

# Sélection de cotonniers à teneur variable de gossypol dans ses organes

Approche interspécifique

G. Mergeal<sup>1</sup>    G. Lognay<sup>2</sup>  
A. Maquet<sup>1</sup>    I. Vroh Bi<sup>1</sup>  
H. Ben Bouza<sup>1</sup>    J.-P. Baudoin<sup>1</sup>

## Introduction

Les cotonniers diploïdes sauvages australiens appartenant aux sections *Sturtia* et *Hibiscoidea* du genre *Gossypium* produisent des graines sans terpénoïdes alors que leurs parties aériennes sont pourvues de glandes à gossypol (Brubaker *et al.*, 1996). L'introggression chez la principale espèce de cotonnier cultivé du mécanisme limitant la production de gossypol dans les graines est hautement souhaitable car cela permettrait l'exploitation du cotonnier comme une culture vivrière tout en préservant son principal mode de défense naturel contre les insectes ravageurs. Le gossypol et les autres terpénoïdes produits par le cotonnier sont toxiques pour la plupart des espèces animales y compris les insectes et, malheureusement, les

---

<sup>1</sup> Unité de phytotechnie des régions intertropicales, faculté universitaire des Sciences agronomiques de Gembloux, B-5030 Gembloux, Belgique.

<sup>2</sup> Unité de chimie générale et organique, faculté universitaire des Sciences agronomiques de Gembloux, B-5030 Gembloux, Belgique.

hommes (Altman *et al.*, 1990). Trois schémas de croisement peuvent être suivis pour obtenir l'introgression de l'inhibition de la synthèse du gossypol dans la graine du cotonnier (Mergeai, 1994). Deux d'entre eux donnent naissance à des hybrides trispécifiques et le troisième permet l'exploitation directe d'hybrides bispécifiques. Comme la stratégie de croisement direct entre *G. hirsutum* et une espèce australienne semblait particulièrement difficile à suivre pour réussir l'introgression du caractère recherché (Dilday, 1986 ; Altman *et al.*, 1987 ; Rooney *et al.*, 1991), nous avons décidé de suivre la voie trispécifique. Dans de tels hybrides, tous les chromosomes de l'espèce donneuse australienne sont confrontés au génome de *G. hirsutum* avec une haute probabilité de recombinaison, grâce à l'utilisation de croisements ponts. Ces croisements font intervenir une espèce appartenant à un des deux génomes ancestraux (A ou D) de *G. hirsutum*. Nous avons choisi d'utiliser l'espèce diploïde sauvage américaine *G. raimondii* comme pont pour créer un hybride trispécifique ACDD car le génome D (auquel appartient *G. raimondii*) montre une forte distance phylétique par rapport au génome C alors que la distance phylétique entre le génome A (espèces diploïdes asiatiques) et le génome C est nettement moins grande (Endrizzi *et al.*, 1985).

Au cours des dernières années, de nouvelles stratégies de sélection basées sur l'utilisation de marqueurs de l'ADN moléculaire ont été proposées pour réduire le temps et les efforts nécessaires au développement de nouvelles variétés. Les principes d'utilisation de tels marqueurs ont été décrits en détail chez de multiples plantes cultivées par de nombreux chercheurs (Tanksley *et al.*, 1989 ; Paterson *et al.*, 1991 ; Dudley, 1993 ; Lee, 1998). Cependant, les rapports concernant l'utilisation de tels marqueurs dans des travaux d'amélioration génétique du cotonnier restent relativement rares quand on considère l'importance économique de cette culture. La RAPD a été utilisée pour caractériser des cultivars de cotonnier (Multani et Lyon, 1995), pour évaluer la variabilité au sein de variétés élites (Tatieni *et al.*, 1996 ; Iqbal *et al.*, 1997) et pour assister la réalisation d'un programme de sélection récurrente à partir d'hybrides interspécifiques (Mergeai *et al.*, 1998). La technique AFLP est utilisable dans les mêmes conditions d'application que les marqueurs RAPD. Elle est en général considérée comme plus fiable et plus performante compte tenu de sa meilleure répétabilité et du plus

grand nombre de marqueurs générés par réaction (Vos *et al.*, 1995). Peu d'applications des marqueurs RFLP sont mentionnées (Wang *et al.*, 1995 ; Shappley *et al.*, 1996 ; Meredith et Brown, 1998). Une carte RFLP du cotonnier est actuellement en construction (Reinisch *et al.* 1994) et offre un nouvel outil pour analyser l'introggression de matériel génétique. L'emploi de ces différentes techniques est très utile pour évaluer le degré de similitude génétique existant entre les matériels issus du rétrocroisement d'hybrides interspécifiques et le cotonnier cultivé ainsi que pour cartographier les segments d'ADN d'espèces diploïdes donneuses introgressés chez les différents hybrides tétraploïdes obtenus dans le cadre de programmes d'hybridation interspécifique.

## Matériel et méthode

Le matériel végétal comprend l'hybride trispécifique *G. hirsutum* x *G. raimondii* x *G. sturtianum* et ses parents. Le schéma d'obtention détaillé de l'hybride trispécifique est présenté dans Mergeai *et al.* (1997). Cet hybride a été rétrocroisé par les variétés C2 et *stam F* de *G. hirsutum* pour donner une descendance BC<sub>1</sub>, BC<sub>2</sub>, BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub> et BC<sub>3</sub> (fig. 1).

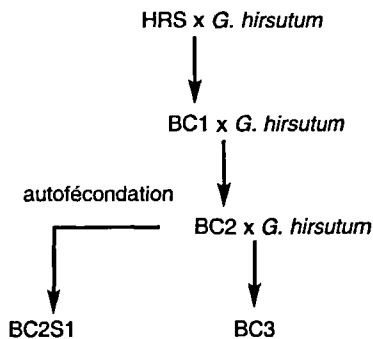


Figure 1

Schéma suivi pour l'obtention du matériel analysé.

BC<sub>1</sub>, BC<sub>2</sub>, BC<sub>3</sub> = hybrides rétrocroisés de 1<sup>re</sup>, 2<sup>e</sup> et 3<sup>e</sup> génération.

BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub> = matériel issu de l'autofécondation d'un hybride rétrocroisé de 2<sup>e</sup> génération.

