

REGENERATION DE PLANTS *IN VITRO* DU HARICOT DOLIQUE (*VIGNA UNGUICULATA* L.) WALP.

A. AID-HOUCHI, Z. TAIBI

Université Mouloud Mammeri, Tizi Ouzou, faculté des sciences biologiques et agronomiques, département d'agronomie, laboratoire de recherche des ressources naturelles.

RÉSUMÉ

Des essais de multiplication végétative *in vitro* sur milieu de MURASHIGE et SKOOG (1962) comprenant différentes concentrations de BAP associées à de l'ANA et de la GA3 sont effectués sur 2 cultivars de haricot dolique (*Vigna unguiculata* L.) Walp., qui sont le haricot à hile noir et tadelaght noire d'Aoulef. Les organes mis en culture sont les cotylédons, les apex et les noeuds cotylédonaire. Ces résultats montrent une capacité de régénération de plants *in vitro* du haricot dolique. Des cals vert sombres et blancs sont obtenus sur des cotylédons avec l'ensemble des associations hormonales testées. Un rhyzogenèse a été observée sur les cals blancs tandis que chez le cultivar tadelaght, une néoformation de plants sur cals est apparue (16 à 33%) en présence de BAP (8,87 μ M), ANA (10,74 μ M), d'AIB (98 μ M) ajoutés individuellement au milieu de culture en présence de BAP (8,88 μ M associée à de l'ANA 0,54 μ M) et de la GA3 (0,29 μ M). Dans le cas des apex et des noeuds cotylédonaire, les combinaisons d'ANA, de BAP et de GA3 ont permis l'obtention d'une callogenèse (20%), d'un bourgeonnement (15%) et d'une néoformation de plants avec une meilleure fréquence pour le haricot à hile noir. Un meilleur développement de plants (30 à 70%) est observé lorsque seule l'auxine est ajoutée au milieu de culture de base. Les plants obtenus ont été acclimatés avec un taux de réussite de 99%. Le suivi des vitroplants en pots comparés à ceux issus de semis montre quelques variations.

Mots Clés : *Vigna unguiculata*, culture *in vitro*, néoformation de plants, rhyzogenèse, acclimatation.

SUMMARY

In vitro culture was induced in 2 cultivars of cowpea (*Vigna unguiculata* L.) Walp. from cotyledons, apex and cotyledonary buds. These organs were cultured on MURASHIGE and SKOOG medium (1962) containing different concentrations of BAP combined with ANA and GA3. The results were showed that it was possible to multiply the cowpea by this method. Green and white callus are obtained in the cotyledonary fragments with all the hormonal associations tested. Rhizogenesis is observed on white callus ; also, proliferation shoots are formed from callus tadelaght variety (16 to 33%) with BAP (8,87 μ M), ANA (10,74 μ M), AIB (9,8 μ M) added individually to culture medium and with BAP (8,88 μ M) associated with ANA (0,54 μ M) and GA3 (0,29 μ M). Hormonal combinations (ANA, BAP and GA3) tested on apex and cotyledonary buds produced callogenesis (20%) and budding (15%). A Higher plant regeneration was observed with black hilum variety. Auxine added only to basal medium provided a best plant development (30-70%) and these plants were transferred to acclimatization conditions with high degrees (99%) of success. The regenerated plants were showed some variations with plants seedling.

Key Words : *Vigna unguiculata*, *in vitro* culture, plant regeneration, rhizogenesis, acclimatization.

INTRODUCTION

Le haricot dolique (*Vigna unguiculata* L. Walp.) constitue une source de protéines pour les populations rurales des pays d'Afrique. En outre, il présente un intérêt agronomique par sa capacité de fixer l'azote atmosphérique comme il possède un potentiel de gènes intéressants car bien adapté aux conditions édaphiques et climatiques des zones semi-arides et arides où règnent la sécheresse et la salinité. La culture *in vitro* se présente comme une alternative pour accélérer les schémas de sélection et entrevoir l'amélioration de l'espèce par le biais des biotechnologies. Quelques travaux relatifs à la culture de tissus ont été réalisés sur des milieux de base de MURASHIGE et SKOOG (1962 et de GAMBORG (1968) par certains auteurs (BRAR *et al.*, (1997) ; MUTHUKUMAR *et al.*, (1995) ; PELLEGRINESCHI (1997). Cependant, ils confirment que l'application de ces techniques pose quelques problèmes chez les légumineuses à grosses graines comme le genre *Vigna*.

