

# Analyse de la microsporogenèse chez la descendance BC<sub>2</sub>A et BC<sub>3</sub> de l'hybride trispécifique *G. hirsutum* L. x *G. raimondii* Ulb. x *G. sturtianum* Will.

M.D. Sanogo, I. Vroh Bi, J.-P. Baudoin & G. Mergeai

Keywords: Cotton - *Gossypium* - Interspecific hybridization - Gossypol glands - Microsporogenesis - Cytogenetic analysis.

## Résumé

Une plante BC<sub>2</sub> issues de l'hybride trispécifique HRS [(*G. hirsutum* x *G. raimondii*) 2 x *G. sturtianum*] introgressée pour le caractère "inhibition de la synthèse du gossypol dans la graine" a été autofécondée et rétrocroisée par la variété Stamf de *G. hirsutum*.

L'analyse cytogénétique du matériel BC<sub>3</sub> et BC<sub>2</sub>A obtenue montre une nette amélioration du taux de syn-dèse des chromosomes et de la fertilité pollinique chez la majorité des individus analysés par rapport à leurs parents. Environ 1/3 des génotypes BC<sub>3</sub> produits présentent une diminution significative du nombre de glandes à gossypol dans la graine. Ces génotypes constituent un matériel prometteur pour le développement de variétés commerciales de cotonniers à très faible teneur en gossypol dans la graine et à teneur normale en terpénoïdes dans les parties aériennes.

## Summary

**Analysis of the Microsporogenesis of BC<sub>2</sub>A and BC<sub>3</sub> Plants Issued from the *G. hirsutum* L. x *G. raimondii* Ulb. x *G. sturtianum* Will.**

In order to introgress the low-gossypol-seed and high-gossypol-plant trait in the main cultivated cotton species, a BC<sub>2</sub> plant issued from the HRS trispécific hybrid [(*G. hirsutum* x *G. raimondii*) 2 x *G. sturtianum*] was backcrossed to *G. hirsutum* and self pollinated. Cytogenetics analysis of BC<sub>3</sub> and BC<sub>2</sub>S plants showed a significative improvement of chromosome pairing and pollen fertility compared to their parents. About one third of the BC<sub>3</sub> hybrids presented an important reduction in their seed gossypol glands. These genotypes constitute very promising genetic stocks for the development of commercial cotton varieties with low gossypol content in the seeds and normal gossypol content in the rest of the aerial parts.

## Introduction

Cultivé principalement pour les propriétés textiles de ses fibres, le cotonnier est une plante dont les potentialités alimentaires sont également importantes. Ses graines renferment de hautes teneurs en huile comestible (35-38%) en en protéines (35-38%) dont la qualité est équivalente à celle du soja (4). La valorisation des potentialités alimentaires du cotonnier est malheureusement limitée par la présence de gossypol dans l'amande de la graine. Le gossypol est un terpénoïde fortement toxique pour tous les animaux monogastriques, y compris l'homme. Il constitue un moyen de défense naturel de la plante contre les insectes (1,3). Contrairement à ce qui se passe chez tous les autres cotonniers, les graines de certaines espèces diploïdes sauvages australiennes appartenant aux sections *Sturtia* et *Grandicalyx* sont totalement démunies de glandes à gossypol alors que leurs organes aériens présentent de fortes teneurs en terpénoïdes. Chez ces plantes, la synthèse du gossypol est retardée jusqu'à l'étalement des cotylédons (2).

Dans le but d'introgresser chez la principale espèce de cotonnier (*G. hirsutum* L.) les gènes contrôlant l'inhibition de la synthèse de gossypol dans la graine, un hybride trispécifique a été créé en utilisant le cotonnier sauvage australien *G. sturtianum* Willis comme es-

pèce donneuse du caractère et le cotonnier diploïde sauvage américain *G. raimondii* Ulbrich comme espèce pont (6,7). Cet hybride a été rétrocroisé pendant deux générations successives par l'espèce *G. hirsutum* pour donner des individus BC<sub>2</sub>. Une plante issue de la 2e génération de rétrocroisement et introgressée pour le caractère recherché a été autofécondée et rétrocroisée par la variété Stam f de *G. hirsutum* pour donner des individus BC<sub>2</sub>A et BC<sub>3</sub>. Nous présentons ici le résultat des analyses cytogénétiques que nous avons réalisées sur ces matériels afin d'évaluer leur intérêt pour le développement de variétés commerciales de cotonnier présentant une très faible teneur de gossypol dans la graine et des teneurs normales en terpénoïdes dans les parties aériennes.