Les croisements ont été réalisés en utilisant le mélange d'hormones proposé par Altman (1988) : 100 mg.l<sup>-1</sup> d'acide naphthoxyacétique + 50 mg.l<sup>-1</sup> d'acide gibberellique. La majorité des embryons hybrides a été cultivée *in vitro* après maturation complète de la graine sur le milieu de Stewart et Hsu (1977) de manière à garantir leur bonne germination et un bon démarrage des plantules. La densité de glandes à gossypol sur les graines produites par rétrocroisement a été évaluée en utilisant une échelle variant de 0 pour les graines totalement dépourvues de glande à 10 pour les graines dont la densité de glandes était semblable à celle de l'espèce cultivée. L'évaluation de la densité en glandes à gossypol a été réalisée après élimination des téguments et trempage de l'amande pendant une heure dans de l'eau stérile. Les analyses méiotiques des matériels produits ont été réalisées sur des boutons floraux fixés pendant 72 heures dans la solution de Carnoy (éthanol 95 % : chloroforme : acide acétique glacial, 6:3:1 v : v : v). Au moins 26 cellules mère du pollen ont été analysées pour chaque génotype (Vroh *et al.*, 1998).

La teneur en gossypol des graines a été évaluée par chromatographie à haute performance en phase liquide en adaptant la méthode proposée par Marquié et Bourély (1991) pour réaliser une analyse graine par graine.

La teneur en terpénoïdes des boutons floraux a été évaluée par chromatographie à haute performance en phase liquide au moyen de la méthode proposée par Stipanovic *et al.* (1988).

L'ADN génomique total des plantes obtenues a été extrait en utilisant la méthode développée par Vroh Bi *et al.* (1996).

Les réactions AFLP ont été réalisées en utilisant le kit d'analyse AFLP I (Life Science Technologies, Merelbeke, Belgique) et selon le protocole proposé par le producteur. Les cinq combinaisons suivantes de sondes ont été utilisées dans cette étude :

C1 = *EcoRI* + AAC/*MseI* + CAA,

C2 = *EcoRI* + AAC/*MseI* + CTT,

C3 = *EcoRI* + AAG/*MseI* + CTT,

C6 = *EcoRI* + ACT/*MseI* + CAG,

C9 = *EcoRI* + ACG/*MseI* + CTA.

La présence (1) ou l'absence (0) des bandes AFLP a été notée de manière à évaluer la similarité génétique des génotypes comparés

en utilisant le coefficient de Jaccard. Un dendrogramme basé sur ces coefficients a été construit en utilisant la méthode UPGMA (unweighted pair group method average) sur le logiciel Systat version 8.0 (SPSS Inc. Chicago, Ill.).

L'analyse RFLP a été effectuée en utilisant 49 inserts sélectionnés sur la carte RFLP de Reinisch *et al.* (1994). Après amplification par PCR, ces inserts ont été utilisés comme sondes RFLP selon la méthode décrite par Vroh bi *et al.* (1999 b).

L'introggression de fragments d'ADN en provenance des espèces sauvages a été évaluée chez les hybrides en analysant les profils montrant un polymorphisme entre les espèces parentales pour la combinaison sonde/enzyme testée. Quand la disposition des bandes de l'hybride et de leur descendance rétrocroisée était similaire à celle observée chez le parent sauvage pour les marqueurs RFLP, les résultats ont été considérés comme indiquant une introggression d'un fragment du chromosome du parent sauvage au niveau du locus RFLP concerné. Les marqueurs RFLP flanquants, du marqueur supposé positif, ont ensuite été vérifiés quand ils étaient disponibles pour déterminer la taille approximative des segments introggressés en centimorgans. Quand les marqueurs adjacents n'étaient pas positifs, il a été supposé que la recombinaison avait eu lieu juste au milieu.

## ■ Résultats

### *Production de plantes introggressées*

Les tableaux 1 et 2 reprennent respectivement le nombre d'individus obtenus à chaque génération de rétrocroisement et la distribution de fréquence des densités de glandes observées chez ces hybrides. Sur les 51 graines BC<sub>1</sub> issues de l'hybride HRS, seulement 3 (6 %) étaient totalement démunies de glandes à gossypol (niveau 0). La distribution de fréquence des densités de glandes à gossypol chez le reste des graines BC<sub>1</sub> présentait une forme asymétrique avec une représentation plus importante des niveaux bas et intermédiaires

BC<sub>1</sub>, BC<sub>2</sub>, BC<sub>3</sub> = hybrides rétrocroisés de 1<sup>re</sup>, 2<sup>e</sup> et 3<sup>e</sup> génération.

BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub> = matériel issu de l'autofécondation d'un hybride rétrocroisé de 2<sup>e</sup> génération.

Années	BC <sub>1</sub>		BC <sub>2</sub>		BC <sub>2</sub> S <sub>1</sub>		BC <sub>3</sub>	
	Nombre graines utilisées	Nombre plantes adultes	Nombre graines utilisées	Nombre plantes adultes	Nombre graines utilisées	Nombre plantes adultes	Nombre graines utilisées	Nombre plantes adultes
1994	17	6						
1995	13	0	6	0				
1996	9	0	3	3				
1997	12	10	21	11	18	11	6	5
Total	51	16	30	14	18	11	6	5

Tableau 1

Nombre de plantes produites à partir de graines obtenues en rétrocroisant l'hybride HRS.

Classes de densité	BC <sub>1</sub>	BC <sub>2</sub>	BC <sub>2</sub> S <sub>1</sub>	BC <sub>3</sub>
0 - 3	23	6	10	4
4 - 6	19	10	5	11
7 - 10	9	1	3	4
Total	51	17	18	19

Tableau 2

Distribution de la densité de glandes à gossypol des graines chez la descendance de l'hybride HRS.

