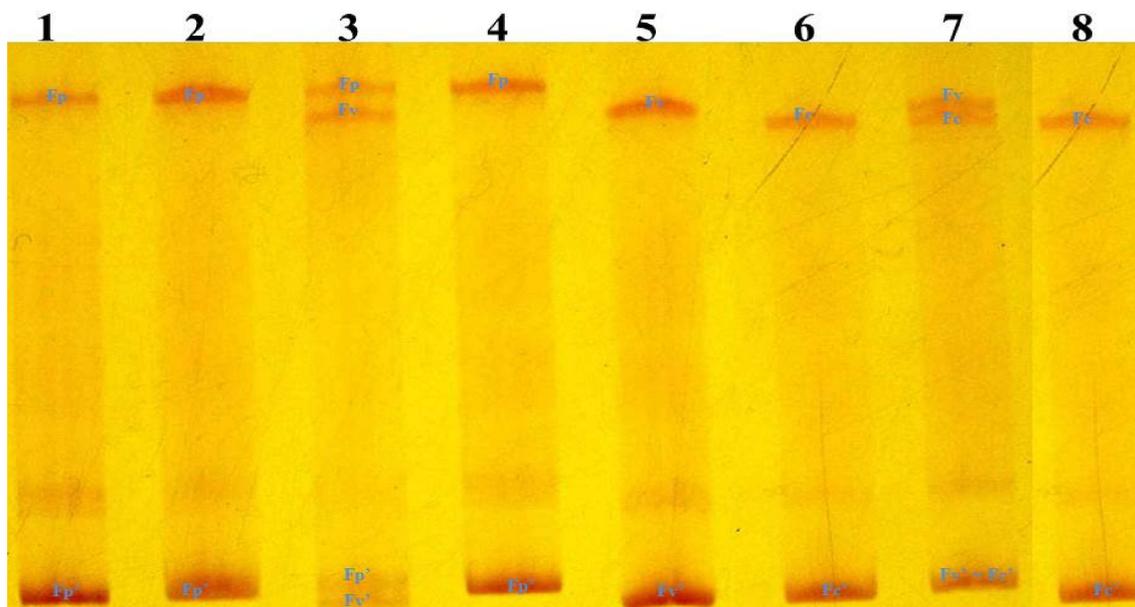
**Figure 2 :** Caractéristiques des génotypes parentaux et des hybrides issus des croisements interspécifiques *P. polyanthus* x *P. vulgaris* (A) et *P. coccineus* x *P. vulgaris* (B). La couleur des fleurs, la taille et la couleur des graines des hybrides sont différentes de celles des génotypes parentaux. P.v. : *Phaseolus vulgaris*, P.p. : *Phaseolus polyanthus*, P.c. : *Phaseolus coccineus*.

*Characteristics of flowers and seeds from the parental genotypes and F1 hybrids from the interspecific crosses P. polyanthus x P. vulgaris (A) and P. coccineus x P. vulgaris (B). Flower color, size and seeds color of hybrids are different from those of parental genotypes.*

### Caractéristiques moléculaires

La figure 3 montre l'électrophorèse des produits PCR des différents échantillons testés. Ces résultats ont révélé que, seuls l'échantillon représentant l'hybride G35348 x G21245 contenant les fragments Fp/Fp' de *P. polyanthus*

et Fv/Fv' de *P. vulgaris* et celui représentant l'hybride NI889 x G21245 contenant les fragments Fc/Fc' de *P. coccineus* et Fv/Fv' de *P. vulgaris* se sont révélés être des hybrides. Ces résultats ont confirmé les observations morphologiques déjà faites sur ces plantes.



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

*Electrophoresis of the amplified fragments by primer BM160 on DNA extracted from leaves of plants presumed interspecific hybrids and their respective parents. 1 : P. polyanthus maternal genotype G35348 ; 2, 3, 4 : presumed hybrid plants G35348 x G21245 ; 5 : P. vulgaris paternal genotype G21245 ; 6, 7 : presumed hybrid plants NI889 x G21245 ; 8 : P. coccineus maternal genotype NI889. Fp and Fp' : G35348 fragments ; Fv and Fv' : G21245 fragments ; Fc et Fc' : NI889 fragments. Only samples 3 and 7 characterized by the presence of fragments from both parents are hybrid.*

### DISCUSSION

Les essais d'hybridations interspécifiques entre *P. coccineus* et *P. polyanthus* utilisés comme parents femelles et *P. vulgaris* utilisé comme parent mâle ont mis en évidence des difficultés : castration des fleurs femelles, pollinisation, et obtention de gousses et de graines hybrides. Les périodes de floraison très courtes de certains génotypes expliquent dans certains cas le faible nombre d'hybridations réalisées. La dégénérescence des gousses un ou deux jours après la pollinisation peut être due aux blessures faites sur les pièces florales au cours de la manipulation des fleurs.

