

COMMUNAUTE FRANCAISE DE BELGIQUE
UNIVERSITE DE LIEGE – GEMBLoux AGRO-BIO TECH

**Analyse du déterminisme génétique de l'inhibition de la synthèse du
gossypol dans la graine chez la descendance de l'hybride**

[(G. hirsutum x G. raimondii)² x G. sturtianum]

Fatimata Bintou Hassedine DIOUF

Dissertation originale présentée en vue de l'obtention du grade
de docteur en sciences agronomiques et ingénierie biologique

Promoteur: Prof. Guy MERGEAI
2015

Copyright. Aux termes de la loi belge du 22 mars 1886, sur le droit d'auteur, seul l'auteur a le droit de reproduire cet ouvrage ou d'en autoriser la reproduction de quelque manière et sous quelque forme que ce soit. Toute photocopie ou reproduction sous une autre forme est donc faite en violation avec la loi.

RESUME

DIOUF F.B.H. (2015). Analyse du déterminisme génétique de l'inhibition de la synthèse du gossypol dans la graine chez la descendance de l'hybride [(*Gossypium hirsutum* L. x *G. raimondii* Ulb.)² x *G. sturtianum* Willis].

Différentes analyses ont été réalisées chez des générations avancées de HRS [(*Gossypium hirsutum* x *G. raimondii*)² x *G. sturtianum*], obtenues par rétrocroisement et autofécondation de plantes issues de graines présentant le caractère « *glandless-seed and glanded-plant* » recherché. Il s'agit de comprendre l'instabilité des plantes et pourquoi il n'est pas possible de fixer le caractère inhibition de la synthèse du gossypol uniquement dans la graine provenant de *G. sturtianum* chez la descendance de l'hybride trispécifique. Ainsi, des populations HRS BC2S5, BC2S6, BC2S7, BC3S4, ♂BC4S3, ♂BC4S4, ♀BC4S3 et ♀BC4S4 ont été étudiées.

Les observations agro-morphologiques réalisées ont mis en évidence d'importants problèmes de fertilité du matériel étudié se manifestant par des taux élevés d'avortement des embryons, la mauvaise germination des graines produites et la mortalité précoce de nombreuses plantules. A cela s'ajoute une différence phénotypique entre les plantes HRS analysées et le cotonnier cultivé. L'ampleur de ces problèmes est liée à l'importance de la présence de matériel génétique de l'espèce australienne chez les hybrides HRS, mis en évidence avec l'analyse par hybridation *in situ* génomique (GISH).

L'analyse du matériel au moyen de 10 marqueurs SSRs cartographiés sur trois (3) groupes de liaisons (c2-c14, c3-c17 et c6-c25) de *G. hirsutum*, met en évidence d'importantes distorsions de ségrégation (DS). Les profils génotypiques étaient presque toujours hétérozygotes. Ces distorsions sont causées par des sélections gamétique et/ou zygotique, qui se produisent respectivement avant et/ou après la fécondation.

La GISH a montré la présence de 1 à 4 chromosomes entiers de *G. sturtianum* et de 1 à 2 grands fragments de chromosomes de *G. sturtianum*. Cette hétérozygotie structurelle est impliquée dans la DS observée. Par contre, la présence massive de matériel génétique de l'espèce sauvage affecte peu les appariements chromosomiques et la fertilité pollinique des plantes hybrides analysées. Cette situation qui est contradictoire à la DS observée, laisse supposer l'existence d'un certain équilibre génétique au niveau des formes hybrides analysées. Elle indique ainsi, une absence ou une très faible interaction entre les chromosomes de *G. sturtianum* et ceux de *G. hirsutum* dans le génome de HRS.

L'expression du caractère recherché est très complexe, mais il est certain que : (i) les facteurs responsables du caractère recherché se transmettent mieux par l'ovule que par le pollen, (ii) les allèles impliqués dans le contrôle du caractère fonctionnent selon des modes à la fois additif et épistatique, (iii) l'augmentation du fond génétique de *G. hirsutum* au niveau des générations les plus avancées sélectionnées dans la descendance de l'hybride HRS se traduit par une diminution de l'expression du caractère recherché, (iv) les problèmes de viabilité des graines touchent aussi bien les graines avec ou sans glandes à gossypol, qui peuvent être bien ou mal-formées, ce qui laisse supposer qu'au moins une partie des facteurs du déséquilibre et ceux liés à l'expression du caractère sont indépendants. Il apparaît aussi que plusieurs gènes de *G. sturtianum* semblent être impliqués dans le contrôle de celui-ci. Cependant, la forte DS mise en évidence questionne la fiabilité de ce résultat obtenu par analyse en simple marqueur.

Une reprise du programme d'amélioration en utilisant les outils de caractérisation agro-morphologique, SSR et GISH, dès les premières générations de rétrocroisement, devrait permettre de mieux orienter le programme de sélection vers l'obtention de plantes stables qui expriment le caractère.

Mots clés : cotonnier, gossypol, hybridation interspécifique, *Gossypium sturtianum*, distorsion de ségrégation, SSR, GISH, zygotique, gamétique, hétérozygotie structurelle

SUMMARY

DIOUF F.B.H. (2015). Analysis of the genetic determinism of the glanded-plant and glandless-seed trait in the progeny of the HRS [(*Gossypium hirsutum* L. x *G. raimondii* Ulb.)² x *G. sturtianum* Willis] hybrid.

Several analyses were performed in advanced generations of HRS [(*Gossypium hirsutum* x *G. raimondii*)² x *G. sturtianum*] hybrid. These were obtained by backcrossing and selfing HRS plants expressing the glanded-plant and glandless-seed trait of *G. sturtianum*. The purpose is to understand why it is not possible to fix this target character in the HRS progeny. Thus, HRS BC2S5, BC2S6, BC2S7, BC3S4, ♂BC4S3, ♂BC4S4, ♀BC4S3 and ♀BC4S4 plant populations were studied.

Agro-morphological observations carried out on the studied plant material showed in all analyzed progenies significant fertility problems as manifested by high rates of embryo abortion, poor germination of seeds and premature mortality of many seedlings. Moreover, major phenotypic differences were observed between the HRS plants and upland cotton. Genomic *in situ* hybridization analysis (GISH) demonstrated that the magnitude of these problems is related to the importance of the presence of genetic material of the Australian species in HRS hybrids.

The analysis of the plant material with the 10 SSRs markers, mapped on c2-c14, c3-c17, and c6-c25 linkage groups of *G. hirsutum*, points out very important segregation distortions (SD). Genotypic profiles were almost always heterozygous. These SD are caused by gametic and/or zygotic selections that occur respectively before and/or after fertilization.

GISH showed the presence of one (1) to four (4) whole *G. sturtianum* chromosomes and one to two large fragments of *G. sturtianum* chromosomes. This structural heterozygosity is implicated in the SD observed. However, the massive presence of alien genetic material hardly affected the chromosome pairing and pollen fertility of the analyzed hybrid plants. This is contradictory to the observed SD and suggests a certain genetic balance in the analysed hybrids. It thus indicates no, or very weak interaction between the chromosomes of *G. sturtianum* and those of *G. hirsutum* into the genome of HRS derivatives.

The expression of the desired character is very complex, but it is certain that: (i) the factors responsible for the desired trait are better transmitted through the ovule than the pollen, (ii) the alleles involved in the expression of the target trait operate both according to the additive and epistatic models, (iii) the increase of the *G. hirsutum* genetics background in the most advanced generations of the HRS hybrid is accompanied by a decrease of the expression of the desired trait, (iv) seeds viability problems affect both seeds with or without gossypol glands, whether they are well formed or malformed, showing the independence between at least a part of the imbalance factors and those related to the expression of researched character. Several *G. sturtianum* genes appear to be involved in the control of the target trait. However, the strong SD that characterizes the analyzed plants questions the reliability of this result obtained through single-marker analysis.

A resumption of the breeding program using agro-morphological characterization tools, SSR and GISH, in the early generations of backcrossing, should help to better guide the selection program towards obtaining stable plants that express the character.

Key words: cotton, gossypol, interspecific hybridization, *Gossypium sturtianum*, segregation distortion, SSR, GISH, zygotic, gametic, structural heterozygosity

REMERCIEMENTS

J'ai eu du plaisir à commencer cette thèse, j'ai eu du plaisir à la terminer. Mais, chaque jour qui passe sans que je n'abandonne était un défi de relevé et un défi de relevé appelle un défi à relever. Seule, je n'y serais jamais arrivée. Ce document qui est l'aboutissement de longues années de durs labeurs est le fruit de nombreuses contributions, mais aussi d'un grand soutien moral de tous mes proches.

Tous d'abord j'exprime mes sincères remerciements au gouvernement du Sénégal à travers les ministères de l'Education et de l'Agriculture qui m'ont donné l'opportunité d'acquérir le bagage nécessaire pour faire une thèse.