(niveaux 2 à 5). Un nombre très variable de plantes adultes a été obtenu à partir des graines BC<sub>1</sub> en fonction de leur année de mise en culture (tabl. 1). Après l'obtention d'un nombre relativement élevé de plantes adultes la 1<sup>re</sup> année, aucune plante adulte ne fut produite les deux années suivantes malgré la culture *in vitro* systématique des embryons matures. Ce problème peut sans doute être attribué à une forte dormance des graines qui avaient été cultivées moins de six mois après leur récolte. Pour éliminer cette dormance supposée, les semis furent retardés de deux mois en 1997 et toutes les graines furent plongées pendant deux minutes dans un bain d'eau à 70 °C avant d'être cultivées *in vitro*. Ces mesures permirent une augmentation considérable du taux de production de plantes adultes à partir de graines BC<sub>1</sub> (de 0 à 50 %). Toutes les plantes BC<sub>1</sub> issues de graines présentant une faible densité de glandes (niveaux 0 à 3) ont été rétrocroisées systématiquement avec une variété de cotonnier à

densité de glandes normale. Parmi toutes les plantes issues de ces rétrocroisements, un seul génotype a produit des graines  $BC_2$ . La majorité de celles-ci montraient une densité de glandes à gossypol faible à intermédiaire (tabl. 2). Seulement 6 plantes adultes furent obtenues sur un total de 21 graines  $BC_2$ . Deux de ces 6 plantes ont donné 18 graines  $BC_2S_1$  et 19 graines  $BC_3$ , avec à nouveau une majorité d'entre elles présentant une densité de glandes faible à intermédiaire. La fertilité du matériel rétrocroisé s'est améliorée sensiblement à mesure de l'avancement dans les générations. La coloration du pollen à l'acéto carmin (tabl. 3) a donné des résultats très bas chez l'hybride trispécifique et chez sa descendance  $BC_1$  (moins de 10 % de grains colorés). Ces résultats se sont sensiblement améliorés en  $BC_2$  (jusqu'à 60 % de grains colorés) et en  $BC_3$  (jusqu'à 80 % de grains colorés). En moyenne, quatre croisements ont été nécessaires pour obtenir une graine  $BC_2$  tandis qu'un seul rétrocroisement d'une plante  $BC_2$  a donné environ 5 graines  $BC_3$  (données non montrées). Les plantes  $BC_2S_1$  ont produit en moyenne moins d'une graine par rétrocroisement ; leur niveau de fertilité est donc nettement plus faible que celui du matériel  $BC_3$ .

$BC_1$ ,  $BC_2$ ,  $BC_3$  = hybrides rétrocroisés de 1<sup>re</sup>, 2<sup>e</sup> et 3<sup>e</sup> génération.

$BC_2S_1$  = matériel issu de l'autofécondation d'un hybride rétrocroisé

de 2<sup>e</sup> génération/nombre = numéro du génotype analysé au sein de chaque génération.

Génotypes	Configurations chromosomiques à la Métaphase I					Nombre de chromosomes	Tétrades normales	Tétrades anormales	% pollen fertile
	I	II	III	IV	VI				
HRS	14,40	17,03	0,93	0,10	0,07	52	124	876	8,9
BC1/1	6,45	22,56	0,3	0,10		53	808	192	9,5
BC2/1		3,83	23,61	0,31		52	820	180	60,5
BC3/1/1	3,83	23,55	0,30			52	807	193	67,5
BC3/1/4	3,01	25,30	0,14			54	980	20	54,0
BC3/1/5	3,33	23,90	1			54	1 000	0	95,0
BC3/1/8	1,10	25,43	0,10			52	850	150	47,5
BC3/1/12	2	24,60	0,23	0,51		54	252	748	79,6
BC2S1/6	4,50	22,66	0,70			52	854	146	45,3
BC2S1/8	4,83	22,73	0,60			52	910	90	78,9
BC2S1/13	1,71	24,72	0,21	0,07		52	823	177	96,2
BC2S1/14	15,80	15,80	1,60			52	1 000	0	88,4

Tableau 3

Microsporogénèse et fertilité polinique  
chez l'hybride HRS et sa descendance.

Certaines plantes  $BC_3$  et  $BC_2S_1$  sont auto-fertiles même sans l'application de régulateurs de croissance au moment de la pollinisation. Leur descendance sera utilisée pour évaluer le déterminisme de l'inhibition de la synthèse du gossypol dans la graine. Les résultats obtenus jusqu'à présent laissent penser que ce caractère est sans doute sous la dépendance d'un nombre restreint de gènes dominants. Plus des deux tiers des graines produites à chaque génération de rétrocroisement présentent une diminution importante de leur densité de glandes à gossypol alors que le reste des graines produites montre une densité de glandes similaire à celle de l'espèce cultivée.

### *Analyse cytogénétique du matériel produit*

L'analyse cytogénétique de la descendance de l'hybride trispécifique a mis en évidence une très grande variation dans le nombre de chromosomes chez les plantes  $BC_1$  et  $BC_2$ . Sur un total de 8 plantes  $BC_1$  analysées, 3 présentaient entre 2 et 4 chromosomes surnuméraires et une plante se caractérisait par l'absence de trois chromosomes (données non montrées). Les autres plantes étaient euploïdes avec  $2n = 4x = 52$  chromosomes (Vroh bi *et al.*, 1998). La plante  $BC_1$  qui a produit une descendance  $BC_2$  se caractérisait par un haut niveau d'association chromosomique (bi, tri, quadri et hexavalents) en métaphase I. Elle montrait également un nombre moyen élevé de chiasmata, indice de fréquents échanges de matériel génétique (tabl. 3). Deux des trois individus  $BC_2$  que nous avons analysés cytogénétiquement étaient euploïdes. Le dernier présentait seulement 49 chromosomes et était complètement stérile. Les premiers résultats de l'analyse cytogénétique des individus  $BC_2S_1$  et  $BC_3$  montrent que la grande majorité de ces génotypes est euploïde ( $2n = 4x = 52$ ) mais que certains d'entre eux présentent également des chromosomes additionnels (tabl. 3).

### *Quantification de l'expression du caractère recherché*

Les tableaux 4 et 5 donnent les teneurs en terpenoïdes observées au niveau des boutons floraux et des graines produites par les meilleurs



Génotype	Nombre boutons analysés	Teneur totale en terpénoïdes mg.kg <sup>-1</sup>	G mg.kg <sup>-1</sup>	H1 mg.kg <sup>-1</sup>	H2 mg.kg <sup>-1</sup>	H3 mg.kg <sup>-1</sup>	H4 mg.kg <sup>-1</sup>	HGQ mg.kg <sup>-1</sup>
Parents								
<i>G. hirsutum</i>	6	254	60	38	64	25	30	36
<i>G. raimondii</i>	3	1 164	1 056					108
<i>G. sturtianum</i>	3	23	9					13
Allohexaploïde intermédiaire [ <i>G.hirsutum</i> x <i>G.sturtianum</i> ] <sub>2</sub>	2	304	81	28		53	66	76
Descendance rétrocroisée de HRS								
BC <sub>2</sub> S <sub>1</sub> /9	5	254	160	22	24	8	15	26
BC <sub>3</sub> /9	1	236	166	21	24	6	16	4

Tableau 4

Teneur en terpénoïdes

(G = gossypol, H1, H2, H3, H4 = Heliocides, HGQ = hémigossypolone) des boutons floraux des parents et de la descendance rétrocroisée de l'hybride HRS.