## Matériel et méthodes

Une plante issue de la deuxième génération de rétrocroisement par *G. hirsutum* de l'hybride trispécifique [(*G. hirsutum* x *G. raimondii*) 2 x *G. sturtianum*] a été autofécondée et rétrocroisée à nouveau par la variété Stam f de *G. hirsutum* pour produire les individus analysés dans la présente étude. Le schéma de croisements ayant abouti à la production de l'hybride BC<sub>2</sub> utilisés dans nos travaux est présenté par Mergeai et

**Tableau 1**  
**Microsporogénèse et fertilité pollinique chez l'hybride HRS et sa descendance BC<sub>1</sub>, BC<sub>2</sub>, BC<sub>2A</sub> et BC<sub>3</sub>**

Genotypes	Configurations chromosomiques à la Métaphase I						Nombre de chromosomes	Tétrades normales	Tétrades anormales	%
	I	II	III	IV	VI	pollen fertile				
HRS	14,4	17,03	0,93	0,1	0,07	52	124	876	8,9	
BC <sub>1</sub> S1	6,45	22,56	0,3	0,1		53	808	192	9,5	
BC <sub>2</sub> /1	3,83	23,61	0,31			52	820	180	60,5	
BC <sub>2</sub> /1 x stam f/1	3,81	23,55	0,3			52	807	193	67,5	
BC <sub>2</sub> /1 x stam f/4	3,01	25,3	0,14			54	980	20	54	
BC <sub>2</sub> /1 x stam f/5	3,33	23,9	1			54	1000	0	95	
BC <sub>2</sub> /1 x stam f/8	1,1	25,43	0,1			52	850	150	47,5	
BC <sub>2</sub> /1 x stam f/12	2	24,6	0,23	0,51		54	252	748	79,6	
BC <sub>2</sub> /1 auto/6	4,5	22,66	0,7			52	854	146	45,3	
BC <sub>2</sub> /1 auto/8	4,83	22,73	0,6			52	910	90	78,9	
BC <sub>2</sub> /1 auto/13	1,71	24,72	0,21	0,07		52	823	177	96,2	
BC <sub>2</sub> /1 auto/14	15,8	15,8	1,6			52	1000	0	88,4	

al (7). Pour éviter la chute précoce des capsules, aussi bien en cas de rétrocroisement que d'autofécondation, la solution d'hormones de croissance préconisée par Altman *et al.* (1) a été appliquée sur l'ovaire au moyen d'un tampon d'ouate immédiatement après la pollinisation du style. Cette solution se compose de 50 mg.l<sup>-1</sup> d'acide gibbérellique et 100 mg.l<sup>-1</sup> d'acide naphtoxyacétique.

Afin d'estimer le niveau d'introgression du caractère recherché, la densité de glandes à gossypol des embryons produits par rétrocroisement ou autofécondation du génotype BC<sub>2</sub> a été évaluée sous microscope (Wild M3) en utilisant une échelle visuelle variant entre zéro, pour les embryons totalement dépourvus de glandes à gossypol, et dix, pour les embryons présentant la même densité de glandes que l'embryon de *G. hirsutum*.