J'exprime mes vifs remerciements A / AU:

La CUD/ARES-CCD de nous avoir accordé la bourse à travers le projet Pic_coton, qui nous a permis de débiter les recherches ;

L'Ecole National Supérieure d'Agriculture (ENSA)/ Thiès /Sénégal qui a fait de moi un Agronome et continue à me former en accueillant nos travaux au Sénégal ;

L'Université de Liège Gembloux Agro-Bio Tech qui m'a accepté et m'a permis de bénéficier de ressources complémentaires durant mes recherches ;

L'Institut Sénégalaise de Recherche Agricole (ISRA) à travers son Centre d'Etudes Régional pour l'Amélioration de l'adaptation à la Sécheresse (CERAAS) pour m'avoir grand ouvert ses portes et bénéficier du laboratoire de biologie moléculaire, ainsi que de tout l'encadrement scientifique disponible et de m'avoir également fait bénéficier d'une bourse du programme WAAPP de la banque mondiale, qui est venue à point pour me permettre d'assurer la finition de mes recherches. ;

Ministère de l'Agriculture et de l'Equipement Rural (MAER) du Sénégal, qui m'a autorisé et facilité la poursuite de mes recherches ;

Pr Guy MERGEAI; mon promoteur et promoteur du projet Pic_coton, je le remercie pour sa rigueur et son sens du travail bien fait, toujours disponible, très speed et ouvert pour la recherche de solutions aux divers problèmes posés par la réalisation de la thèse, tant au point de vue scientifique que logistique, il n'a ménagé aucun effort pour la réussite de ce travail. Travailler auprès de lui fut riche en émotions et en apprentissages à tous niveaux ;

M. Frédéric FRANCIS, de présider le jury ;

M. Hervé VANDERSCHUREN et M. Patrick DU JARDIN pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail en acceptant de siéger dans le jury;

Pr André TOUSSAINT merci pour l'intérêt et toute l'attention portée à ce document, vos corrections ont été précieuses. Merci pour les bonjours très chaleureux ;

Mme Dominique MINGEOT, attachée scientifique au Centre Wallon De Recherches Agronomiques (CRA-W), merci pour l'intérêt et toute l'attention portés à ce document, vos corrections mais aussi les notions de cartographie ont été précieuses ;

M. Jean-Marie JACQUEMIN Centre Wallon De Recherches Agronomiques (CRA-W) pour la confiance, accordée à ma personne, sa courtoisie, sa disponibilité, son efficacité et son

pragmatisme, un grand merci pour toutes les astuces en cartographie dont il m'a gratifiées et toute l'attention accordée au document.

Mes remerciements et mon profond respect au Pr. Jean-Pierre BAUDOIN d'avoir accepté de siéger dans le jury, mais aussi pour toute l'attention et la rigueur sans faille qu'il a accordé au document.

Je m'en voudrais de ne pas remercier Djibril SARR pour m'avoir mis sur la route du coton, d'avoir mis à ma disposition tous les moyens dont il dispose, en plus de son expertise, ses encouragements, son indéfectible sollicitude, du fond du cœur, merci pour tout.

Je remercie sincèrement le Dr. Ir. BENBOUZA, qui avant de me connaître m'envoyait la documentation dont j'avais besoin qui m'a par la suite aidé à me perfectionner en biologie moléculaire et me donnait des conseils, grand merci.

Merci au Dr Olivier Konan pour sa disponibilité, l'initiation à la cytogénétique classique et moléculaire et ses conseils avisés

A toute l'équipe de l'Unité de Phytotechnie Tropicale et horticulture Didier LEURQUIN, Luc BOLYN et Valérie JAUMIN, vos encouragements, vos sourires, votre disponibilité ont ensoleillé ma période de rédaction de tout mon cœur merci.

Je remercie le Pr. Abdoulaye DIENG, Directeur de l'ENSA et à travers lui tout le personnel.

Ma profonde gratitude va au Dr. Khadidiatou Ndoye NDIR, chef de département Productions Végétales à l'ENSA, pour son soutien sans faille, pour sa gentillesse et sa disponibilité. Comme une maman, elle a toujours été présente pour nous maintenir sur le chemin, et nous gratifier de ses précieux conseils, pour cela, et sa confiance je lui suis très reconnaissante ;

J'exprime également ma profonde gratitude à Dr Ndiaga CISSE Directeur du CERAAS pour l'importance accordée à ma thèse, sa présence perpétuelle, ses conseils, et ses qualités humaines, à travers lui toute l'équipe, je citerai juste le Directeur scientifique Dr Daniel FONCÉKA très ouvert et toujours disponible, merci pour les précieux conseils scientifiques et mon grand ami Mbaye Ndoye SALL pour son soutien et son amitié sans oublier Mariama SENGHOR.

Mes remerciement vont à l'endroit de Dr Ir Dogo SECK, d'abord comme ancien de Gembloux, sa disponibilité à l'endroit de ses cadets, son indéfectible sollicitude, vos passages à Gembloux resteront gravés dans ma mémoire et me serviront d'exemple, mais aussi en tant que Secrétaire Général du MAER, a facilité la poursuite de mes recherches .

Mes remerciements vont à l'endroit de M. Mamadou DIALLO ancien Directeur de l'Agriculture (DA) qui m'a bien accueilli, conseillé et facilité la poursuite de mes recherches au sein de la direction, j'ai adoré travailler à vos côtés.

Je remercie M. Oumar SANE Directeur de l'Agriculture, pour ses conseils, son amitié et pour avoir aussi facilité la poursuite de mes recherches, à travers lui tous mes collègues de la DA que je vois comme ma seconde famille.

J'exprime également ma gratitude à l'endroit de M. Ibrahima DIEME Chef de division à la DA, c'est un honneur de travailler auprès de vous, partage, respect, rigueur, honnêteté, sollicitude sont entre autre ce que j'ai retenu et que je compte bien appliquer dans ma carrière, du fond du cœur merci pour les précieux conseils.

Grand merci à mon cher ami Dr Alioune FALL président de l'Association Sénégalaise des Ingénieurs de l'Agriculture c'est un honneur de cheminer à vos côtés.

A mes Partenaires Amy BODIAN et BASSIAKA merci pour votre soutien et votre affection.

A mon papa attiré S. DIAGNE, qui m'apparaît comme une luciole dans le noir à chaque fois que j'ai besoin de lumière, ta contribution a été de taille.

Merci à ma petite sœur chérie Nafi FALL pour sa compréhension et son soutien.

A mes amis pour la vie : Spéciaux : Coumba, Aïssatou, Diatta, Extraordinaires : Nabou, Halima, Fatou, Formidables : Noëlla, Ndeye Faye, Louise, Sophie, Mami Daba, Mame Fa, Nadège, Aissata Bâ, Héloïse, Rabiou, Diarra, merci de m'avoir inondé de votre ineffable Amour, vous êtes au fond de moi.

A Gembloux, je ne me suis jamais sentie seule, tout ce qu'on doit attendre d'une famille ne m'a pas manqué, parce que j'ai eu la chance de croiser la route de personnes extraordinaires, qui m'ont adopté dès la première seconde, mention toute spéciale à Khady BA SY et Nafissatou NACOULIMA SANOU et leur familles, je suis une partie de vous, vous êtes une partie de moi.

Merci à mon mari, Bamba Touré pour sa disponibilité et son soutien, à ma chérie Saly DIOUF et les futures Sophia et Teddy

A toi mon cher tonton Lazar, je ne pourrais jamais te remercier assez, cadeau ne peut être plus beau que celui que tu m'as offert spontanément, sache que rien d'autre n'a de valeur à côté, j'espère que le Tout Puissant te fera le meilleur.

A Tonton Alabi, pour te montrer ma gratitude, les mots me manquent, merci pour tout.

A toute ma famille, je porte une pensée toute spéciale pour la perpétuelle sollicitude, je dis un grand merci, tout particulièrement, à mon papa, Ta nafi, tonton racine, à mes mamans Ta Fat Séne, Ta Amy, Ta Mame Binta, Ta Ndeye Fatou à Ta Adji, tonton Diop, tonton Mame Bâ, tonton Ablaye, Tata Mari Kor Faye, à toute la famille Bâ, Diouf, Kane et Ly vos pensées ne m'ont jamais quitté et tout ce que vous avez fait et que vous continuez de faire restera à jamais gravé au fond de mon cœur.

Merci à l'ensemble de la communauté Sénégalaise de Gembloux, les familles ; FALL, Coly, Pater, Diop, Laye ...

Dans mes absences, parfois, sans doute j'aurais pu m'éloigner, mais je n'ai ni perdu ma route ni changé, j'ai fait mes choix et mes voyages, parfois j'en paie le prix. Mais, même à l'autre bout de la terre je continue mon histoire avec ma famille mes bonheurs et mes tristesses se partagent avec vous. Vous avez toujours été là pour moi et pas simplement par devoir, alors tout naturellement je vous dis que je suis très fière d'être la petite sœur qui n'a jamais eu besoin de regarder ailleurs, car, jamais chemin tracé, n'a été aussi claire que ton exemple et la grande sœur un peu fatigante mais à qui ses frères accordent toute l'attention possible, j'espère que vous êtes aussi fiers de moi que je le suis de vous.

Liste des publications réalisées dans le cadre de la thèse

Diouf F.B.H., Benbouza H., Nacoulima L.N., Ndir K.N., Konan O., Mergeai G., 2014. Segregation distortions in interspecific cotton populations issued from the HRS triple species hybrid [(*G. hirsutum* x *G. raimondii*)² x *G. sturtianum*]. *Tropicultura*. **32** (2), 73-79

Diouf F.B.H., Mergeai G., 2012. Distorsions de ségrégation et amélioration génétique des plantes (synthèse bibliographique). *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **16**(4), 499-508

Diouf F.B.H., Benbouza H., Konan N. O., Sarr D., Ndir K N., Baudoin J. P., Mergeai G., 2010. Effect of Gamma Ray in the Progeny of Trispecific Hybrid [(*Gossypium hirsutum* x *G. raimondii*)² x *G. sturtianum*]. *Not. Bot. Hort. Agrobot.*, **38** (2), 78-83

Benbouza H., Lacape M., Jacquemin J.M., Courtois B., **Diouf F.B.H.**, Sarr D., Konan N., Baudoin J.P., Mergeai G., 2009. Introgression of the low-gossypol seed and high-gossypol plant trait in upland cotton: Analysis of [(*Gossypium hirsutum* x *G. raimondii*)² x *G. sturtianum*] trispecific hybrid and selected derivatives using mapped SSRs. *Molecular breeding.*, **25** (2), 273-286.

Conférence scientifiques international ayant accepté l'exposé de
résultats obtenus dans le cadre de la thèse

12th International BIOVEG Symposium "Plant Biodiversity and Food Diversification".
September 27-29, 2010, Cluj-Napoca, Romania. **Diouf F.B.H.**, Benbouza H., Konan N. O.,
Sarr D., Ndir K N., Baudoin J. P., Mergeai G., 2010. Effect of Gamma Ray in the Progeny of
Trispecific Hybrid [(*Gossypium hirsutum* x *G. raimondii*)² x *G. sturtianum*].