BC<sub>3</sub> = hybride rétrocroisé de 3<sup>e</sup> génération.

BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub> = matériel issu de l'autofécondation d'un hybride rétrocroisé de 2<sup>e</sup> génération/nombre = numéro du génotype analysé au sein de chaque génération.

Génotype	Nombre de graines analysées	Teneur moyenne mg.kg <sup>-1</sup>	Teneur minimale mg.kg <sup>-1</sup>	Teneur maximale mg.kg <sup>-1</sup>	Ecart-type mg.kg <sup>-1</sup>	Coefficient de variation %
Parents						
<i>G. hirsutum</i>	16	9 700	6 700	14 000	1 800	18,4
<i>G. raimondii</i>	6	23 300	19 150	26 940	3 400	14,8
<i>G. sturtianum</i>	5	6	< 6	13	6	100
Allohexaploïde intermédiaire [ <i>G.hirsutum</i> x <i>G.sturtianum</i> ] <sub>2</sub>	9	300	70	570	100	56,6
Descendance rétrocroisée de HRS						
BC <sub>2</sub> S <sub>1</sub> /1/9	16	3 300	480	8 750	2 200	66,2
BC <sub>3</sub> /9	9	4 500	1 500	6 000	1 400	31,2

Tableau 5

Teneur totale en gossypol des graines des parents et de la descendance rétrocroisée de l'hybride HRS.

BC<sub>3</sub> = hybride rétrocroisé de 3<sup>e</sup> génération.

BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub> = matériel issu de l'autofécondation d'un hybride rétrocroisé de 2<sup>e</sup> génération/nombre = numéro du génotype analysé au sein de chaque génération.

matériels BC<sub>3</sub> et BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub> sélectionnés à Gembloux. Toutes les plantes analysées présentent une teneur totale en terpénoïdes dans les boutons floraux similaire à celle de l'espèce cultivée. La teneur en gossypol a été évaluée dans un nombre limité de graines par génotype (de 5 à 16). Les résultats obtenus montrent que le mécanisme inhibant la synthèse de gossypol dans les graines de *G. sturtianum* fonctionne aussi dans des structures synthétiques telles que l'allohexaploïde [*G. hirsutum* x *G. sturtianum*] 2. Environ un dixième des graines (2 sur 20) produites par le meilleur génotype BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub> issu de l'autofécondation d'une plante BC<sub>2</sub> contenait moins de 500 mg de gossypol par kg. Selon le groupe consultatif de la FAO et de l'OMS responsable de l'établissement des normes relatives à la valeur alimentaire des protéines, la teneur en gossypol libre des produits comestibles issus de graines de cotonnier ne doit pas dépasser 600 mg.kg<sup>-1</sup> pour que ces produits soient consommables sans risque par les populations humaines. Les plantes que nous avons obtenues constituent donc un matériel très intéressant pour développer des cotonniers présentant une très faible teneur en gossypol dans la graine et une haute teneur en terpénoïdes dans les organes reproducteurs de la plante.

### *Utilisation des marqueurs de l'ADN moléculaire*

Le nombre de bandes générées par chaque combinaison de sondes AFLP chez les espèces parentales variait de 72 pour la combinaison C6 (*Eco*RI + *ACT/Mse*I + CAG) à 132 pour la combinaison C2 (*Eco*RI + *AAC/Mse*I + CTT), avec un nombre moyen de 96 bandes par combinaison. Les cinq combinaisons de sondes ont amplifié un nombre total de 477 fragments d'ADN parmi lesquels 417 (87,4 %) étaient polymorphes. L'introgression de bandes AFLP spécifiques de chaque parent a permis de confirmer l'origine interspécifique de l'hybride HRS. Sur les 70 fragments spécifiques de l'espèce donneuse *G. sturtianum*, 45 étaient présents chez l'hybride HRS et 43 se retrouvaient dans sa descendance BC<sub>1</sub>. A côté des bandes spécifiques de chaque espèce parentale (*G. hirsutum*, *G. sturtianum*, *G. raimondii*), quelques bandes AFLP polymorphes étaient communes à un ou deux parents. Les marqueurs qui ne sont pas transmis lors de chaque génération à la descendance sont soit situés sur

des chromosomes qui ne sont pas inclus dans les gamètes lors de la méiose, ou constituent des marqueurs qui subissent des recombinaisons modifiant les sites de liaison des sondes. Quatre marqueurs spécifiques de *G. sturtianum* (génomme C) étaient systématiquement présents chez toutes les plantes obtenues par rétrocroisement de l'hybride HRS. De tels fragments peuvent provenir de chromosomes qui sont préférentiellement transmis à la descendance du fait de leur haute affinité d'appariement avec les chromosomes des autres parents, ou correspondent à des séquences répétées d'ADN distribuées dans l'ensemble du génome de l'espèce donneuse.