Les résultats ont montré que la plupart des gousses obtenues après hybridation avortent entre 3 et 5 JAP, au stade globulaire, avec 66 % pour les deux types de croisements *P. coccineus* x *P. vulgaris* et *P. polyanthus* x *P. vulgaris*, à une période où l'embryon est difficile à sauver *in vitro*. Ces chiffres concordent avec ceux des travaux antérieurs (Lecomte, 1997 ; Geerts, 2001 ; Baudoin *et al.*, 2004). A l'opposé des travaux antérieurs qui ont montré des difficultés à obtenir des hybrides sans embryoculture en cas d'utilisation de *P. coccineus* ou *P. polyanthus* comme parents femelles (Camarena, 1988 ; Mergeai *et al.*, 1997), des graines hybrides viables qui ont donné des plantes hybrides fertiles ont été obtenues.

Le taux de gousses matures hybrides a été de 0,96 % chez les croisements *P. coccineus* x *P. vulgaris* et de 0,14 % chez les croisements *P. polyanthus* x *P. vulgaris*. L'obtention de graines hybrides chez des croisements *P. coccineus* x *P. vulgaris* a été déjà signalée par certains auteurs. En effet, Nassar (1978) a obtenu un taux de réussite de 1,2 % et Angeles (1986) un taux de 8,3 %. Mais, les graines dans ce dernier croisement n'étaient pas viables comme ce fut le cas pour les graines de l'hybride NI1111 x G21245 que nous avons testées. Par ailleurs, Nguema (2007) a récolté 16 graines issues du même type de croisement dont 4 ont germé sur les 8 graines semées. La croissance de deux plantules s'est arrêtée deux semaines après la germination. Pour les croisements *P. polyanthus* x *P. vulgaris*, Camarena (1988) a eu recours à l'embryoculture pour la régénération de trois plantes hybrides. Les travaux de Lecomte (1997) et de Geerts (2001) n'ont pas mentionné l'obtention de plantes hybrides.

Les différents génotypes femelles ont été classés dans l'ordre décroissant suivant : NI1015, G35348, NI889, NI16, NI1123 et NI1111. Pour un classement définitif de la performance des différents génotypes femelles, nous devons tenir compte de certains facteurs majeurs tels que les délais de floraison, l'abondance de floraison et surtout la taille des fleurs et des graines des différents génotypes. Les fleurs de taille relativement grande permettent une manipulation plus aisée lors des opérations de castration et d'hybridation. Le génotype NI16 de *P. coccineus* a le délai de floraison le plus court (environ un mois après les semis), des fleurs de grande taille et une floraison abondante et régulière. Le génotype NI889 de *P. coccineus* par contre a le délai de floraison le plus long (deux à trois mois), des fleurs de petite taille et une floraison irrégulière. Les autres génotypes ont des fleurs de grande taille, des délais de floraison d'environ quarante-cinq jours après les semis et une floraison régulière mais moins abondante.

## CONCLUSION

Un total de 1671 hybridations interspécifiques *P. coccineus* x *P. vulgaris* et *P. polyanthus* x *P. vulgaris* ont été effectuées. Dans les combinaisons *P. coccineus* x *P. vulgaris*, le taux de gousses avortées au-delà de 8 JAP était d'environ 12 %. Neuf gousses matures

supposées hybrides ont été obtenues, soit un taux de 0,96 %. Quant aux combinaisons *P. polyanthus* x *P. vulgaris*, le taux de gousses avortées au-delà de 8 jours a été d'environ 18 %. Une seule gousse mature supposée hybride a été obtenue soit un taux de 0,14 %. Parmi les graines issues de ces gousses hybrides, seule une graine de chacun des croisements NI889 x G21245 et G35348 x G21245 ont donné des plantes présentant des caractéristiques différentes de celles des parents. Ces différences ont été mises en évidence au moyen des caractères morphologiques (couleur des fleurs et des graines) et du marqueur microsatellite BM160. Les différents génotypes retenus pour leur bonne aptitude à la combinaison ont été NI637 et G21245 pour *P. vulgaris*, NI889 et NI16 pour *P. coccineus*, NI1015 et G35348 pour *P. polyanthus*.