International Cotton Genome Initiative (ICGI) 2010 Canberra Research Conference.
September 21-23, 2010, Canberra, Australia. Benbouza H., **Diouf F.B.H.**, Scheffler J., Konan
N. O., Mergeai G., 2010. Identification of chromosomal regions associated with segregation
distortion of SSR markers and the genes controlling the low-gossypol seed & high-gossypol
plant trait of *Gossypium sturtianum*.

Conference of the Beltwide Cotton Conferences, Jan. 8-11 2008. Mergeai G., Sarr. D., **Diouf
F.B.H.**, Baudoin. J.P., 2008. Comparison of the Efficacy of the Bispecific and Trispecific
Pathways to Exploit Australian Wild Diploid Species for the Genetic Improvement of Upland
Cotton. Cotton Improvement.

World Cotton Research Conference IV. September 10-14, 2007, Lubbock, Texas, USA.
Benbouza H., **Diouf FBH.**, Ndir K., Baudoin J.P., Mergeai G., 2007. Preferential
transmission of *Gossypium sturtianum* chromosome fragments in the progeny of [(*G.
hirsutum* x *G. raimondii*) 2 x *G. sturtianum*] trispecies hybrid.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Présentation des espèces des différents groupes génomiques du genre <i>Gossypium</i>	5
Tableau 2: Répertoire des espèces diploïdes australiennes	16
Tableau 3: Valeurs du coefficient « b » pour différents génotypes dans l'équation de calcul du pourcentage en gossypol des graines (Benbouza, 2004)	24
Tableau 4: Les chromosomes liés à l'expression du caractère « <i>glandless-seed et glanded plant</i> ».....	28
Tableau 5: Pedigrée des populations de graines et de plantes appartenant à la voie 1	53
Tableau 6: Pédigrée des populations de graines et de plantes appartenant aux descendance issues du rétrocroisement et de l'autofécondation de la souche HRS BC3S3 (voies 2, 3 et 4)	54
Tableau 7: Nombre de graines scarifiées et évaluées par génération de la voie 1.....	55
Tableau 8: Nombre de graines scarifiées et évalués par génération des voies 2, 3 et 4	56
Tableau 9: Fréquences de graines vides, mal-formées et bien formées produites dans le cadre de la thèse.....	57
Tableau 10: Analyse de l'expression de la teneur en gossypol des descendance de la voie 1.....	60
Tableau 11: Fréquences absolues et relatives de graines par classe de teneur en gossypol chez les descendants de la voie 1	60
Tableau 12: Analyse de l'expression de la teneur en gossypol des descendance des voies 2, 3 et 4...	61
Tableau 13: Fréquences absolues et relatives par classe de teneur en gossypol chez les descendants des voies 2, 3 et 4.....	61
Tableau 14: Effectifs des graines sélectionnées, des plantes analysées et teneur en gossypol des plantes analysées.....	70
Tableau 15: Propriétés physico chimiques du substrat de culture.....	71
Tableau 16: Evaluation de la fertilité des plantes analysées par génération et en fonction de la teneur en gossypol.....	80
Tableau 17: Tendances observées pour les relations non significatives entre la teneur en gossypol et les paramètres agro morphologiques étudiés	84
Tableau 18: Matrice de corrélation.....	85
Tableau 19: Cosinus carrés des variables.....	87
Tableau 20: Liste des marqueurs utilisés et leur localisation chromosomique	97
Tableau 21: Suivi de l'introgession de <i>G. sturtianum</i> et analyse de la distorsion de la ségrégation des marqueurs SSRs transférés dans la population BC2S5	101
Tableau 22: Suivi de l'introgession de <i>G. sturtianum</i> et analyse de la distorsion de la ségrégation des marqueurs SSRs transférés dans la population BC2S6	101
Tableau 23: Analyse de la fréquence allélique des SSRs biaisés dans la population BC2S5	101
Tableau 24: Analyse de la fréquence allélique des SSRs biaisés dans la population BC2S6	101
Tableau 25: Suivi de l'introgession de <i>G. sturtianum</i> et analyse de la distorsion de la ségrégation des marqueurs SSRs transférés dans la population BC3S4	103
Tableau 26: Suivi de l'introgession de <i>G. sturtianum</i> et analyse de la distorsion de la ségrégation des marqueurs SSRs transférés dans la population ♀ BC4S3	104
Tableau 27: Suivi de l'introgession de <i>G. sturtianum</i> et analyse de la distorsion de la ségrégation des marqueurs SSRs transférés dans la population ♂ BC4S3	105
Tableau 28: Analyse de la fréquence allélique des SSRs biaisés dans la population BC3S4	106
Tableau 29: Analyse de la fréquence allélique des SSRs biaisés dans la population ♂BC4S3	107
Tableau 30: Analyse de la fréquence allélique des SSRs biaisés dans la population ♀BC4S3	107
Tableau 31: Analyse du lien entre les 10 SSRs et l'inhibition de la teneur en gossypol uniquement dans la graine chez la descendance HRS BC3S4 (138 individus).....	110
Tableau 32: Analyse du lien entre les 10 SSRs et l'inhibition de la teneur en gossypol uniquement dans la graine chez la descendance HRS ♀BC4S3 (35 individus).....	110
Tableau 33: Analyse du lien entre les 10 SSRs et l'inhibition de la teneur en gossypol uniquement dans la graine chez la descendance HRS ♂ BC4S3 (33 individus).....	110
Tableau 34 : Synthèse des différents mécanismes de DS observés, par génération et par groupe de liaison pour l'ensemble des générations étudiées.....	116

Tableau 35: Répartition par génération des 27 individus HRS utilisés pour l'identification de nouveaux marqueurs SSRs	127
Tableau 36: Liste des 101 amorces utilisées pour révéler l'introgession de nouveaux marqueurs SSRs spécifiques de <i>G. sturtianum</i> dans les descendance les plus avancées de l'hybride HRS	128
Tableau 37: Conservation des SSRs spécifiques <i>G. sturtianum</i> chez les 27 individus testés appartenant aux générations avancées de la descendance de HRS	132
Tableau 38: Liste des plantes étudiées et teneur en gossypol des graines dont elles sont issues	137
Tableau 39: Composition de la solution de détection pour chaque étape	141
Tableau 40: Résultats des analyses GISH	144
Tableau 41 : Fertilité pollinique, nombre de chromosomes de <i>G. sturtianum</i> et teneur en gossypol des espèces parentales de l'hybride HRS de la plante ♀BC4/20 et de cinq plantes issues de l'autofécondation de celle-ci	150
Tableau 42: Synthèse des différents mécanismes de DS observés, avec les 10 SSRs et le nombre de chromosomes de <i>G. sturtianum</i> révélé par la GISH.....	154

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Répartition géographique des différentes formes génomiques des espèces du genre <i>Gossypium</i>	6
Figure 2: Schéma de création de l'hybride HRS par la méthode pseudophylétique (Vroh bi, 1999) ...	47
Figure 3: Généalogie du matériel végétal étudié.....	52
Figure 4: graines mal formées à forte et à faible teneur en gossypol	58
Figure 5: graines bien formées à forte et à faible teneur en gossypol	58
Figure 6: Comparaison des moyennes de la teneur en gossypol des descendance autofécondées de la souche BC2	59
Figure 7: Comparaison des moyennes de la teneur en gossypol des descendance rétrocroisées puis autofécondées de la souche BC2S2.....	61
Figure 8: Pourcentage de germination de levée et de survie des descendance HRS testées.....	73
Figure 9: Aspect de 3 plantes BC3S3 65 jours après germination	74
Figure 10: Aspect de 4 plantes ♂BC4S3 à 50 jours après germination	74
Figure 11: Evolution des différents stades phénologiques des générations étudiées en fonction des jours après semis	74
Figure 12: Croissance en hauteur	77
Figure 13: Croissance du diamètre de la tige principale	77
Figure 14: Rythme d'apparition des branches monopodiales	77
Figure 15: Rythme d'apparition des branches sympodiales.....	77
Figure 16: Rythme d'apparition des boutons floraux.....	77
Figure 17 : Rythme d'apparition des fleurs.....	77
Figure 18: Croissance en hauteur	78
Figure 19: Croissance du diamètre de la tige principale	78
Figure 20: Rythme d'apparition des branches monopodiales	78
Figure 21: Rythme d'apparition des branches sympodiales.....	78
Figure 22: Rythme d'apparition des boutons floraux.....	78
Figure 23: Rythme d'apparition des fleurs.....	78
Figure 24: Représentation des variables et des génotypes selon les axes 1 et 2.....	86
Figure 25: Classification hiérarchique ascendante des différentes générations	88
Figure 26: Cartographie des nouveaux SSRs testés et de ceux identifiés par Benbouza (2004) chez les 7 groupes de liaison qui présentent une introgression de SSRs spécifiques de <i>G. sturtianum</i>	133
Figure 27: plaque métaphasique au DAPI de BC3S2/814 (%G=0,13)	145
Figure 28: plaque métaphasique après hybridation de BC3S2/814 (%G=0,13).....	145
Figure 29: plaque métaphasique au DAPI de ♀BC4/20 (%G=0,16).....	145
Figure 30: plaque métaphasique après hybridation de ♀BC4/20 (%G=0,16).....	145
Figure 31: plaque métaphasique au DAPI de ♀BC4S1/43 (%G= 0,06)	145
Figure 32: plaque métaphasique après hybridation de ♀BC4S1/43 (%G= 0,06).....	145
Figure 33: plaque métaphasique au DAPI de ♂BC4/6 (%G= 0,98).....	146
Figure 34: plaque métaphasique après hybridation de ♂BC4/6 (%G= 0,98).....	146
Figure 35: Configuration chromosomique à la métaphase I de la méiose de la plante ♀BC4S3/11 (%G= 1,14), grossissement 100	147
Figure 36: Aspect normal des tétrades observées chez les individus testés de l'hybride HRS et chez le cotonnier cultivé var STAM F.....	148
Figure 37: Aspect anormal des tétrades observées chez la plante ♀BC4S4/20-S1/58 (%G= 0,88)....	148
Figure 38: Fertilité pollinique= 93,98 % ♀BC4/20/87.....	149
Figure 39: Fertilité pollinique chez le cotonnier cultivé	149
Figure 40: Fertilité pollinique= 66,42% ♀BC4S4/20/58	149