Le degré d'apparement des génotypes étudiés a été évalué par une analyse de similarité en utilisant le coefficient de Jaccard (1908). Le tableau 6 montre la matrice de similarité obtenue entre les espèces parentales, l'hybride trispécifique et les descendance obtenues par rétrocroisement. Tous les individus BC<sub>2</sub>, BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub> et BC<sub>3</sub> repris au tableau 6 proviennent d'une seule plante BC<sub>1</sub> obtenue en croisant HRS par le cultivar C2 de *G. hirsutum*. La similarité entre l'espèce cultivée et les parents sauvages était respectivement de 29,5 % pour *G. sturtianum* et de 43,2 % pour *G. raimondii* ce qui est conforme aux données disponibles concernant l'apparement existant entre le sous-génomme D de *G. hirsutum* et le parent diploïde américain (Endrizzi *et al.*, 1985). Avec un taux de similarité de 66,2 %, l'hybride trispécifique HRS est plus proche du parent cultivé que les deux espèces diploïdes sauvages utilisées pour sa création. Le dendrogramme généré par l'analyse UPGMA des profils de marqueurs obtenus pour les génotypes analysés est présenté dans la figure 2. Les positions des espèces parentales dans ce dendrogramme sont en accord avec la classification phylogénique actuelle du genre *Gossypium* basée sur des données morphologiques et cytogénétiques (Endrizzi *et al.*, 1985). L'espèce diploïde australienne est la première à être séparée, suivie par *G. raimondii*. Le cotonnier cultivé est groupé avec l'hybride trispécifique et sa descendance obtenue par rétrocroisement. L'examen des générations obtenues par rétrocroisements successifs de l'hybride trispécifique montre que l'augmentation du degré de similarité chez ces matériels n'est pas évidente, surtout dans le cas des souches obtenues par autofécondation d'un individu introgressé issu d'un rétrocroisement. L'analyse de la similarité génétique au moyen de marqueurs AFLP devrait donc permettre de faciliter l'identification à chaque génération des individus

	Hirs	Raim	Sturt	HRS	BC <sub>1</sub> /1	BC <sub>2</sub> /1/3	BC <sub>2</sub> S <sub>1</sub> /5	BC <sub>2</sub> S <sub>1</sub> /7	BC <sub>2</sub> S <sub>1</sub> /9	BC <sub>2</sub> S <sub>1</sub> /11	BC <sub>2</sub> S <sub>1</sub> /12	BC <sub>2</sub> /1/1	BC <sub>2</sub> /1/2	BC <sub>2</sub> /1/6	BC <sub>2</sub> /1/8	BC <sub>2</sub> /1/11	BC <sub>2</sub> /1/14	BC <sub>2</sub> /1/15	BC <sub>2</sub> /3/1	BC <sub>2</sub> /3/5	
Hirs	1,000	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Raim	0,432	1,000	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Sturt	0,295	0,281	1,000	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
HRS	0,662	0,477	0,478	1,000	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
BC <sub>1</sub> /1	0,720	0,420	0,411	0,799	1,000	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
BC <sub>2</sub> /1	0,750	0,439	0,373	0,740	0,850	1,000	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
BC <sub>2</sub> /1/3	0,801	0,434	0,338	0,711	0,844	0,866	1,000	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
BC <sub>2</sub> S <sub>1</sub> /5	0,768	0,448	0,363	0,776	0,807	0,811	0,858	1,000	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
BC <sub>2</sub> S <sub>1</sub> /7	0,773	0,424	0,361	0,736	0,803	0,791	0,843	0,914	1,000	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
BC <sub>2</sub> S <sub>1</sub> /9	0,765	0,435	0,366	0,721	0,781	0,769	0,825	0,896	0,961	1,000	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
BC <sub>2</sub> S <sub>1</sub> /11	0,745	0,424	0,362	0,735	0,781	0,769	0,802	0,898	0,890	0,872	1,000	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
BC <sub>2</sub> S <sub>1</sub> /12	0,745	0,427	0,341	0,701	0,758	0,770	0,827	0,858	0,843	0,847	0,823	1,000	.	.	.	.	.	.	.	.	.
BC <sub>2</sub> /1/1	0,790	0,439	0,321	0,689	0,756	0,793	0,866	0,870	0,858	0,833	0,830	0,928	1,000	.	.	.	.	.	.	.	.
BC <sub>2</sub> /1/2	0,798	0,435	0,335	0,713	0,781	0,805	0,853	0,884	0,870	0,857	0,855	0,901	0,963	1,000	.	.	.	.	.	.	.
BC <sub>2</sub> /1/6	0,805	0,434	0,335	0,727	0,807	0,822	0,882	0,914	0,888	0,875	0,890	0,883	0,907	0,929	1,000	.	.	.	.	.	.
BC <sub>2</sub> /1/8	0,761	0,446	0,355	0,718	0,773	0,775	0,831	0,879	0,870	0,858	0,855	0,837	0,846	0,875	0,899	1,000	.	.	.	.	.
BC <sub>2</sub> /1/11	0,766	0,440	0,354	0,739	0,806	0,794	0,852	0,917	0,921	0,893	0,864	0,871	0,873	0,903	0,903	1,000	.	.	.	.	.
BC <sub>2</sub> /1/14	0,691	0,420	0,338	0,677	0,755	0,747	0,775	0,811	0,818	0,827	0,788	0,774	0,747	0,789	0,823	0,801	0,844	1,000	.	.	.
BC <sub>2</sub> /1/15	0,769	0,425	0,340	0,737	0,799	0,837	0,851	0,917	0,892	0,898	0,825	0,879	0,880	0,874	0,892	0,880	0,933	0,914	1,000	.	.
BC <sub>2</sub> /3/1	0,681	0,436	0,335	0,677	0,741	0,737	0,775	0,806	0,807	0,822	0,783	0,769	0,737	0,789	0,801	0,784	0,838	0,922	0,896	1,000	.
BC <sub>2</sub> /3/5	0,664	0,435	0,344	0,653	0,714	0,700	0,743	0,786	0,780	0,801	0,727	0,737	0,745	0,738	0,757	0,754	0,793	0,913	0,902	0,926	1,000

Tableau 6

Matrice de similarité basée sur le coefficient de Jaccard pour les espèces parentales, l'hybride trispécifique HRS et ses descendances obtenues par rétrocroisement. STURT = *G. sturtianum*, RAIM = *G. raimondii*, HIRS = *G. hirsutum*, HRS = hybride trispécifique *G. hirsutum* x *G. raimondii* x *G. sturtianum*. BC<sub>1</sub>, BC<sub>2</sub>, BC<sub>3</sub> = hybrides rétrocroisés de 1<sup>re</sup>, 2<sup>e</sup> et 3<sup>e</sup> génération, BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub> = matériel issu de l'autofécondation d'un hybride rétrocroisé de 2<sup>e</sup> génération/nombre = numéro du génotype analysé au sein de chaque génération.