## PERSPECTIVES

Afin d'accroître les taux de réussite des hybridations interspécifiques entre *P. vulgaris* et les deux autres espèces *P. coccineus* et *P. polyanthus*, la technique de grains de pollen prégermés et/ou celle du cut-style (Gurusamy et al., 2007) pourrait apporter de meilleurs résultats lors des hybridations interspécifiques. L'association de ces deux techniques a permis d'obtenir environ 69 % de fécondation 2 heures après la pollinisation dans certains croisements où la fécondation ne commence que 22 heures après une pollinisation normale chez *Phaseolus*. Les génotypes NI637 et G21245 pour *P. vulgaris*, NI889 et NI16 pour *P. coccineus*, NI1015 et G35348 pour *P. polyanthus* retenus pour leurs bonnes aptitudes à la combinaison pourraient être utilisés dans les prochaines études afin d'accroître le taux d'embryons et de plantes hybrides par le biais de la culture *in vitro*.

## REFERENCES

- Alvarez H. N., P. D. Asher and W. Davis. 1981. Interspecific hybridization in *Euphaseolus* through embryo rescue. Hortscience 16 : 541 - 543.
- Angeles B. 1986. Etude de l'utilisation du cytoplasme d'une forme sauvage de *P. coccineus* L. en vue de l'hybridation interspécifique des cultivars de cette espèce avec *P. vulgaris*. Thèse de Doctorat,

- Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux (Belgique), 185 p.
- Baudoin J. P. 2001. Contribution des ressources phylogénétiques à la sélection variétale de légumineuses alimentaires tropicales. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 5 : 221 - 230.
- Baudoin J. P., M. F. Camarena and V. Schmit. 1992. Contribution à une meilleure connaissance de la position phylétique de la légumineuse alimentaire *Phaseolus polyanthus* Greenm. *Bull Rech Agron Gembloux* 27 : 167 - 198.
- Baudoin J. P., S. Silue, P. Geerts, G. Mergeai, J. M. Jacquemin and A. Toussaint. 2004. Interspecific hybridization with *Phaseolus vulgaris* L. : Embryo development and its genetics. *In* : Pandalai S. G. (Eds.). *Recent Research Developments in Genetics and Breeding (Vol I, Part II)*. Trivandrum, Kerala, India: Research Signpost : pp 349 - 364.
- Broughton W. J., G. Hernandez, M. W. Blair, S. Beebe, P. Gepts and J. Vanderleyden. 2003. Beans (*Phaseolus* spp.) - Model Food Legumes. *Plant and Soil* 252 : 55 - 128.
- Busogoro J. P., M. H. Jijakli and P. Lepoivre . 1999. Identification of a novel source of resistance to angular leaf spot disease of common bean within the secondary gene pool. *Plant Breeding* 118 : 417 - 423.
- Caixeta E. T., A. Borém, S. Azevedo Fagundes, S. Nienstche, E. G. Barros and M. A. Moreira. 2003. Inheritance of angular leaf spot resistance in common bean line BAT 332 and identification of RAPD marker linked to the resistance gene. *Euphytica* 134 : 297 - 303.
- Camarena M. F. 1988. Etude de la transmission des caractères de *Phaseolus polyanthus* Greenm. dans *Phaseolus vulgaris* L. à travers l'utilisation du cytoplasme de *P. polyanthus*, Thèse de doctorat, Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux, Gembloux (Belgique), 237 p.
- Camarena M. F. and J. P. Baudoin. 1987. Obtention des premiers hybrides interspécifiques entre *Phaseolus vulgaris* et *Phaseolus polyanthus* avec le cytoplasme de cette dernière forme. *Bull. Rech. Agron. Gembloux* 22 (1) : 43 - 55.
- Dagnelie P. 2011. Statistique théorique et appliquée. Tome 2, Inférence statistique à une et à deux dimensions. Bruxelles : De Boeck, 736 p.
- Debouck D. G. and J. J. Smartt. 1995. Beans, *Phaseolus* spp. (Leguminosae-Papilionoidae). *In* : Smartt J. J., Simmonds N. W. (Eds). *Evolution of Crop Plants*, Longman Scientific and Technical, London, UK: pp 287 - 294.
- FAO. <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx>
- Gaitan-Solis E., M. C. Duque, K. J. Edwards and J. Tohme. 2002. Microsatellite repeats in common bean (*Phaseolus vulgaris*): isolation, characterization, and cross-species amplification in *Phaseolus* ssp. *Crop Sci.* 42 : 2128 - 2136.
- Geerts P. 2001. Study of embryo development in *Phaseolus* in order to obtain interspecific hybrids. Thèse de doctorat, Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques, Gembloux (Belgique), 183 p.
- Geerts P., A. Toussaint, G. Mergeai and J. P. Baudoin. 2002. Study of the early abortion in reciprocal crosses between *Phaseolus vulgaris* L. and *Phaseolus polyanthus* Greenm. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 6 (2) : 109 - 119.
- Godderis W. 1995. La culture du haricot au Burundi. Bruxelles : AGCD, Bujumbura : ISABU.
- Gurusamy V., A. Vandenberg and K. E. Bett. 2007. Manipulation of *in vivo* pollination techniques to improve the fertilization efficiency of interspecies crosses in the genus *Phaseolus*. *Plant Breeding* 126 : 120 - 124.
- Lecomte B. 1997. Etude du développement embryonnaire *in vivo* et *in vitro* dans le genre *Phaseolus* L. Thèse de doctorat, Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux, Gembloux (Belgique), 186 p.
- Mahuku G. S., C. E. Jara, C. Cajiao and S. Beebe. 2002. Sources of resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* in the secondary gene pool of *Phaseolus vulgaris* and in crosses of primary and secondary gene pools. *Plant Dis.* 86 : 1383 - 1387.
- Mergei G., V. Schmit, B. Lecomte and J. P. Baudoin. 1997. Mise au point d'une technique de culture *in vitro* d'embryons immatures de *Phaseolus*. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 1 : 49 - 58.
- Nassar M. A. S. 1978. Studies of reciprocal interspecific hybridisations between *Phaseolus coccineus* L. and *Phaseolus vulgaris* L. Thèse de doctorat, Southampton University, Biology Department (England), 287 p.
- Nguema N. P. 2007. Etude histologique de l'embryogenèse chez *Phaseolus coccineus* L. et *P. vulgaris* L. et chez les hybrides