ABREVIATIONS

ABH : (*G. arboreum* x *G. bickii*)² x *G. hirsutum*
ACP : analyse en composantes principales
ADN : acide désoxyribonucléique
AFLP : Amplified Fragment Length Polymorphism
APS : ammonium persulfate
ARN : acide ribonucléique
BNL : Brookhaven National Laboratory
BSA : Serum albumine bovine
CAH : classification ascendante hiérarchique
CATA : Centre d'Application des Techniques d'Agriculture
CCIC : Comité Consultatif International du Coton
CERAAS : Centre d'Etude Régional pour l'Amélioration de l'Adaptation à la Sécheresse (Sénégal)
CIR : CIRAD :
CMP : cellules-mères de pollen
CTAB : céthylméthyl d'ammonium de bromure
DAF : DNA Amplification Fingerprinting
DAPI : 4',6'-diamidino-2-phénylindole
DS : distorsion de ségrégation
ENSA : Ecole Nationale Supérieure d'Agriculture
FAO : Food and Agriculture Organization : Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture
FISH : hybridation *in situ* fluorescente
FITC : fluorescein isothiocyanate : isothiocyanate de fluorescéine
GISH : hybridation *in situ* génomique
HRS : (*G. hirsutum* x *G. raimondii*)² x *G. sturtianum*
HTL : (*G. hirsutum* x *G. thurberi*)² x *G. longicalyx*
HTS : (*G. hirsutum* x *G. thurberi*)² x *G. sturtianum*
JAS : jours après semis
LDS : loci de distorsion de ségrégation
LMA : Lignée Monosomique d'Addition
LOD : lodscore = logarithme of the odds ratio
ORANA : Organisme de Recherche sur l'Alimentation et la Nutrition Africaine
PCR : Réaction en chaîne par polymérase
QTL : Locus à effets quantitatifs (Quantitative Trait *Loci*)
RAPD : Random-Amplified Polymorphism DNA
RDS : régions de distorsion de ségrégation
RFLP : polymorphisme de longueur des fragments de restriction
SDS : sodium dodecyl sulfate
SNP : single-nucleotide polymorphism
SODEFITEX : Société de développement et des fibres textiles (Sénégal)
SSC : Standard Saline Citrate
SSR : Simple Sequence Repeats
TBE : Tris, Borate, EDTA
TEMED : tétraméthyléthylènediamine

GLOSSAIRE

Allèle : Une des formes alternatives d'un gène.

Amplification d'un gène : Production sélective de plusieurs copies d'un seul gène, sans augmenter proportionnellement le nombre des autres.

Co-dominance : Lorsque les deux allèles sont exprimés à l'état hétérozygote de façon à ce que le **phénotype** reflète une contribution des deux allèles.

Distorsion de ségrégation (DS) : Déviation significative des proportions des individus d'une classe génotypique donnée au sein d'une population ségréante. La DS va à l'encontre des lois fondamentales de la génétique mendélienne qui reposent sur la transmission prévisible des allèles d'un parent à ses descendants et sur la détermination des génotypes à partir des allèles transmis.

Effet additif : Effet génétique résultant de l'action indépendante des gènes sur l'expression d'un caractère, leurs effets peuvent donc s'additionner. C'est la part héritable des effets génétiques.

Epistasie : Interaction entre gènes à des loci différents, ex. un gène qui supprime l'effet d'un autre gène situé à un locus différent. La dominance est associée aux membres des paires d'allèles alors que l'épistasie décrit une interaction entre produits de gènes non alléliques.

Epistatique : Interaction entre gènes où l'expression phénotypique d'un gène masque ou interfère avec l'expression d'un gène ou de gènes différents. Les gènes dont l'expression phénotypique est exprimée sont dits épistatiques.

Hétérozygotie structurelle : Diversité structurelle du génome, qui se traduit par la présence de chromosomes entiers ou de fragments de chromosomes structurellement différents dans un génome.

Homéologues : Se dit des chromosomes issus d'un progéniteur commun, mais qui grâce à l'évolution ne sont plus complètement homologues. Les chromosomes homéologues ont un contenu génique similaire, mais sont structurellement modifiés afin d'empêcher et quelques fois de prévenir complètement leur appariement à la méiose.

Hybride : Descendance de deux parents génétiquement différents.

Introgression : Introduction de nouveaux allèles ou gène(s) dans une population à partir d'une source exotique, généralement une espèce différente. Ceci est réalisé par rétro croisement répété de l'hybride initial afin d'éliminer tous les changements génétiques, à l'exception du (des) nouveau(x) gène(s) désiré(s).

Locus : Emplacement d'un gène ou d'un marqueur sur un chromosome.

Loci : Pluriel de locus

Sélection assistée par marqueurs Utilisation de marqueurs d'ADN pour augmenter la vitesse et l'efficacité de l'introgression d'un nouveau(x) allèle(s) ou gène(s) dans une population génétique.

Sélection gamétique : Mécanisme de distorsion de ségrégation, qui se passe au niveau haploïde avant la fécondation. Dans ce cas, la distorsion est la conséquence d'un déroulement anormal de la méiose. Les gamétophytes sont alors moins viables ou moins fertiles.

Sélection zygotique : Mécanisme de distorsion de ségrégation qui se passe après la fécondation. Dans ce cas, les individus d'un groupe se révèlent être moins viables. La distorsion est dans ce cas généralement due à un remaniement structural.

*A ma mère,
Femme vertueuse, femme courageuse,
A toi ma mère, je te dédie ce travail
Qui n'est rien d'autre que le fruit mûr
De tout l'amour dont tu me couves
De tout ce que Toi, tu fis pour moi et
De tout ce que tu continues de faire
Puisse le Tout-Puissant te donner la santé
Pour te garder longtemps, très longtemps
Auprès de nous
Ma pensée toujours se tourne vers toi...
La tienne à chaque pas m'accompagne.*

TABLE DES MATIERE

RESUME.....	I
SUMMARY	II
REMERCIEMENTS	III
Liste des publications réalisées dans le cadre de la thèse	VI
Conférence scientifiques international ayant accepté l'exposé de résultats obtenus dans le cadre de la thèse	VII
LISTE DES TABLEAUX.....	VIII
LISTE DES FIGURES.....	X
ABREVIATIONS	XI
GLOSSAIRE.....	XII
TABLE DES MATIERE.....	XIV
AVANT PROPOS.....	XVIII
1. INTRODUCTION	1
2. AMELIORATION DU COTONNIER CULTIVE PAR UNE INHIBITION DE LA SYNTHESE DU GOSSYPOL ET PRESENTATION DU MATERIEL VEGETAL.....	4
2.1 Présentation du cotonnier	4
2.1.1 Systématique et nomenclature.....	4
2.1.2 Origine et spéciation.....	5
2.1.3 Domestication du cotonnier	7
2.2 Intérêt du cotonnier dans l'alimentation	7
2.2.1 Les sous-produits de la graine de cotonnier	7
2.2.2 Intérêt et utilisation des sous-produits de la graine de cotonnier dans l'alimentation humaine et animale.....	8
2.3 Limites de l'utilisation des sous-produits de la graine du cotonnier dans l'alimentation.....	9
2.3.1 Le gossypol chez le cotonnier	9
2.3.2 La toxicité du gossypol chez les monogastriques	10
2.3.3 Les mécanismes de la toxicité du gossypol.....	12
2.4 Amélioration génétique du cotonnier cultivé	13
2.4.1 Le pool génique primaire	13
2.4.2 Le pool génique secondaire.....	13
2.4.3 Le pool génique tertiaire	14
2.4.4 Les relations cytogénétiques entre génomes du genre <i>Gossypium</i>	14
2.4.5 Les méthodes d'amélioration par hybridation interspécifique.....	14
2.5 Déterminisme génétique de la formation des glandes à gossypol chez le cotonnier cultivé.....	15
2.6 Création et exploitation des hybrides présentant un retard à la morphogenèse du gossypol dans les graines de cotonnier.....	16
2.6.1 Réservoirs génétiques utilisables pour une inhibition de la synthèse du gossypol	16
2.6.2 Bilan des recherches sur le cotonnier présentant le caractère « <i>glandless-seed and glanded plant</i> ».	16
3. LES OUTILS UTILISES POUR ANALYSER LA DESCENDANCE DE L'HYBRIDE HRS	21
3.1 Analyse phénotypique	21
3.1.1 Morphologie des cotonniers cultivés.....	21
3.1.2 Phénologie.....	22