L'objectif de ce travail est de tester les potentialités de régénération de différents organes de deux cultivars de haricot dolique et de maîtriser par conséquent les techniques de multiplication végétative *in vitro*. Ceci est dans un but avant tout scientifique et d'amélioration génétique d'autre part.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Matériel végétal

Cette expérimentation est menée sur deux cultivars de haricot dolique qui sont le haricot à hile noir et tadelaght noire d'Aoulef. Les différents organes utilisés sont : les cotylédons, les nœuds cotylédonaires et les apex. Les premiers sont prélevés sur des graines âgées d'une année, les autres sur des plants cultivés en pots au laboratoire sur un substrat composé de terre, de sable et de tourbe.

Méthodes

Désinfection du matériel et mise en culture

Le matériel végétal est désinfecté avant la mise en culture avec l'hypochlorite de sodium (8° et 12°) et l'éthanol à 96° selon un procédé approprié aux différents types d'explants.

Le milieu de culture utilisé comprend les macro et micro-éléments de MURASHIGE et SKOOG (1962), additionné de régulateurs de croissance (6-benzylaminopurine (BAP), 6-furfurylamino-purine (kinétine), acide naphthalène acétique (ANA), acide indole-3-butyrique (AIB), et acide gibbéréllique 3 (GA3), de vitamines (thiamine HCl, pyridoxine HCl, acide nicotinique, acide ascorbique et inositol), de saccharose et de gélose. Différentes combinaisons hormonales sont utilisées relativement aux organes mis en culture. Dans le cas des nœuds cotylédonaires et les apex, la BAP aux concentrations de 2,22 μM , 4,44 μM et 8,88 μM est associée à l'ANA (0,54 μM et GA3 (0,29 μM). Pour ce qui est des cotylédons, les associations hormonales sont les suivantes :

- AP (8,88 μM) - ANA (0,54 μM) - GA3 (0,29 μM)
- AP (8,88 μM - ANA (10,74 μM) - GA3 (0,29 μM)
- AP (111 μM) - ANA (0,54 μM) - AIB (9,8 μM)

La phase d'enracinement est réalisée sur milieu de MURASHIGE et SKOOG (1962) dépourvu de régulateurs de croissance ou contenant une auxine (ANA à 10,74 μM ou AIB à 9,8 μM).

Les milieux dont le pH est ajusté à 6 sont autoclavés à 120 °C pendant 20 mn pour les tubes et 30 mn pour les bocaux. Ils sont ainsi prêts pour recevoir les cultures lesquelles sont ensuite placées sous des conditions de température d'environ 23 °C + ou - 2 °C et une photopériode de 16h avec un éclairage de 4000 lux.

Acclimatation

Les vitroplants régénérés à partir de cotylédons, de nœuds et d'apex sont acclimatés dans des mini-serres. Celles-ci sont des boîtes transparentes en plastique et permettent le passage de la lumière tout en retenant l'humidité. Le substrat est arrosé avec la solution nutritive de MURASHIGE et SKOOG (1962) très diluée et neutralisée. Le pH de ce substrat est d'environ 6,8. Lors de leur prélèvement pour le transfert en mini-serres ainsi préparées, les vitroplants sont lavés soigneusement à l'eau de robinet pour éliminer la gélose accompagnant les racines à la sortie des tubes ou des bocal de culture. Les boutures obtenues sont repiquées dans leur nouveau milieu (mini-serres) sous des conditions de température et de photopériode identiques à celles indiquées précédemment. Deux semaines plus tard, les plants sont repiqués dans des pots en plastique contenant de la terre, de la tourbe et du sable ; l'ensemble étant placé dans des conditions de laboratoire (température moyenne = 23 ° C).

Suivi des plants

Les observations du matériel végétal sont effectuées régulièrement. Elles portent sur la croissance et le développement des vitroplants en comparaison avec ceux issus de semis. Les paramètres retenus sont la longueur de la tige et la phénologie des plants des deux cultivars.

Analyses statistiques

Pour l'analyse des résultats, nous avons appliqué le test de comparaison de deux pourcentages observés en calculant l'écart réduit (E).

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Essais de désinfection

De toutes les méthodes testées, il ressort que dans le cas des cotylédons, les meilleurs résultats sont observés avec l'hypochlorite de sodium à 8° agissant pendant 10 h et 30 mn suivi d'un trempage dans de l'éthanol (96°). Le taux de réussite est de 91,7% pour le cultivar

tadelaght et 100% pour le haricot à hile noir. Signalons toutefois des cas de nécroses avec des taux de 25% pour ce dernier cultivar et 33% pour le premier.