Les observations cytogénétiques suivantes ont été réalisées sur le matériel analysé en observant au moins 30 microspores par génotype: comptage du nombre chromosomique, analyse de l'appariement des chromosomes à la métaphase I et détermination de la fertilité pollinique. Directement après leur prélèvement de la plante, les jeunes boutons floraux ont été fixés pendant 48 heures dans la solution de CARNOY composée de six volumes d'alcool éthylique à 94°, de trois volumes de chloroforme et d'un volume d'acide acétique glacial. Après fixation, les boutons sont rincés trois fois à l'alcool éthylique (70°) et conservés dans l'alcool éthylique (70°C) à 4°C jusqu'à utilisation. L'observation des chromosomes se fait au microscope après coloration à l'acéto carmin 2% (2 g de carmin, 45% d'acide acétique et 55% d'eau). La fertilité pollinique est évaluée sur 1000 grains de pollen 30 minutes après coloration.

## Résultats et discussion

Environ un tiers des graines BC<sub>2A</sub> et BC<sub>3</sub> obtenues présentaient une forte réduction de leur densité de glandes à gossypol alors que toutes les plantes issues de ces graines ont montré une densité de glandes à gossypol normale ou supérieure à la normale au niveau de leurs organes aériens.

Le tableau 1 compare les configurations méiotiques des plantes BC<sub>2A</sub> et BC<sub>3</sub> que nous avons analysées à celles obtenues pour leurs parents (hybride trispécifique HRS, BC<sub>1</sub> et BC<sub>2</sub>) par Vroh *et al.* (7,8).

Trois des cinq BC<sub>3</sub> analysés, à l'instar de l'hybride trispécifique sont euploïdes avec 52 chromosomes; les deux autres BC<sub>3</sub> présentent deux chromosomes surnuméraires (2n = 4x = 54). Par rapport à l'hybride trispécifique, on observe sur la plaque métaphasique des BC<sub>3</sub>, d'une part, une diminution significative des univalents, des trivalents, une absence de multivalents complexes (quadrivalents et hexavalents) et d'autre part, une augmentation des bivalents. Les bivalents sont généralement fermés avec une faible proportion de bivalents ouverts. On observe en moyenne 4,4 univalents chez les BC<sub>3</sub> contre 14,4 chez HRS. La réduction du nombre d'univalents chez les BC<sub>3</sub> est probablement due à une augmentation du nombre de chromosomes homologues et du degré d'homologie des chromosomes en présence. La réduction des univalents chez les BC<sub>3</sub> signifie que le nombre des chromosomes impliqués dans les appariements (structures bivalentes et multivalentes) est en augmentation. De 47 à 52 chromosomes des BC<sub>3</sub> sont impliqués dans la constitution de bivalents contre 12 à 21 chez HRS. Chez les BC<sub>3</sub> contrairement à HRS, il y a une quasi absence de quadrivalents et d'hexavalents. Entre 0 et 1,6 des chromosomes des BC<sub>3</sub> contre un à six chromosomes chez HRS sont impliqués dans les structures

multivalents complexes. Il s'agit là d'un indice favorable pour l'introgession du caractère "graine sans glande, plante avec glandes" car l'augmentation du nombre de multivalents est synonyme d'échanges de matériel génétique et s'accompagne généralement de la restauration de fertilité pollinique (5).

L'analyse des cellules mères de grain de pollen de HRS montre la présence de triades (1,2%), de tétrades anormales (12,4%) et de tétrades normales (86,4%). Par contre chez les BC<sub>3</sub> on observe uniquement des tétrades anormales (0-19,3%) et de tétrades normales (80,7-100%). Les tétrades anormales sont caractérisées par la présence de une à trois cellules de taille réduite additionnelles aux quatre grosses cellules formant la tétrade. La présence de tétrades anormales est la manifestation des anomalies qui interviennent lors de la méiose suite à la formation d'univalents qui se positionnent en dehors du fuseau de division et de cellules qui sont incapables de se diviser. L'importance de leur taille dépendrait du nombre de chromosomes ou de fragments de chromosomes incorporés dans la cellule (7).