3.1.3	Quantification de la teneur en gossypol du matériel végétal	23
3.2	Sélection assistée par l'emploi de marqueurs moléculaires	24
3.2.1	Les marqueurs moléculaires	24
3.2.2	Les différents types de marqueurs en amélioration génétique	25
3.2.3	Utilisation des microsatellites	26
3.2.4	Les marqueurs moléculaires et la mise en évidence de QTL (Quantitative Trait Loci)	27
3.3	Importance de la cytogenétique en hybridation interspécifique	28
3.3.1	Définition, principe et importance de la cytogénétique	28
3.3.2	La cytogénétique classique chez les plantes	29
3.3.3	La cytogénétique moléculaire : l'hybridation <i>in situ</i> génomique (GISH)	30
4.	DISTORSIONS DE SÉGRÉGATION ET AMÉLIORATION GÉNÉTIQUE DES PLANTES	32
4.1	Introduction	33
4.2	Intensité de la distorsion de ségrégation selon le type de population.....	34
4.3	Identification, direction et localisation des distorsions de ségrégation	35
4.4	Les facteurs de distorsion de ségrégation	36
4.4.1	Les facteurs non aléatoires	36
4.4.2	Les facteurs aléatoires	37
4.4.3	Facteurs favorisant la distorsion de ségrégation	38
4.5	Cartographie génétiques des loci avec distorsion de ségrégation.....	40
4.6	Implication de la distorsion de ségrégation en amélioration des plantes	41
4.7	Comment surmonter les distorsions de ségrégation ?	42
4.7.1	En amélioration des cultures	42
4.7.2	En cartographie génétique	43
4.8	Conclusion	45
5	MODALITES D'OBTENTION ET NATURE DU MATERIEL VEGETAL ETUDIE	47
5.1	Introduction	47
5.2	Schéma suivi pour la création de l'hybride HRS	47
5.3	Modalités de sélection du matériel retenu à chaque génération	48
5.4	Modalités de mise en culture des graines et les conditions expérimentales.....	48
5.4.1	Les modalités de mise en culture	48
5.4.2	Conditions expérimentales en Belgique	49
5.4.3	Conditions expérimentales au Sénégal.....	49
5.5	Méthodes appliquées pour obtenir le matériel végétal étudié	49
5.5.1	Les croisements	50
5.5.2	Les autofécondations.....	50
5.5.3	Le greffage des plants	50
5.6	Schéma suivi pour l'obtention du matériel végétal étudié	51
5.6.1	Les descendances autofécondées de la voie 1	53
5.6.2	Les descendances des voies 2, 3 et 4.....	53
6	EVALUATION DE L'EXPRESSION DU CARACTÈRE "INHIBITION DE LA SYNTHÈSE DU GOSSYPOL UNIQUEMENT DANS LA GRAINE".	55
6.1	Introduction	55
6.2	Matériel et méthodes	55
6.2.1	Matériel végétal.....	55
6.2.2	Observations et mesures	56
6.3	Résultats.....	57
6.3.1	Analyse de l'état des graines produites dans le cadre de la thèse	57

6.3.2	Expression du caractère inhibition de la synthèse de gossypol au niveau de la graine	59
6.4	Discussion.....	62
6.4.1	Analyse des problèmes de viabilité des graines	62
6.4.2	Expression du caractère inhibition de la synthèse du gossypol dans la graine ..	63
6.5	Conclusion.....	68
7	EVALUATION AGRO-MORPHOLOGIQUE DE QUATRE GENERATIONS ISSUES DE L'HYBRIDE TRISPÉCIFIQUE HRS	69
7.1	Introduction	69
7.2	Matériel et méthodes	69
7.2.1	Caractéristiques du site d'expérimentation	69
7.2.2	Matériel végétal.....	69
7.2.3	Conduite de l'étude	70
7.2.4	Analyse des données	72
7.3	Résultats.....	73
7.3.1	Phénologie.....	73
7.3.2	La morphologie	75
7.3.3	Evaluation de la production des plantes HRS testées	79
7.3.4	Associations des paramètres.....	83
7.3.5	Stratification de la variabilité des générations testées (ACP)	86
7.3.6	La classification ascendante	87
7.4	Discussion.....	88
7.4.1	Caractérisation agro morphologique des hybrides HRS	88
7.4.2	L'instabilité observée chez HRS et sa relation avec la teneur en gossypol des plantes	90
7.5	Conclusion.....	92
8	SUIVI DE L'INTROGRESSION DE <i>G. STURTIANUM</i> CHEZ L'HYBRIDE HRS AU MOYEN DE MARQUEURS MICRO-SATELLITES	94
8.1	Introduction.....	95
8.2.1	Matériel Végétal.....	95
8.2.2	Caractéristiques du site d'expérimentation	96
8.2.3	Extraction de l'ADN génomique total	96
8.2.4	Analyse de la descendance des hybrides HRS par les marqueurs microsatellites	96
8.2.5	Electrophorèse et révélation au nitrate d'argent.....	98
8.2.6	Traitement des données	98
8.3	Résultats.....	100
8.3.1	Suivi de l'introgession de <i>G. sturtianum</i> et analyse de la distorsion de ségrégation au moyen des 10 marqueurs moléculaires.....	100
8.3.2	Direction du biais chez les populations de HRS testées.....	108
8.3.3	Analyse du déterminisme génétique du caractère inhibition de la synthèse du gossypol dans la graine	109
8.4	Discussions	111
8.4.1	Suivi de l'introgession des allèles de <i>G. sturtianum</i> dans les descendance testées de l'hybride HRS.....	111
8.4.2	La distorsion de ségrégation chez les différentes populations testées	113
8.4.3	Causes de la DS chez les plantes HRS	114
8.4.4	Mécanismes de la DS chez HRS	116
8.4.5	Conséquences de la DS chez les plantes HRS	120

8.5	Conclusion.....	124
9	IDENTIFICATION DE NOUVEAUX MARQUEURS SSRs SPÉCIFIQUES DE <i>G. STURTIANUM</i> DANS LA DESCENDANCE DE L'HYBRIDE HRS	126
9.1	Introduction	126
9.2	Matériel et méthode	126
9.2.1	Matériel Végétal.....	126
9.2.2	Méthode.....	127
9.3	Résultats.....	129
9.3.1	Identification de nouveaux SSRs	129
9.4	Discussion.....	134
9.5	Conclusion.....	135
10	ANALYSE AU MOYEN DE MÉTHODES CYTOGÉNÉTIQUES CLASSIQUE ET MOLÉCULAIRE D'UNE PARTIE DE LA DESCENDANCE DE L'HYBRIDE HRS.....	136
10.1	Introduction	136
10.2	Matériel et méthodes	136
10.2.1	Matériel	136
10.2.2	Analyse de la fertilité pollinique	137
10.2.3	Observation des appariements chromosomiques	137
10.2.4	Étalement et observation des chromosomes des cellules de pointes de racine	138
10.2.5	Hybridation in situ génomique (GISH).....	139
10.3	Résultats.....	142
10.3.1	Mise en évidence de l'hétérozygotie structurelle chez l'hybride HRS	142
10.3.2	Association des chromosomes en méiose	146
10.3.3	Analyse des tétrades	148
10.3.4	Fertilité pollinique	149
10.4	Discussion.....	150
10.4.1	Hétérozygotie structurelle et distorsion de ségrégation	150
10.4.2	Relations entre l'hétérozygotie structurelle et les mécanismes de DS identifiés avec les 10 SSRs	153
10.4.3	Hétérozygotie structurelle et stabilité génétique des descendants de l'hybride HRS	156
10.4.4	Hétérozygotie structurelle et expression du caractère « <i>glandless-seed</i> »	159
10.5	Conclusion.....	159
11	CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES.....	160
	BIBLIOGRAPHIE	173

AVANT PROPOS

Au début de nos recherches, l'objectif qui nous avait été attribué était d'essayer de fixer le caractère « *glandless-seed and glanded-plant* » par une élimination de supposées mauvaises liaisons existantes dans le matériel, afin de développer une variété commerciale de cotonnier produisant des graines comestibles. Cette étude devait constituer l'épilogue d'une longue série de recherches débutées depuis le début des années 1990, à Gembloux, sous les directions d'éminents chercheurs qui ont effectués chacun à leur niveau, un excellent travail ; Mme H. Benbouza M. G. Mergeai et M. I. Vroh Bi . Cependant, la nature étant souvent beaucoup plus complexe qu'on ne le croit, on s'est rendu compte, après un long détour par les techniques de mutations génétiques, dont les données non reprises dans ce document ont fait l'objet d'une publication, que le matériel n'avait pas encore révélé tout ses mystères. En effet, l'exposition d'une partie du matériel à 15 Krad de rayons gamma pour éliminer les mauvaises liaisons, qui étaient supposées empêcher la fixation du caractère recherché, a conduit à une impasse. A partir de ce moment, il paraissait évident que nous devions d'abord nous concentrer sur la compréhension du matériel végétal avant de poursuivre la sélection. Nous n'avons pas la prétention de dire que nous y sommes arrivés, mais au moins un pan du voile a été levé, ce qui nous a permis de repenser le plan d'exploitation d'hybrides interspécifiques incluant une espèce australienne de cotonnier en vue de l'introggression chez le cotonnier cultivé de l'inhibition de la synthèse du gossypol uniquement dans la graine. Cette ouverture donne un espoir sur la perspective de produire des graines comestibles, tout en préservant un des principaux mécanismes de protection de la plante contre les attaques de ravageurs.

1. INTRODUCTION

Le cotonnier, principalement cultivé pour sa fibre, le coton (ou lint), est la première plante textile au monde (Lusas et Jividin, 1987). Il appartient au genre *Gossypium* qui comprend 49 espèces dont quatre sont cultivées (Fryxell, 1992). Parmi celles-ci, *Gossypium hirsutum* L. est l'espèce la plus importante économiquement ; elle fournit à elle seule près de 95% de la production mondiale de fibre (Bocchino, 1999 ; Wendel, Cronn, 2003). Selon le Comité Consultatif International du Coton (CCIC) (2014), 130 pays dans le monde cultivent le cotonnier, avec une production d'environ 27 millions de tonnes de fibre par an. Cette production occupe 2,5% de la superficie arable mondiale, soit 30 millions d'hectares (Bocchino, 1999 ; Estur, 2006 ; CCIC, 2014). La production et la transformation cotonnière emploient environ 10 millions de personnes à travers le monde. En Afrique de l'Ouest et principalement dans la zone soudano-sahélienne, le cotonnier constitue une des plus importantes cultures de rente. Avec une production de 35 à 50 mille tonnes par an, le coton joue un rôle économique majeur au Sénégal, ce qui lui confère une grande importance dans la mise en œuvre de programmes de lutte contre la pauvreté (SODEFITEX, 2005). Il contribue grâce à ses graines riches en nutriments à l'amélioration de l'alimentation humaine et animale. En effet, l'amande de la graine contient approximativement 38% de lipides et 39% de protéines, ce qui le positionne à l'échelle mondiale, au rang de deuxième plante protéagineuse et de cinquième plante oléagineuse (Alford *et al.* 1996).