La stérilisation des fragments de nœuds et des apex par trempage dans de l'hypochlorite de sodium (12°) pendant 3 mn dans un premier temps et dans de l'éthanol (96°) est très efficace. Aucune infection n'est décelée dans le cas des 2 organes ; le taux de nécroses est également insignifiant (1 à 2% pour les deux cultivars).

Réponses morphogénétiques

Les résultats obtenus *in vitro* à partir des différents explants cultivés sur milieu de MURASHIGE et SKOOG (1962) additionné de différentes concentrations hormonales sont indiqués aux tableaux I et II. Ils montrent que la culture des cotylédons induit plus de 50% de réponses pour les combinaisons hormonales testées.

Une forte concentration de BAP (111 µM) additionnée d'ANA et de GA₃ induit une formation de cals vert sombre contrairement au rapport hormonal ; le repiquage sur milieu neuf leur donne un aspect vert transparent et friable mais n'induit aucune organogenèse. Par contre, une plus faible concentration de BAP (8,87 µM) est à l'origine de cals blancs sur lesquels s'établit une rhizogénèse (Figure 1a). L'orientation de ces cals vers la régénération de plants est difficile à réaliser ; néanmoins, des pousses se sont formées (Figure 1b) même si le taux demeure très faible ce qui pourrait être dû au non contrôle du mécanisme des régulateurs de croissance, comme rapporté par (SKOOG et SANGWAN, 1986 cités par SANGWAN 1987) sur cals de betterave. Aussi, un manque d'éléments nécessaires à la formation de pousses pourrait être une raison comme l'a spécifié PELLEGRINESHI (1997). En effet, cet auteur a pu observer une régénération de plants sur cotylédons de *Vigna* (génotypes 83D-442, 86D-1010, 93K-624, Vita 3 et Ife brown) en présence de putrescine.

D'après les données indiquées aux tableaux I et II, la différence est significative entre les 2 cultivars pour la formation de cals, de racines et le développement de plants avec toutes les concentrations hormonales testées à l'exception de 111 μM pour la formation de cals. Cette même concentration et celle équivalente à 8,87 μM entraînent une différence non significative pour la formation de racines.

Quant aux explants prélevés sur des plantes issues de semis, les apex répondent sur les milieux de culture essayés avec un taux de 58,92% pour le haricot à hile noir et 69,64% pour tadelaght noire d'Aoulef tandis que pour les nœuds cotylédonaire, le taux est plus faible (environ 40% pour les 2 cultivars). La présence du rapport BAP/ANA >1 dans le milieu de culture oriente ces explants vers la formation de cals et le développement de bourgeons alors que la présence d'ANA (10,74 μM) ou d'AIB (9,8 μM) seule dans le milieu de culture induit une régénération directe de plants chez les deux cultivars (Figure 2a et 2b) ; ceci est contradictoire avec la théorie classique qui affirme que l'auxine seule inhibe le développement de pousses (MARGARA, 1989 ; HELLER *et al.*, 2000). Cependant, ceci pourrait s'expliquer par le manque de maîtrise du taux d'hormones endogènes dans le cas de ce matériel végétal.

Le taux de régénération est plus élevé sur les apex (en moyenne de 26,78% pour le haricot à hile noir et 19,64 % pour tadelaght noire d'Aoulef) que sur les nœuds cotylédonaire (14,28% pour le premier cultivar et 7,14% pour le second).

La composition hormonale influe sur la régénération de plants (TETU *et al.*, 1987 ; JAIN *et al.*, 1988 ; RASTOGI, 1989). Selon nos observations, les milieux de culture les plus efficaces sont ceux qui contiennent une seule hormone (8,87 μM de BAP ou 10,74 μM d'ANA ou 9,8 μM

d'AIB) ; ils permettent d'enregistrer un taux maximal de néoformations sur les différents types d'explants des 2 cultivars ; le milieu auxinique (10,74 μM d'ANA ou 9,8 μM d'AIB) a permis des régénérations de plants sur les nœuds et les apex ; ces résultats confirment ceux obtenus par MARGARA (1989) chez le chou-fleur où l'auxine seule, peut déclencher la néoformation de bourgeons.