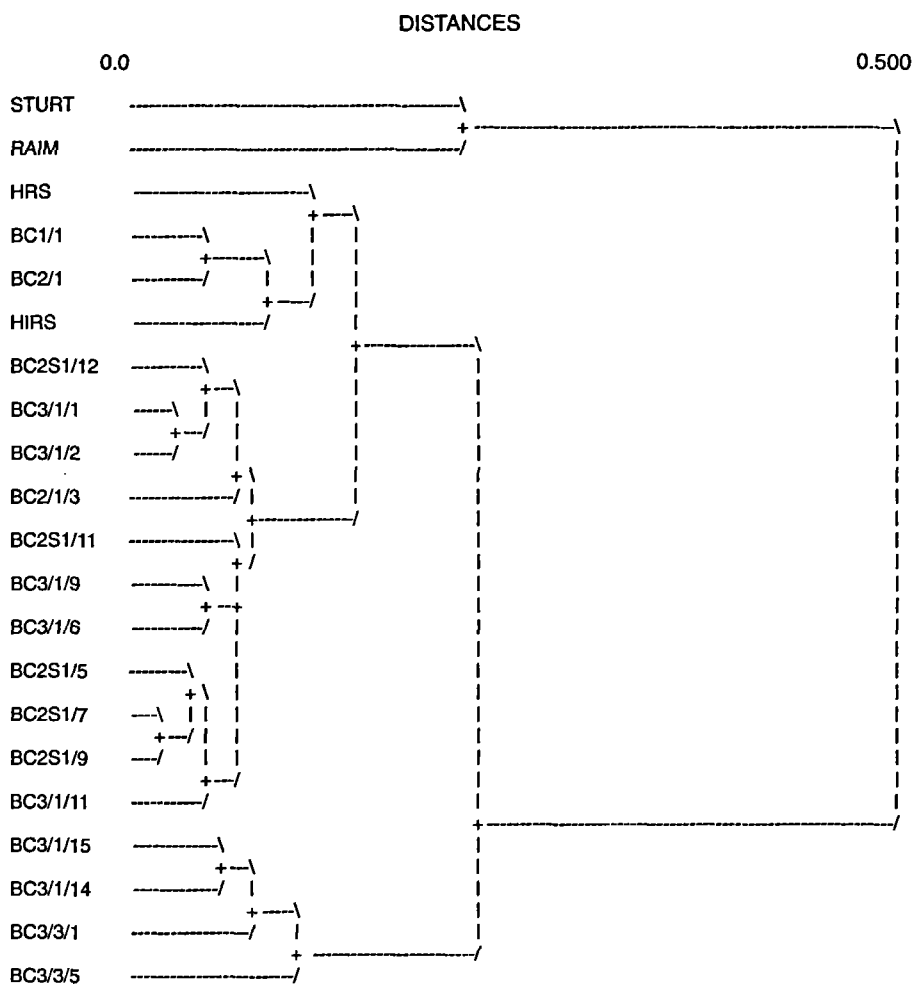


Figure 2

Relations génétiques entre les espèces parentales (*G. hirsutum*, *G. raimondii*, *G. sturtianum*), l'hybride HRS et sa descendance obtenue par rétrocroisement : dendrogramme établi sur base de l'analyse des données AFLP grâce à l'utilisation de la méthode UPGMA et le coefficient de similarité de Jaccard.

STURT = *G. sturtianum*, RAIM = *G. raimondii*, HIRS = *G. hirsutum*, HRS = hybride trispécifique *G. hirsutum* x *G. raimondii* x *G. sturtianum*. BC<sub>1</sub>, BC<sub>2</sub>, BC<sub>3</sub> = hybrides rétrocroisés de 1<sup>re</sup>, 2<sup>e</sup> et 3<sup>e</sup> génération, BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub> = matériel issu de l'autofécondation d'un hybride rétrocroisé de 2<sup>e</sup> génération/nombre = numéro du génotype analysé au sein de chaque génération.

à la fois les plus intéressants au niveau de l'expression du caractère recherché et génétiquement les plus proches de l'espèce cultivée.

Sur les 49 marqueurs RFLP analysés, 10 combinaisons sonde/enzyme ont détecté une introgression de segments d'ADN de l'espèce donneuse *G. sturtianum* chez l'hybride trispécifique et chez sa descendance obtenue par rétrocroisement par *G. hirsutum* (tabl. 7).

Groupes de liaison	Marqueurs RFLP	Enzymes de restriction	Présence (+), absence (-) des marqueurs <i>G. sturtianum</i> dans la descendance de l'hybride HRS			
			BC <sub>1</sub> (12)	BC <sub>2</sub> (4)	BC <sub>2</sub> S <sub>1</sub> (10)	BC <sub>3</sub> (12)
Chrs 1	A1204	EcoRI	+++ - + + + - + + + - + + + - - - - - - - - + + - - - - - - - - + - - - - -			
	A1794	EcoRI	- + - - - - - + + + - + -			
Chrs 10	A1183	HindIII	+ + + + + + + + + + + + - + -			
Chrs 15	A1109	EcoRV	+ + + + + - + - + + - + + -			
Chrs 22	A1310	CfoI	+ - - + - - - - + + + - + + -			
	G1074	EcoRI	- - - - - + - - - + - - - + -			
A07-U07	A1135	EcoRV	+ + + + - - - - - - - - + -			
D04-Chrs 10	A1163	EcoRI	- - - - - + -			
D07-Chrs 5A	1535	XbaI	- - - - + + + - - + -			
U01	M16-40	EcoRI	- - - + -			

Tableau 7

Distribution des marqueurs RFLP introgressés à partir de l'espèce donneuse *G. sturtianum* dans la descendance obtenue par rétrocroisement de l'hybride HRS. Le nombre de génotypes analysés à chaque génération est indiqué entre parenthèses. Les groupes de liaisons correspondent à ceux de Reinish *et al.* (1994).