Cependant, l'utilisation de cette ressource est hypothéquée par la présence chez presque toutes les espèces du genre *Gossypium*, de petites glandes lysigènes produisant une substance phénolique appelée gossypol. Cette substance est aussi bien présente dans les parties aériennes, que dans l'amande des graines. Les glandes à gossypol agissent comme moyen naturel de défense contre certains insectes, mais présentent une toxicité pour les animaux monogastriques, l'homme en particulier. La présence du gossypol dans la graine diminue fortement la valeur alimentaire des sous-produits (tourteau et huile) et limite leur emploi dans l'alimentation. Selon Mergeai (1992b), l'huile et les tourteaux obtenus par pression des graines, contiennent des quantités importantes de gossypol. L'élimination de ce dernier exige le recours à des procédés qui dénaturent la qualité du contenu protéique des tourteaux et diminuent sa valeur alimentaire.

Il existe cependant des variétés dites « *glandless* », qui sont complètement dépourvues de gossypol, mais cette particularité rend la plante vulnérable car elle ne présente plus le système

naturel de défense que constituaient ces glandes à gossypol. Cela entraîne une augmentation du coût de production car il faut alors appliquer de plus grandes quantités d'insecticides pour protéger la plante.

Il existe aussi dans le genre *Gossypium*, certaines espèces diploïdes sauvages d'Australie qui présentent un caractère susceptible d'améliorer qualitativement la production du cotonnier et de mieux valoriser les sous-produits issus de la graine. Ces espèces ont la particularité de produire des glandes à gossypol dans tous leurs organes sauf au niveau des graines (Rooney et Stelly 1991 ; Brubaker, 1996 ; Mergeai *et al.* 1997 ; Vroh Bi *et al.* 1998). Compte tenu du grand intérêt de ce caractère pour une meilleure valorisation des sous-produits de la graine du cotonnier, son introgression chez la principale espèce cultivée a été tentée par plusieurs équipes de chercheurs dans le monde. A Gembloux Agro-Bio-Tech, cela a abouti à la création de l'hybride trispécifique HRS [$(G. \textit{hirsutum} \times G. \textit{raimondii})^2 \times G. \textit{sturtianum}$] (désigné par le sigle HRS dans la suite du texte), en utilisant le cotonnier cultivée *G. hirsutum*, le cotonnier sauvage australien *G. sturtianum* Willis donneur du caractère «*glandless-seed and glanded-plant* », et *Gossypium raimondii* Ulb comme espèce pont, (Mergeai *et al.* 1997, Vroh Bi *et al.* 1998).

Cependant, le transfert de caractères en provenance d'espèces sauvages vers les espèces cultivées est une opération délicate compte tenu des barrières d'incompatibilité qui empêchent la réussite de croisements entre ces espèces (Cauderon, 1981). Ainsi, les plantes hybrides HRS obtenues sont très instables avec un taux élevé de mortalité et de stérilité. Après deux générations de rétrocroisements et cinq générations d'autofécondations réalisées sur l'hybride HRS, trois groupes de liaison c2-c14, c3-c17 et c6-c25 ont été identifiés comme étant associés à l'expression de l'inhibition de la synthèse du gossypol uniquement dans la graine (Benbouza, 2004). Cependant, la majorité des segments d'ADN introgressés au niveau de ces groupes de liaison sont toujours hétérozygotes. La probabilité pour qu'un tel phénomène soit uniquement dû au hasard est inférieure à $1/10^4$. On peut donc supposer que ces segments de chromosomes introgressés de *G. sturtianum* portent des facteurs qui empêchent la stabilité du matériel et la fixation du caractère. Dans ce contexte et afin de développer des variétés commerciales de cotonnier exprimant le caractère «*low gossypol seed & high gossypol plant* », il est nécessaire d'éliminer les facteurs qui empêchent la stabilité du matériel végétal obtenu.

Le présent travail qui vient à la suite des travaux de Vroh Bi, (1999) et Benbouza, (2004), est une contribution à la sélection d'une variété de cotonnier présentant une inhibition de la synthèse du gossypol uniquement dans la graine. Il vise à identifier les facteurs responsables de l'instabilité observée chez HRS, afin de proposer des solutions pour les contourner. Pour atteindre cet objectif, nous réaliserons une caractérisation agro-morphologique, cytogénétique et moléculaire de populations de graines et de plantes produites à partir du matériel disponible au moment du démarrage de notre thèse.

2. AMELIORATION DU COTONNIER CULTIVE PAR UNE INHIBITION DE LA SYNTHÈSE DU GOSSYPOL ET PRÉSENTATION DU MATÉRIEL VÉGÉTAL

2.1 Présentation du cotonnier

2.1.1 Systématique et nomenclature

Le cotonnier est une dicotylédone, dialypétale appartenant au règne des Viridiplantae, à l'ordre des Malvales, à la famille des Malvaceae, à la tribu des Hibisceae et au genre *Gossypium*.

Le nombre chromosomique de base du genre est 13. Les travaux de Skovsted (1933, 1937) ont permis de distinguer selon le nombre chromosomique, deux grandes catégories parmi les espèces de cotonnier : les diploïdes ($2n = 2x = 26$), elles sont actuellement au nombre de 44, et les tétraploïdes ($2n = 4x = 52$), au nombre de cinq.

La classification actuelle permet de distinguer 8 groupes génomiques A, B, C, D, E, F, G, K. La lettre A est attribuée au génome des deux espèces diploïdes cultivées (Beasley, 1942). Les autres lettres attribuées aux génomes des espèces sauvages, sont classés selon leur affinité avec le génome A. Le niveau décroissant de cette affinité avec le génome A est évalué par le taux d'appariement allosyndétique chez les hybrides de ces génomes. Il suit l'ordre B, F, C, G, D, E ; l'affinité avec le génome K n'a pas encore été évaluée.

De tous les groupes génomiques, seuls les cytotypes A et AD contiennent des espèces qui produisent une fibre filable. Au sein d'un même génome, les différenciations génomiques et cytologiques sont représentées par l'adjonction d'un ou de deux signes placés en indice à la suite de la lettre majuscule qui caractérise le génome correspondant. Ainsi, au niveau d'un même génome une différence génétique et cytologique se distingue par l'ajout en indice d'un premier chiffre ou lettre (A_1 , A_2 , etc.). S'il s'agit d'une différence seulement génétique et non cytologique, un second chiffre ou lettre est ajouté (D_{2-1} et D_{2-2} ou D_{3-d} et D_{3-k}) (Kammacher, 1956). Le tableau 1 présente les différents groupes génomiques du genre *Gossypium* et leurs espèces.

Tableau 1: Présentation des espèces des différents groupes génomiques du genre *Gossypium*

Génomes	Localisation	Espèces
A	Espèces cultivées asiatiques et africaines	<i>G. herbaceum</i> (A ₁) et <i>G. arboreum</i> (A ₂)
B	Espèces sauvages typiquement africaines	<i>G. anomalum</i> (B ₁), <i>G. triphyllum</i> (B ₂), <i>G. barbosanum</i> B ₃ , <i>G. capitiviridis</i> (B ₄)
C	Espèces sauvages australiennes	<i>G. sturtianum</i> (C ₁), <i>G. robinsonii</i> (C ₂), <i>G. nandewarensis</i>
D	Espèces sauvages américaines	<i>G. thurberi</i> (D ₁), <i>G. armourianum</i> (D _{2,1}), <i>G. harknessii</i> (D _{2,2}), <i>G. davidsonii</i> (D _{3,4}), <i>G. klotzschianum</i> (D _{3,4}), <i>G. aridum</i> (D ₄), <i>G. raimondii</i> (D ₅), <i>G. gossypoides</i> (D ₆), <i>G. lobatum</i> (D ₇), <i>G. trilobum</i> (D ₈), <i>G. laxum</i> (D ₉), <i>G. turneri</i> (D ₁₀), <i>G. schwendimanii</i> (D ₁₁)
E	Espèces sauvages d'Arabie et de la corne de l'Afrique	<i>G. stocksii</i> (E ₁), <i>G. somalense</i> (E ₂), <i>G. areysianum</i> (E ₃), <i>G. incanum</i> (E ₄), <i>G. benadirensis</i> , <i>G. bricchettii</i> , <i>G. vollesenii</i>
F	Espèce sauvage d'Afrique de l'Est	<i>G. longicalyx</i> (F ₁)
G	Espèces sauvages australiennes	<i>G. bickii</i> (G ₁), <i>G. australe</i> (G ₂), <i>G. nelsonii</i>
K	Espèces sauvages du Nord de l'Australie	<i>G. costulatum</i> , <i>G. cunninghamii</i> , <i>G. enthyale</i> , <i>G. exiguum</i> , <i>G. nobile</i> , <i>G. pilosum</i> , <i>G. populifolium</i> , <i>G. pulchellum</i> , <i>G. rotundifolium</i> , <i>G. sp. novum</i>
AD	Espèces cultivées d'Amérique	<i>G. hirsutum</i> (AD) ₁ , <i>G. barbadense</i> (AD) ₂
	Espèces sauvages des Iles Hawaii	<i>G. tomentosum</i> (AD) ₃
	Espèces sauvages du Brésil	<i>G. mustelinum</i> (AD) ₄
	Espèces sauvages Ile Galapagos	<i>G. darwinii</i> (AD) ₅

Source : Konan et Mergeai, (2007)

2.1.2 Origine et spéciation

Le centre d'origine du cotonnier reste encore une énigme. L'hypothèse selon laquelle le genre *Gossypium* descendrait d'un phylum ancestral aujourd'hui disparu qui était présent en Afrique centrale a été émise. Ce phylum se serait scindé en génomes, conséquence d'un isolement géographique prolongé (Parry, 1982). D'autres études basées sur des reconstitutions paléontologiques et l'analyse des séquences d'ADN chloroplastique (Wendel, 1989; Wendel *et al.* 1992) suggèrent que l'origine du genre *Gossypium* serait l'Australie ou l'Afrique.