La fertilité pollinique des BC<sub>3</sub> est très variable. Elle est comprise entre 45,3 et 96,2%, contre seulement 9,0% chez l'hybride trispécifique. Cette amélioration de la fertilité pollinique est en rapport avec l'évolution de la configuration méiotique à la métaphase 1 des BC<sub>3</sub>. En effet, la réduction du nombre d'univalents et de structures multivalentes complexes des BC<sub>3</sub> favorise la formation de bivalents et améliore la fertilité pollinique.

L'amélioration de la fertilité s'est traduite par une augmentation du nombre de graines par capsule. Les capsules de HRS contiennent essentiellement des motes et, dans de rares cas une à deux graines. Par contre les capsules autofécondées des BC<sub>2</sub> contiennent entre trois et neuf graines. Le nombre de graines par capsule des BC<sub>3</sub>, bien que supérieur à celui de l'hybride trispécifique, demeure faible par rapport à celui de la variété Stam F qui contient en moyenne 24 graines par capsule. Cet écart est révélateur de l'importance du nombre de rétrocroisements encore à réaliser pour obtenir des variétés commerciales.

## Conclusion

L'obtention des variétés commerciales dans le cadre d'un programme d'amélioration par hybridation interspécifique nécessite généralement plusieurs générations de rétrocroisements. Les analyses cytogénétiques que nous avons réalisées montrent une évolution des BC<sub>3</sub> issus de l'hybride HRS vers des formes génétiquement équilibrées. Les génotypes BC<sub>3</sub> que nous avons obtenus qui présentent une diminution importante de la densité de glandes à gossypol dans la graine constituent un matériel prometteur pour le développement de variétés commerciales de cotonnier à très faible teneur en gossypol dans la graine et à teneur normale en terpénoïdes dans les parties aériennes. Un schéma de sélection adéquat devra leur être appliqué pour éviter la perte du caractère sauvage recherché.

## Références bibliographiques

- Altman D.W., Stelly D.M. & Kohel R.J., 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.
- Brubaker C.L., Benson C.G., Miller C. & Leach D.H., 1996. Occurrence of terpenoid aldehydes and lysigenous cavities in the glandless seeds of Australian *Gossypium* species. *Aust. J. Bot.* 44, 601-612.
- Dilday R.H., 1986. Development of cotton plant with glandless seeds and glanded foliage and fruiting forms. *Crop Sci.* 26, 639-641
- Marquié C., 1987. Food use of glandless cotton derivatives. *Coton fibres Trop.* 42, 65-73.
- Menzel M.Y. & Brown M.S., 1953. The significance of multivalent formation in three species *Gossypium hybrids*. *Genetics* 39, 546-558.
- Mergeai G., Baudoin J.-P. & Vroh Bi I., 1997. Exploitation of trispécific hybrids to introgress the glandless seed and glanded plant trait of *Gossypium sturtianum* Willis into *G. hirsutum* L. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 1. 272-277.
- Vroh Bi I., Baudoin J.P. & Mergeai G., 1998. Cytogenetics of the 'glandless-seed and glanded-plant' trait from *Gossypium sturtianum* Willis introgressed into upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Plant Breeding.* 117, 235-241.
- Vroh Bi I., Baudoin J.-P., Hau B & Mergeai G., 1999. Development of high-gossypol cotton plants with low-gossypol seeds using trispécies bridge crosses and *in vitro* culture of seed embryos. *Euphytica* 106, 243-251.

## Remerciements

Tous nos remerciements vont à Mr Eugène Journée pour sa contribution aux travaux d'hybridation et au Dr Alain Maquet pour la correction du manuscrit. Les travaux présentés ont été supportés financièrement par le Fonds de la Recherche Collective fondamentale de Belgique, convention n° 2 4565. Le Gouvernement du Mali, à travers l'accord de crédit IDA/MLI, 2557, a financé la bourse d'études du premier auteur.

M.D. Sanogo: Malien. Ingénieur agronome, DEA en Sciences Agronomiques et Ingénierie biologique.  
J.-P. Baudoin: Belge. Prof. en Phytotechnie des Régions intertropicales à la FUSAGx.  
G. Mergeai: Belge. Maître de Conférence à la FUSAGx.