La BAP (8,87 μM) favorise la callogenèse et l'ANA (10,74 μM) le développement de plants. La présence des deux hormones dans le milieu de culture permet d'obtenir un bourgeonnement et des cals sur les différents explants sans avoir de régénération de plants ; ces données confirment les travaux de PELLEGRINESHI (1997) pour qui la concentration de BAP supérieure à 4,44 μM inhibe le développement des plantules de *Vigna*. L'incorporation de Polyvinylpyrrolidone au milieu ne fait que ralentir ce processus.

La vitrification est observée sur les organes cultivés ce qui pourrait être dû à la cytokinine utilisée. Ce phénomène est également signalé par de nombreux auteurs sur d'autres espèces en présence de BAP dont la concentration dépasse 4,44 μM (KEVERS et GASPARD (1986) ; HARBAOUI et DEBERGH, 1980 et MONCOUSIN, 1982 cités par AID, 1992).

La néoformation de plants observée sur les cotylédons de tadelaght noire d'Aoulef contrairement au haricot à hile noir peut s'expliquer par une différence de réponses liées au génotype. Néanmoins, nos résultats concordent avec les observations de certains auteurs (TETU *et al.*, 1987) qui rapportent que sur *Beta vulgaris*, les cals des cotylédons donnent peu ou pas de bourgeons. De plus, ils confirment ceux de MUTHUKUMAR *et al.*, (1995) et PELLEGRINESHI (1997) pour lesquels les plants de génotypes de *Vigna* répondent différemment en culture *in vitro*. La complexité de régénération de plants chez ce genre serait due aux génotypes.

Des résultats obtenus, il ressort que le développement de plants est variable selon le cultivar, l'organe et l'âge de la plante mère. Nous avons noté que le nombre de plants développés est supérieur chez le haricot à hile noir par rapport à tadelaght. De plus, pour ce qui est des organes, les apex présentent une aptitude au développement de plants plus élevée suivie des nœuds cotylédonaire puis des cotylédons.

Les méristèmes caulinares néoformés *in vitro* peuvent évoluer vers la voie florale ; ce phénomène a été noté sur les essais que nous avons effectués dans le cas du haricot à hile noir (Figure 2c). Ainsi, des vitroplants obtenus à partir de nœuds cotylédonaire repiqués sur milieu additionné de 2,22 μM de BAP, 0,54 μM d'ANA et 0,29 μM de GA₃ développent des bourgeons floraux sur les hampes florales après 25 jours et ce, à l'aisselle des feuilles. Selon MARGARA (1989), l'apparition des bourgeons floraux *in vitro* est observée principalement à partir d'organes inflorescenciels ou floraux avec un nombre limité d'espèces.

Enracinement des vitroplants obtenus

La phase d'enracinement est réalisée *in vitro* sur milieu de MS (1962) dépourvu de régulateurs de croissance (Figure 3). Cependant, l'obtention de plants enracinés est réalisée aussi lorsque les explants sont cultivés en présence d'auxine seule. Les résultats obtenus sont de 100% pour l'ensemble des organes mis en culture.

Acclimatation

Dans le cas de cette expérimentation, les résultats sont satisfaisants. Il y a une combinaison adéquate entre le substrat de culture et la solution nutritive de MS diluée au 1/500^e. La comparaison des solutions d'arrosage montre que cette dernière permet le maintien et le développement de tous les vitroplants en acclimatation (Figure 4) contrairement à celle diluée au 1/50 qui entraîne une dégénérescence de tous les

plants. L'eau courante donne de faibles résultats (10%). Le suivi en acclimatation montre que les plants régénérés *in vitro* fleurissent plutôt que ceux issus de semis et ce, dans le cas des 2 cultivars (Figure 5).

CONCLUSION

Les résultats obtenus sont encourageants sachant les difficultés que présentent les légumineuses à grosses graines en culture *in vitro*. Ils montrent que le haricot dolique possède une aptitude à la régénération de plants par cette méthode à partir de différents explants dont les cotylédons, les apex et les nœuds cotylédonaire. Des observations contraires à la théorie sont relevées comme la présence d'auxine seule dans le milieu de culture qui induit un bourgeonnement sans l'intervention d'une cytokinine.

La comparaison des pourcentages obtenus entre les deux cultivars avec les différents explants mis en culture montre que dans le cas des cotylédons, tadelaght noire d'Aoulef s'est montrée plus réceptive que le haricot à hile noir.