Les espèces diploïdes seraient issues du même phylum ancestral qui a donné naissance à tous les cotonniers.

Les espèces tétraploïdes seraient apparues par hybridation spontanée de deux espèces diploïdes. Une africaine ou asiatique (génomme A) qui serait probablement un ancêtre de *G. herbaceum*, avec une espèce diploïde américaine de génome D qui serait apparentée à *G. raimondii* ou *G. gossypoides* (Endrizzi *et al.* 1985 Wendel *et al.* 1989; Wendel et Cronn, 2003).

La figure 1 présente le processus de différenciation des espèces du genre *Gossypium*. La classification des espèces du genre *Gossypium* telle qu'elle est définie actuellement, concorde avec la répartition géographique des différents groupes de génomes. En effet, chaque génome correspond à une aire géographique.

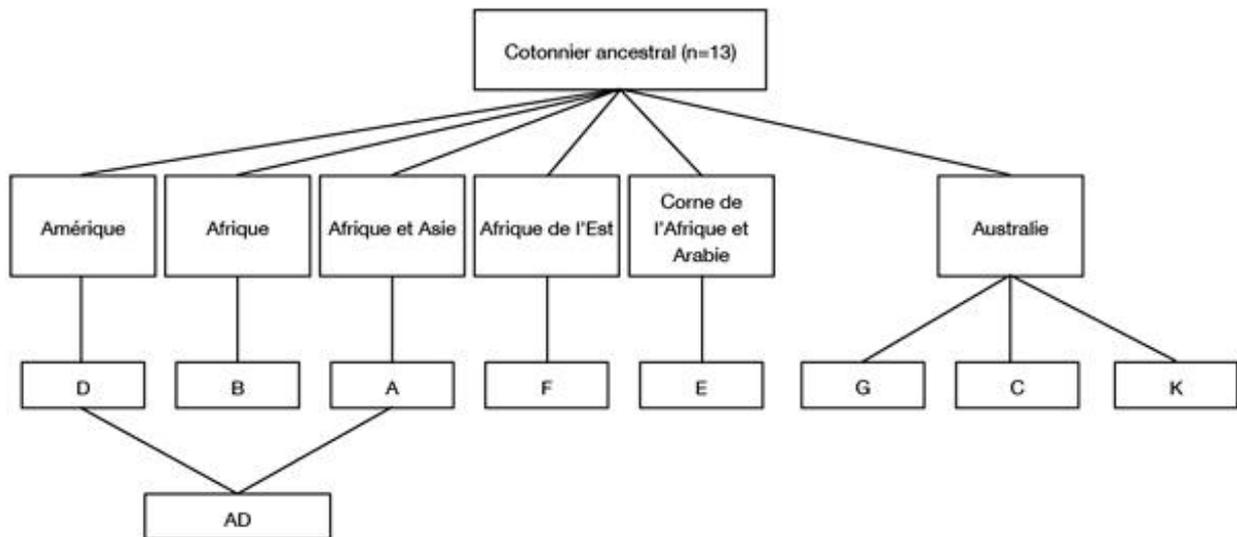


Figure 1: Répartition géographique des différentes formes génomiques des espèces du genre *Gossypium*

- Génome A : 2 espèces diploïdes sauvages et cultivées en Afrique et en Asie
- Génome B : 4 espèces sauvages africaines
- Génome C : 2 espèces sauvages australiennes
- Génome D : 13 espèces sauvages américaines
- Génome E : 7 espèces sauvages est-africaines et du Moyen Orient
- Génome F : 1 une seule espèce diploïde sauvage est-africaines
- Génome G : 3 espèces sauvages diploïdes australiennes
- Génome K : 12 espèces sauvages du nord de l'Australie (en cours de classement)
- Génome AD : 5 espèces cultivées et sauvages d'Amérique

Les quarante cinq (45) espèces sauvages répertoriées sont impropres à tout usage textile mais constituent un important réservoir de gènes utiles pour l'amélioration des espèces cultivées.

2.1.3 Domestication du cotonnier

La domestication du cotonnier remonte aux temps préhistoriques. L'homme, en raison des possibilités d'utilisation des fibres pour se couvrir, s'est approprié cette plante. Le fragment le plus ancien connu a une origine que l'on situe vers 3000 ans avant J.C et fut découvert dans les excavations de Mohenjo-daro dans la vallée de l'Indus, partie ouest du Pakistan (Parry, 1982). Selon Kammacher, (1956) et Parry, (1982), cette domestication s'est produite indépendamment en Afrique, en Amérique et en Asie.

Ainsi, quatre espèces qui forment le groupe des cotonniers cultivés ont été domestiquées. Elles se caractérisent par la présence sur les graines de poils cellulosiques filables utilisés par l'industrie textile. Il s'agit de deux espèces diploïdes du génome A (*G. herbaceum* L. et *G. arboreum* L. produisant le coton dit indien à fibre épaisse et courte) et de deux espèces tétraploïdes du génome (AD) (*G. barbadense* L. produisant le coton dit égyptien à fibre longue et fine, et *G. hirsutum* L. produisant le coton dit Upland à fibre de caractéristiques intermédiaires par rapport aux autres).

G. hirsutum constitue l'espèce de cotonnier la plus exploitée au monde avec environ 95% de la production mondiale (Bocchino, 1999 ; Wendel et Cronn, 2003).

La domestication des espèces diploïdes de l'ancien Monde a commencé en Asie, le cotonnier cultivé se serait développé d'abord en Iran et dans les pays voisins dans une région allant de l'Arabie dans la vallée de l'Indus, avant d'être dispersé vers l'Asie centrale, la Chine et l'Inde (Hau *et al.* 1997).

Pour ce qui est des tétraploïdes du nouveau monde, la domestication s'est produite au Pérou pour *G. barbadense* et au Yucatan (Mexique) pour *G. hirsutum* (Ano *et al.* 1982 ; Wendel *et al.* 1992 ; Brubaker *et al.* 1994).

2.2 Intérêt du cotonnier dans l'alimentation

2.2.1 Les sous-produits de la graine de cotonnier

La récolte du cotonnier donne en moyenne 60% de graines et 40% de fibres. La graine est constituée pour 50% de son poids par l'amande, pour 40 à 45% de coque et pour le reste par le duvet ou fuzz (ensemble des poils de quelques millimètres de longueur recouvrant la graine) (Parry, 1982).

L'amande renferme 30 à 40% d'huile, 30 à 40% de protéines et de la cellulose. L'huile du cotonnier est très riche en acides gras (linoléique, palmitique et oléique), dont 75% d'acides gras non saturés qui lui confèrent une excellente qualité alimentaire.

L'extraction de l'huile à partir de l'amande donne deux autres sous-produits : les tourteaux et la farine de coton. Les tourteaux sont caractérisés par leur grande richesse en matière protéique, celle-ci présentant un spectre équilibré en acides aminés, notamment en méthionine, lysine et tryptophane. Cela justifie leur utilisation comme supplément protéique de haute valeur nutritionnelle dans l'alimentation animale. Le principal frein à un tel emploi est la présence du gossypol, pigment toxique pour l'homme et les autres animaux monogastriques.

La haute valeur nutritionnelle de la graine est liée à la qualité des protéines, à la composition des lipides et à l'absence de composés toxiques comme le gossypol (Parry, 1982 ; Marquié *et al.* 1995).

2.2.2 Intérêt et utilisation des sous-produits de la graine de cotonnier dans l'alimentation humaine et animale

Toutes les composantes de la graine sont utilisables à des fins variées. Le sous-produit le plus important est l'huile et subsidiairement les tourteaux et la farine ; le duvet et la coque de la graine ne sont cependant pas à négliger bien qu'ils ont une moindre valeur économique (Parry, 1982).

L'huile de coton sans gossypol présente après raffinage un goût agréable et une composition en acides gras essentiels satisfaisante sur le plan nutritionnel. Elle est riche en acide linoléique, substance pouvant agir contre l'hypercholestérolémie et les accidents cardiovasculaires. Cette huile permet en outre un bon développement du système nerveux central chez le fœtus (Ketekou, 1985). Sa richesse en vitamine E, qui est un antioxydant naturel, lui confère une bonne stabilité à haute température.

Les farines de coton, correctement déshuilées et dégossypolées, ont de nombreux usages en alimentation humaine et animale. Elles peuvent être également mélangées à des farines de céréales pour faire du pain, des biscuits. La farine peut aussi entrer dans la composition de sauces, de bouillies ou servir d'aliment de sevrage (Parry, 1982). Une étude sur les aliments riches en protéines a été réalisée par l'O.R.A.N.A (Organisme de Recherche sur l'Alimentation et la Nutrition Africaine) et le service de pédiatrie de l'hôpital le Dantec à

Dakar. Elle a permis de conclure que la farine de coton constitue un aliment hyperprotéiné comparable aux produits commerciaux actuels. En particulier l'association farine de coton / farine de mil, complétée par 10% de lait en poudre, permet d'obtenir un produit de très faible prix de revient, de bonne acceptabilité, de bonne teneur en protéine, utilisable tant pour la thérapie du Kwashiorkor (malnutrition protéique grave affectant un grand nombre d'enfants des pays pauvres) que pour le sevrage courant (Parry, 1982).