L'analyse des profils RFLP indique que ces segments d'ADN ont été introgressés à partir de 8 groupes de liaison de *G. sturtianum* présents chez HRS. Les individus des générations de rétrocroisement présentent une ségrégation pour ces marqueurs et aucune descendance rétrocroisée ne les contient tous. En considérant l'ensemble des plantes analysées, la taille totale des segments intro-

gressés en provenance de *G. sturtianum* représente approximativement 50 cM pour les 10 combinaisons sonde/enzyme détectant une introgression. Une importante variation est observée entre les sondes au niveau de la détection de segments introgressés dans la descendance de HRS. Par exemple, la sonde A1204 du chromosome 1 a permis de détecter une introgression chez 13 individus de la descendance obtenue par rétrocroisement de HRS alors que la sonde M16-40 du groupe de liaison U01 n'a permis de détecter une introgression que chez un seul génotype. Le nombre de fragments introgressés varie également fortement entre les générations. Tous les 10 fragments d'ADN étaient présents parmi les individus issus du 1<sup>er</sup> rétrocroisement de HRS, alors que leur nombre était beaucoup plus faible dans les générations ultérieures (BC<sub>2</sub>, BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub> et BC<sub>3</sub>). L'analyse des introgressions en provenance de l'espèce pont montre la présence de huit segments de chromosome de *G. raimondii* chez HRS. En BC<sub>3</sub>, nous avons retrouvé 5 des 8 marqueurs de cette espèce.

L'introgression de segments d'ADN à partir des espèces sauvages a été de deux types. Dans la plupart des cas, les allèles RFLP caractéristiques de l'espèce cultivée et de l'espèce diploïde étaient présents et les individus de la descendance étaient hétérozygotes au niveau du locus introgressé. Exceptionnellement, un des allèles RFLP de *G. hirsutum* a été remplacé par l'allèle correspondant de l'espèce sauvage ce qui est un indice de recombinaison réciproque.

## I Discussion

Nos résultats montrent que les espèces diploïdes australiennes du génome C peuvent être exploitées avec succès pour l'amélioration de la principale espèce de cotonnier cultivé grâce à la création d'hybrides trispécifiques incluant une espèce diploïde américaine (génome D) comme pont. Chez de tels hybrides, le nombre d'appariements observés entre les chromosomes des génomes A<sub>h</sub> et C est suffisant pour permettre l'échange de matériel génétique et la production de plantes euploïdes introgressées.

Cette méthode nous a permis d'obtenir par rétrocroisement de l'hybride trispécifique HRS des plantes introgressées présentant une diminution drastique de leur teneur en gossypol dans la graine (moins de  $600 \text{ mg.kg}^{-1}$  de gossypol) et une teneur en terpénoïdes normale dans leurs boutons floraux. Une amélioration sensible de l'appariement chromosomique et de la fertilité des génotypes introgressés a été constatée au fur et à mesure de l'avancement dans les générations de rétrocroisement. Un nombre restreint de gènes dominants semble contrôler l'inhibition de la synthèse du gossypol dans la graine. Ces plantes constituent un matériel très intéressant pour le développement de variétés commerciales de cotonnier présentant une très faible teneur en gossypol dans la graine et une teneur normale en terpénoïdes dans les organes reproducteurs de la plante.

Les marqueurs moléculaires de l'ADN sont des outils prometteurs pour suivre l'introgression de segments de chromosomes d'espèces sauvages liés à des caractères intéressants chez des lignées améliorées de la principale espèce de cotonnier cultivé. Nous avons utilisé les marqueurs AFLP pour déterminer la similarité existant entre différents génotypes introgressés et la variété de *G. hirsutum* utilisée dans un programme de sélection récurrente réalisé à partir de l'hybride trispécifique HRS. La classification des espèces parentales obtenue au moyen des données générées par les marqueurs AFLP est cohérente avec les connaissances actuelles relatives à la phylogénie du genre *Gossypium*. Seulement cinq combinaisons de sondes ont suffi pour obtenir 477 fragment AFLP, ce qui est nettement plus élevé que les 375 bandes produites sur le même matériel végétal en utilisant 30 sondes RAPD (Mergeai *et al.*, 1998). Bien que le pourcentage de bandes AFLP polymorphes (87,4 %) soit légèrement plus faible que dans le cas de la RAPD (90,4 %), les marqueurs AFLP sont plus efficaces pour détecter des bandes spécifiques chez les espèces diploïdes sauvages. Ainsi, 70 marqueurs AFLP spécifiques de l'espèce donneuse (*G. sturtianum*) ont été détectés pour seulement 49 marqueurs RAPD spécifiques de cette espèce. Nos travaux confirment donc l'intérêt de ce type de marqueurs pour assister la sélection de génotypes introgressés issus d'hybrides interspécifiques.



L'utilisation de marqueurs AFLP et RFLP spécifiques a permis de montrer que la composition génomique de l'hybride trispécifique et de la majorité des descendance obtenues par rétrocroisement était du type ACDD, les chromosomes D provenant de *G. hirsutum* (2 (AD)<sub>1</sub>) ou de l'espèce pont *G. raimondii* (2D<sub>5</sub>). Aucune distinction entre les deux types de chromosomes D n'était possible dans nos recherches cytogénétiques précédentes du fait de leur similarité de forme et de taille (Vroh Bi *et al.*, 1998). Le polymorphisme généré par les sondes RFLP nous a permis d'identifier assez facilement les segments de chromosome introgressés. L'hybridation des marqueurs RFLP a également montré que la majorité des descendance étaient hétérozygotes pour les allèles parentaux. Cette observation est cohérente avec l'inclusion de chromosomes entiers des parents sauvages et/ou avec une introgression par translocation. Néanmoins, sur les 11 combinaisons sonde/enzyme détectant une introgression à partir des parents sauvages, trois combinaisons ont mis en évidence des recombinaisons réciproques. Le nombre important d'univalents, de multivalents et de chiasmata observé lors de l'analyse cytogénétique de ce matériel laissait prévoir l'existence de ces deux types d'introgression.

Nos travaux constituent la première tentative de caractérisation de l'introgression au niveau moléculaire de segments de chromosomes d'une espèce diploïde australienne chez la principale espèce de cotonnier cultivé. La capacité de suivre des régions de chromosomes sur plusieurs générations dans la descendance de croisements dirigés devrait permettre d'identifier les liens existant entre ces fragments et des caractères agronomiques importants. Le constat au niveau des plantes analysées d'une ségrégation à la fois pour des marqueurs RFLP caractéristiques de segments de chromosomes connus et pour le caractère recherché, devrait permettre d'aboutir à terme à la cartographie du caractère « faible teneur en gossypol de la graine, haute teneur en gossypol de la plante ».

#### Remerciements

Ce travail a été financé par la convention 2.4565.95 du « Fonds de la recherche fondamentale collective » de Belgique.