Pour les apex, 26,78% des explants ont permis une néoformation de plants sur le cultivar à hile noir alors que seulement 19,64% sont enregistrés dans le cas de tadelaght. Pour les nœuds cotylédonaire, le taux de régénération est égal à 14,28% chez le premier cultivar et 7,14% chez le second.

Les plants obtenus sont enracinés puis acclimatés. Le taux de réussite est de 98 à 100% pour les 2 cultivars. Les observations effectuées sur les vitroplants en comparaison avec des plants issus de semis permettent de noter quelques différences :

- les feuilles sont lisses et quelques unes ne comportent que 2 folioles ;
- la tige porte des entre-nœuds plus développés à la base ;
- la floraison est avancée d'une semaine.

Références bibliographiques

AID A., 1992. Régénération de l'artichaut (*Cynara scolymus* L.) par culture de tissus foliaires et de la zone de bourgeons axillaires. - Evolution du métabolisme azoté au cours d'une recherche préliminaire de l'embryogenèse somatique. Thèse de doctorat, UFR. des sciences de l'environnement, université d'Angers, 189 p.

BRAR M.S., AL-KHAYRY J.M., SHAMBLIN C.E., MCNEW R.W., MORELOCK T.E., ANDRSON E.J., 1997. *In vitro* shoot tip multiplication of cowpea *Vigna unguiculata* (L.) Walp. *In vitro* cellular and developmental biology Plant. Vol. 33 (2) : 114-118;

HELLER R., ESNAULT R., LANCE C., 2000. Physiologie végétale. Tome 2 - développement. Ed. Masson, 366 p.

JAIN R.K., CHOWDHURY J.B., SHARMA D.R., FRIED, W., 1988. Genotypic and media effects on plant regeneration from cotyledon explant cultures of some Brassica species. *Plant cell, tissue and organ culture*, 14 : 197-206.

KEVERS C., GASPAS T., 1986. Vitrification of carnation *in vitro*. Changes in water content, extracellular space, air volume and ion levels. *Physiol. Vég.* 24 : 647-453.

MARGAR J., 1989. Bases de la multiplication végétative : les méristèmes et l'organogenèse. INRA Versailles, 254 p.

MURASHIGE T., SKOOG F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473-497;

MUTHUKUMAR B., MARIAMMA M., GHANAM A., 1995. Regeneration of plants from primary leaves of cowpea. *Plant cell and organ culture*. Vol.42 (2) : 153-155

PELLEGRINESCHI A., 1997. *In vitro* plant regeneration via organogenesis of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). *Plant cell reports*. Vol. 17 (2) : 89 -95

RASTOGI R., SAWHNEY R.K., 1989. *In vitro* development of angiosperm floral buds and organs. *Plant cell tissue and organ culture*, pp : 145-174

SANGWAN R., 1987. Physiologie végétale : embryogenèse somatique et régénération *in vitro* chez trois variétés précoces de soja. C.R. Acad. Sci., Paris Série 3, pp : 613-617

TETU T., SANGWAN R.S., SANGWAN-NORREEL B.S., 1987. Hormonal control of organogenesis and somatic embryogenesis in Beta vulgaris callus. *Journal of Experimental Botany*. Vol 38 (188) : 506-517

Liste des tableaux et des figures

Tableau I. Structures obtenues sur cultures d'organes du cultivar haricot à hile noir (24 répétitions)

- (1) : combinaison hormonale d'ANA-BAP-GA3
- (2) : régulateur de croissance utilisé individuellement

Tableau II. Structures obtenues sur cultures d'organes du cultivar tadelaght noire d'Aoulef (24 répétitions)

- (3) : combinaison hormonale d'ANA-BAP-GA3
- (4) : régulateur de croissance utilisé individuellement

Figure 1. Organogenèse observée *in vitro* (racines et pousses) sur cotylédons de haricot dolique (*Vigna unguiculata* L.) Walp.

Figure 2. Organogenèse observée *in vitro* (racines, pousses et bourgeons floraux) à partir de cultures d'apex et de nœuds cotylédonaire.

Figure 3. Rhyzogenèse observée sur plants de haricot à hile noir repiqués sur milieu dépourvu de régulateurs de croissance après 1 semaine de culture.

Figure 4. Plants régénérés *in vitro* après 10 jours d'acclimatation (cultivar à hile noir).

Figure 5. Comparaison de la croissance et du développement des vitroplants avec des plants issus de semis (cultivar à hile noir) - Bf : bourgeon floral.