- réciroques entre ces deux espèces. Thèse de doctorat, Faculté universitaire des Sciences agronomiques de Gembloux (Belgique), 173 p.
- Ouedraogo M. 2003. Etude de la variabilité génétique et du flux de gènes chez des populations sauvages de *Phaseolus lunatus* L. dans la vallée centrale du Costa Rica à l'aide des marqueurs enzymatiques et microsatellites. Thèse de doctorat, Faculté Universitaires des Sciences Agronomiques de Gembloux (Belgique), 144 p.
- Prendota K. 1984. Recherches sur l'utilisation de *Phaseolus acutifolius* A. Gray pour l'amélioration du haricot commun (*Phaseolus vulgaris* L.). Thèse de Doctorat, Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux (Belgique), 181 p.
- Rainey K. M. and P. D. Griffiths. 2005. Inheritance of heat tolerance during reproductive development in snap bean (*Phaseolus vulgaris* L.). J. Am. Soc. Hortic. Sci. 130 : 700 - 706.
- Sharma K. K. and M. Lavanya. 2002. Recent developments in transgenics for abiotic stress in legumes of the semi-arid tropics. JIRCAS Working Report 23 : 61 - 73.
- Toussaint A., P. Geerts, F. Clement, G. Mergeai and J. P. Baudoin. 2004. Early abortion in reciprocal crosses between *Phaseolus vulgaris* and *Phaseolus polyanthus*, and *in vitro* culture of immature embryos from these species. Belg. Journ. Bot. 137 (1) : 47 - 54.
- Traoré A. Y. 1980. Deux légumineuses alimentaires *Vigna mungo* L. Hepper et *Phaseolus vulgaris* L. : influence de la nutrition minérale et principalement des apports en soufre sur le développement des plantes et les rapports en acides aminés soufrés des graines. Mémoire de DEA, Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux (Belgique), 177 p.