## Bibliographie

- Altman DW, Stelly DM, Kohel RJ 1987 —  
Introgression of the glanded-plant and glandless-seed trait from *Gossypium sturtianum* Willis into cultivated upland cotton using ovule culture. *Crop Sci.* 27 : 880-884.
- Altman DW 1988 —  
Exogenous hormone applications at pollination for *in vitro* and *in vivo* production of cotton interspecific hybrids. *Plant Cell Rep* 7 : 257-261.
- Altman DW, Stipanovic RD, Bell AA 1990 —  
Terpenoids in foliar pigment glands of A, D, and AD genome cottons: Introgression potential for pest resistance. *J Hered* 81 : 447-454.
- Brubaker CL, Benson CG, Miller C, Leach DN 1996 —  
Occurrence of terpenoid aldehydes and lysigenous activities in the glandless seeds of Australian *Gossypium* species. *Aust. J. Bot.* 44 : 601-612.
- Dilday RH (1986) —  
Development of cotton plant with glandless seeds and glanded foliage and fruiting forms. *Crop Sci* 26 : 639-641.
- Dudley JW 1993 —  
Molecular markers in plant improvement: manipulation of genes affecting quantitative traits. *Crop Sci* 33 : 660-668.
- Endrizzi JE, Turcotte EL, Kohel RJ 1985 —  
Genetics, cytology and evolution of *Gossypium*. *Adv. Genet.* 23 : 271-275.
- Iqbal MJ, Aziz N, Saeed NA, Zafar Y 1997 —  
Genetic diversity evaluation of some elite cotton varieties by RAPD analysis. *Theor Appl Genet* 94 : 139-144.
- Jaccard P 1908 —  
Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bull Soc Vaud Sci Nat* 44 : 223-270.
- Lee M 1998 —  
Genome projects and gene pools: new germplasm for plant breeding? *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 2001-2004.
- Marquié C, Bourelly J 1991 —  
Dosage du gossypol par chromatographie en phase liquide à haute performance, dans les dérivés des graines de cotonnier. *Cot Fib Trop* 46 : 1-33.
- Meredith JWR, Brown JS 1998 —  
Heterosis and combining ability of cottons originating from different regions of the United States. *J Cotton Sci* 2 : 77-84.
- Mergeai G. 1994 —  
Interspecific hybridization for cotton improvement. *in* "Cotton biotechnology" (C. Peeters ed.), pp. 23-28. *FAO regional office for Europe. Technical series 32. FAO, Rome.*
- Mergeai G, Baudoin JP, Vroh Bi I 1997 —  
Exploitation of trispecific hybrids to introgress the glandless seed and glanded plant trait of *Gossypium sturtianum* into *G. hirsutum* L. *Biotechnol Agron Soc Environ* 1 : 272-277.
- Mergeai G, Vroh Bi I, Baudoin JP, du Jardin P 1998 —  
Use of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers to assist wide hybridization in cotton. *In* « *Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 42 Cotton* » (Y.P.S. Bajaj ed.), pp. 121 – 139. *Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.*
- Multani DS, Lyon BR 1995 —  
Genetic fingerprinting of Australian Cotton cultivars with RAPD markers. *Genome*, 38 : 1005-1008.

Paterson AH, Tanksley SD, Sorrells ME 1991 — DNA markers in plant improvement. *Adv Agron* 46 : 39-90.

Reinisch AJ, Dong Jian-min, Brubaker CL, Stelly DM, Wendel JF, Paterson AH 1994 — A detailed RFLP map of cotton, *Gossypium hirsutum* x *Gossypium barbadense* : chromosome organization and evolution in a disomic polyploid genome. *Genetics* 138 : 829-847.

Rooney WL, Stelly DM, Altman DW 1991 — Identification of four *Gossypium sturtianum* monosomic alien addition derivatives from a backcrossing program with *G. hirsutum*. *Crop. Sci* 31 : 337-341.

Shappley ZW, Jenkins JN, Watson Jr CE, Kahler AL, Meredith WR 1996 — Establishment of molecular markers and linkage groups in two F2 populations of upland cotton. *Theor. Appl. Genet.* 92 : 915-919.

Stewart JMcD, Hsu CL 1977 — *In-ovulo* embryo culture and seedling development of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Planta* 137 : 113-117.

Stipanovic RD, Altman DW, Begin DL, Greenblatt GA, Benedict JH 1988 — Terpedoid aldehydes in upland cotton: analysis by aniline and HPLC methods. *J. Agric Food Chem* 36 : 509-515.

Tanksley SD, Young ND, Paterson AH, Bonierbale MW 1989 — RFLP mapping in plant breeding - new tools for an old science. *Bio/Technology* 7 : 257-264.

Tatieni V, Cantrell RG, Davis DD 1996 — Genetic diversity in elite cotton germplasm determined by

morphological characteristics and RAPDs. *Crop Sci* 36 : 186-192.

Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van der Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M 1995 — AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* 23 : 4407-4414.

Vroh bi I, Harvengt L, Chandelier A, Mergeai G, du Jardin P 1996 — Improved RAPD amplification of recalcitrant plant DNA by the use of activated charcoal during DNA extraction. *Plant Breeding* 115 : 205-206.

Vroh Bi I, Baudoin JP, Mergeai G 1998 — Cytogenetics of cotton plants involved in the introgression of the glandless-seed and glanded-plant trait from *Gossypium sturtianum* Willis into cultivated upland cotton (*G. hirsutum* L.). *Plant Breeding* 117 : 235-241.

Vroh Bi I, Hau B, Baudoin JP, Mergeai G 1999a — Development of high-gossypol cotton plants with low-gossypol seeds using trispecific bridge crosses and *in vitro* culture of seed embryos. *Euphytica* 106 : 243-251.

Vroh bi I, Maquet A, Baudoin JP, du Jardin P, Jacquemin JM, Mergeai G 1999b — Breeding for "low-gossypol seed and high-gossypol plants" in upland cotton. Analysis of tri-species hybrids and backcross progenies using AFLPs and mapped RFLPs. *Theor Appl Genet* 99 : 1233-1244.

Wang GL, Dong JM, Paterson AH 1995 — The distribution of *Gossypium hirsutum* chromatin in *G. barbadense* germplasm : molecular analysis of introgressive plant breeding. *Theor Appl Genet* 91 : 1153-1161.