Tableau I : Structures obtenus sur cultures du cultivar haricot à hile noir (24 répétitions).

Combi- naisons hormonales (µM) ANA-BAP-GA3	Cotylédons			Apex			Nœuds cotylédonaire		
	% cals	% organes Racines (r) Feuilles (f) Bourgeons (b)	% plants	% cals	% organes Racines (r) Feuilles (f) Bourgeons (b)	% plants	% cals	% organes Racines (r) Feuilles (f) Bourgeons (b)	% plants
0,54-2,22-0,29 (1)	-	-	-	33,33	16,66 (b)	0	0	50 (b)	0
0,54-4,44-0,29 (1)	-	-	-	33,33	16,66 (b)	8,33	25	8,33 (b)	0
0,54-8,88-0,29 (1)	58,33	33,33 (r)	0	41,66	8,33 (b)	0	33,33	0	0
0,54-111-0,29 (1)	79,16	0	0	-	-	-	-	-	-
BAP = 8,88 (2)	50	25 (r)	0	-	-	-	-	-	-
AIB = 9,8 (2)	16,66	16,66	0	0	0	60	0	0	30
ANA=10,74 (2)	66,66	66,66	0	0	0	80	10	0	50

(1) : combinaison hormonale d'ANA-BAP-GA3

(2) : régulateur de croissance utilisé individuellement.

Tableau II : Structures obtenus sur cultures d'organes du cultivar tadelaght noire d'Aoulef (24 répétitions).

Combi- naisons hormonales (µM) ANA-BAP-GA3	Cotylédons			Apex			Nœuds cotylédonaire		
	% cals	% organes Racines (r) Feuilles (f) Bourgeons (b)	% plants	% cals	% organes Racines (r) Feuilles (f) Bourgeons (b)	% plants	% cals	% organes Racines (r) Feuilles (f) Bourgeons (b)	% plants
0,54-2,22-0,29 (1)	-	-	-	25	50 (b)	0	0	25 (b)	0
0,54-4,44-0,29 (1)	-	-	-	33,33	33,33 (b)	0	16,66	8,33 (b)	0
0,54-8,88-0,29 (1)	16,66	16,66 (r)	0	58,33	33,33 (b)	0	50	0	0
0,54-111-0,29 (1)	66,66	0	0	-	-	-	-	-	-
BAP = 8,88 (2)	16,66	16,66	16,66	-	-	-	-	-	-
AIB = 9,8 (2)	33,33	33,33	0	0	0	60	0	10 (b)	20
ANA = 10,74 (2)	33,33	25	8,33	10	0	50	20	0	20

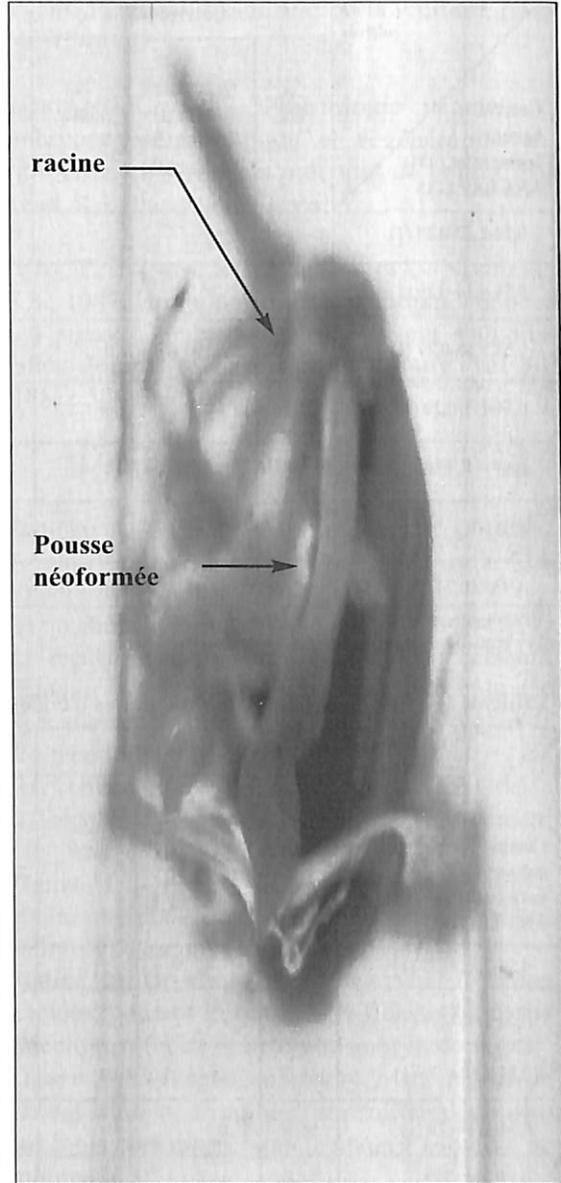
(1) : combinaison hormonale d'ANA-BAP-GA3

(2) : régulateur de croissance utilisé individuellement.

Figure 1 : Organogenèse observée sur cotylédons de haricot dolique.

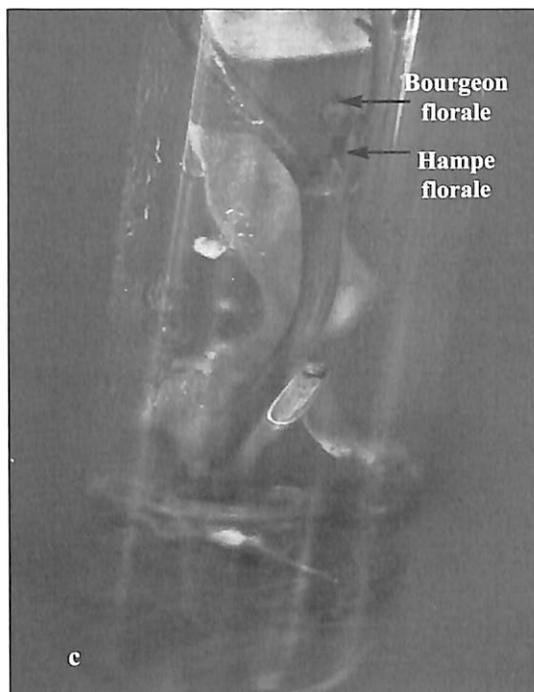
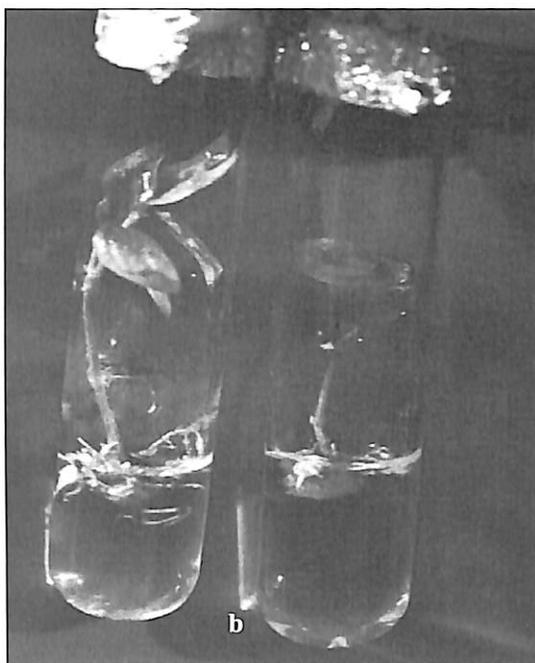
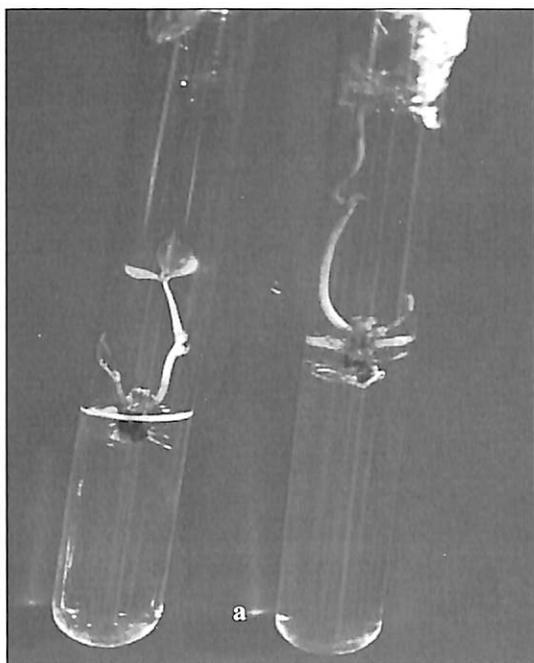


a- Formation de racine sur cotylédon du haricot à hile noir après 2 semaines de culture sur milieu de MS + BAP 2,22 μ M.



b- Néoformation de pousse sur cotylédon du cultivar tadelaght après 4 semaines sur milieu de MS + ANA (10,74 μ M).

Figure 2 : Organogénèse observée *in vitro* à partir d'apex et de nœuds cotylédonaire.



a. Nœuds cotylédonaire sur milieu MS + ANA (10,74 μ M) après 1 semaine de culture
- à gauche : tadelaght noire d'Aoulef
- à droite : haricot à hile noir

b. Apex cultivés sur milieu MS + ANA (10,74 μ M), après 10 jours de culture
- à gauche : tadelaght noire d'Aoulef
- à droite : haricot à hile noir

c. Bourgeon floral sur vitroplant du cultivar à hile noir repiqué sur milieu MS + BAP (2,22 μ M) + ANA (0,54 μ M) + GA₃ (0,29 μ M) après 25 jours de culture.



Figure 3 : Rhizogenèse observée sur plants de haricot à hile noir repiqués sur milieu dépourvu de régulateurs de croissance après 1 semaine de culture.

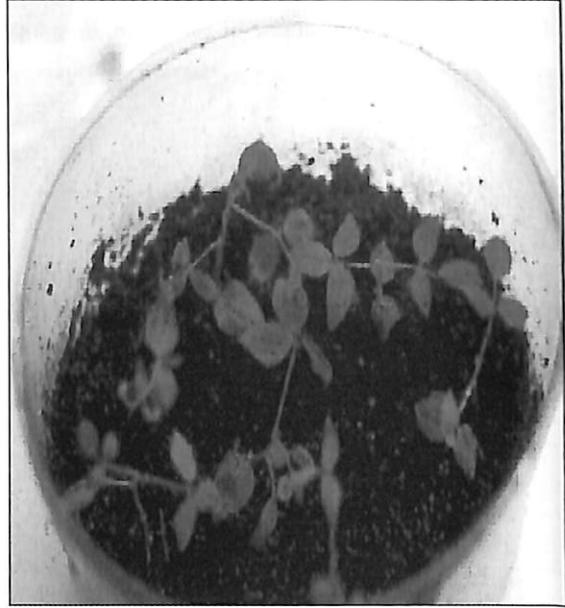


Figure 4 : Plants régénérés *in vitro* après 10 jours d'acclimatation (cultivar à hile noir).

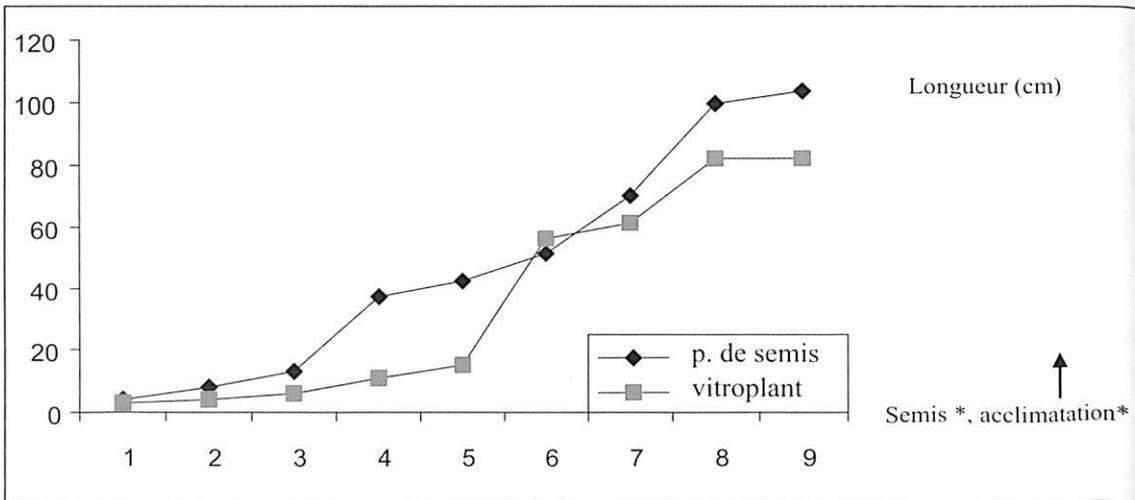


Figure 5 : Comparaison de la croissance et du développement des vitroplants avec des plants issus de semis chez le cultivar à hile noir.

(Bf : bourgeon floral ; * : date du semis pour les plants élevés en pots et d'acclimatation pour les vitroplants).