La graine de coton est également très intéressante à cause de sa teneur en arginine qui est trois fois plus importante que celle du lait maternel. En effet, l'arginine est importante dans la régulation de la pression sanguine, elle permet de prévenir l'évolution de certains cancers (Alford, 1996).

Les graines et les farines de cotonnier sans gossypol présentent non seulement l'avantage de posséder une excellente valeur nutritionnelle et un goût agréable, mais elles constituent aussi les matières premières " oléoprotéagineuses " les moins chères dans le monde. Il est donc tout à fait souhaitable de voir se développer une nouvelle industrie de transformation de ces produits. Les développements industriels pourraient porter sur la préparation d'aliments pour les animaux et sur l'élaboration de produits alimentaires pour les hommes (laits maternisés, biscuits, pains, lait végétal etc.) (Marquié *et al.* 1995).

2.3 Limites de l'utilisation des sous-produits de la graine du cotonnier dans l'alimentation

L'utilisation des sous produits de la graine du cotonnier dans l'alimentation est freinée par la présence de substances phénoliques qui sont utiles pour la protection de la plante mais toxiques pour l'ensemble des monogastriques. Selon les standards de la FAO, la concentration de gossypol dans l'alimentation ne doit pas dépasser 0.02–0.04%.

2.3.1 Le gossypol chez le cotonnier

Les glandes à gossypol sont présentes dans tous les organes du cotonnier, ainsi que dans l'amande des graines, sauf sur les racines. Elles sont situées en plus ou moins grande profondeur dans les tissus mais toujours en dehors du bois. Ce sont des sacs ovoïdes, de 0,1 à 0,4 mm de diamètre, bordés de cellules, qui libèrent à l'intérieur des composés rougeâtres (partie exposée à la lumière) ou jaunâtres. Le gossypol, qui en constitue l'élément essentiel, confère à la plante une résistance naturelle aux insectes. C'est un pigment polyphénolique se trouvant en concentration variable selon la partie de la plante. Il existe sous deux formes :

libre et liée. La forme libre est toxique tandis que celle liée, complexée aux acides aminés de certaines protéines, est considérée comme non-toxique mais dégrade la qualité protéique de la matière première contenant ces protéines.

Les glandes à pigments contiennent un mélange d'aldéhydes terpéniques, comprenant le gossypol, l'hémigossypolone et les héliocides H₁, H₂, H₃, H₄. Le gossypol et ces autres composés confèrent à la plante une résistance naturelle aux insectes tels que *Heliothis virescens* f. (Hedin *et al.* 1992), et des propriétés antimicrobiennes. Le désoxyhémigossypol (dHG) et l'hémigossypol (HG), composés très toxiques, sont synthétisés par la plante en réponse à l'invasion des champignons pathogènes tels que *Verticillium dahliae* f. et *Fusarium oxysporum* f. sp *vasinfectum* (Liu *et al.* 1999).

Ces composés sont responsables de l'action du contenu des glandes à gossypol sur les ravageurs ; ils agissent en se liant à des groupements protéiques de la salive et des glycoprotéines de la bouche, pour produire un goût repoussant qui est à l'origine de leur effet répulsif (Benbouza, 2004).

Malheureusement, la présence du gossypol pose des problèmes particuliers pour l'utilisation alimentaire des sous-produits issus de la graine de cotonnier chez les monogastriques.

2.3.2 La toxicité du gossypol chez les monogastriques

L'avis, adopté en décembre 2008 par l'autorité européenne de sécurité des aliments, concluait que les monogastriques, tels que le porc, le lapin, la volaille et l'homme sont les espèces les plus sensibles à la toxicité du gossypol, les ruminants s'avérant plus tolérants (Alexander *et al.* 2008).

Les signes cliniques de toxicité du gossypol sont similaires chez tous les monogastriques. Il s'agit essentiellement de troubles respiratoires, d'anorexie, d'une dépression nerveuse chronique et des problèmes cardiaques, qui aboutissent fréquemment à la mort (Gamboa *et al.* 2001). Cette toxicité peut aussi atteindre d'autres organes comme les poumons, le foie et les cellules du sang ; ce qui augmente la fragilité des globules rouges (Alexander *et al.* 2008).

Chez l'homme et les autres mammifères, la toxicité sur la reproduction est particulièrement visible chez les mâles ; les testicules sont les principaux organes cibles du gossypol (Waites, 1986). Il entraîne une réduction du nombre de spermatozoïdes de moitié, et peut aussi affecter la toxicité des cellules de Sertoli et de Leydig (Alexander *et al.* 2008). Selon Waites, (1986) le constat est parti d'une substitution de l'huile de soja ; habituellement utilisée avec l'huile de

coton dans les préparations culinaires en Chine durant les années 1930. Le gossypol encore présent dans l'huile aurait provoqué une période de stérilité généralisée chez les consommateurs durant cette période, d'où l'intérêt que lui porte la recherche pour le développement de la contraception masculine (Qian et Wang, 1984; Amini et Kamkar, 2005). Une expérimentation a montré que donné régulièrement même à faible dose le gossypol supprimait totalement de manière irréversible la production de spermatozoïdes chez les hommes (Waites, 1986 ; Waites *et al.* 1998 ; Dodou, 2005). Chez les femelles, l'ingestion du gossypol peut entraîner une forte fièvre, une aménorrhée et une atrophie de l'utérus ; ce qui va perturber les cycles de l'œstrus, la grossesse et le développement précoce de l'embryon (Alexander *et al.* 2008).

La toxicité du gossypol à doses élevées n'est pas négligeable, elle entraîne de multiples effets secondaires. Il s'agit essentiellement du vomissement, des selles molles, d'une baisse du poids, de la cytotoxicité des cellules germinales, de l'augmentation de l'excrétion de potassium qui peut aller de 1 à 4% dans les urines des hommes ; entraînant une hypokaliémie (Waites, 1986, Alexander *et al.* 2008). Parfois les conséquences sont tellement graves qu'on peut assister à des troubles neuromusculaires qui dans certains cas ont conduit à une paralysie transitoire (Waites, 1986), mais aussi à une anémie progressive et un changement morphologique du cœur et des reins (Alexander *et al.* 2008).

Chez le poulet de chair, le gossypol entraîne une diminution de la vitesse de croissance, une diminution de l'indice de consommation et une mortalité plus ou moins importante (Diaw *et al.* 2012). Au niveau des pondeuses, il peut être la cause d'une diminution de la ponte, du taux d'éclosion, et d'une coloration en vert olivâtre du jaune d'œuf, d'autant plus intense que la durée de conservation est importante (Dethier, 1987).

Par contre les protéines solubles du rumen confèrent aux ruminants une résistance partielle contre les effets du gossypol, même si une diminution du gain de poids et de la production laitière peut découler d'une ingestion de gossypol chez ces derniers (Tran, 1994). De plus, ingéré en grandes quantités, le gossypol a une action laxative chez l'adulte et un retard de croissance en raison du développement incomplet du rumen chez le veau (Rivière, 1977).

Par ailleurs, d'autres études ont montré que la toxicité du gossypol lui confère des propriétés antivirales, antifongiques, antiparasitaires, et antitumorales chez l'être humain (Dao, 2002). Ceci montre son intérêt comme agent anti-cancérogène, et pour le traitement des bronchites (Percy *et al.* 1996 ; Vander Jagt *et al.*, 2000).

2.3.3 Les mécanismes de la toxicité du gossypol

Selon Alexander *et al.* (2008), les mécanismes de la toxicité du gossypol ont fait l'objet de beaucoup d'études qui ont principalement démontré que le gossypol et ses métabolites exercent un potentiel pro- et anti-oxydant. Ces études ont mis en évidence un stress oxydatif et une scission de l'ADN, qui sont les caractéristiques du cycle- redox par un transfert d'électrons dans les biosystèmes (Kovacic, 2003).

Par ailleurs, le gossypol se lie aux membranes microsomales, inhibe la synthèse de l'ADN, et provoque une diminution du fer et du glutathion dans les cellules des mammifères (Gawai *et al.* 1995). Il inhibe aussi spécifiquement, la 11 β -hydroxy- stéroïde déshydrogénase (11 β -HSD), qui oxyde le cortisol pour inactiver la cortisone dans les reins et d'autres tissus importants dans l'électrolyse du potassium et de la régulation du sodium, ce qui provoque une hypokaliémie qui a des effets sur la spermatogenèse (Waites *et al.* 1998). Cette dernière peut aussi être perturbée par d'autres mécanismes, parce que le gossypol a aussi la capacité de bloquer la communication intercellulaire des cellules de Sertoli qui sont très importantes dans la production du sperme (Fiorini *et al.* 2004; Zhou *et al.* 2008).

En ce qui concerne la qualité des protéines, le gossypol se fixe au groupement NH₂ libre d'acides aminés protéiques, diminuant ainsi leur qualité par modification chimique, grâce aux fonctions aldéhydiques qui lui confèrent son effet toxique. Cette toxicité dépend de l'espèce animale, de la source du gossypol, de la quantité ingérée, de la période de consommation, de l'âge de l'animal, et des conditions de stress (Gamboa *et al.* 2001). En outre, si le gossypol est apporté en tant que contraceptif, son effet toxique n'est pas aussi rapide chez certains animaux comme les rats, les singes et les hommes. Par contre, chez d'autres comme les chiens, les souris, les lapins, les cochons, la toxicité du gossypol peut s'observer avant qu'il n'agisse sur la fécondité (Yu, 1987 ; cité par Gamboa *et al.* 2001).

Chez les ruminants, le gossypol peut jouer le rôle d'un inhibiteur d'enzymes, ce qui fait qu'ils ne présentent qu'exceptionnellement des signes d'intoxication. Selon Cheftel *et al.* (1986), une partie du gossypol ingéré, se combine à des protéines pour donner naissance à des composés stables qui ne sont pas absorbés au niveau du rumen.

2.4 Amélioration génétique du cotonnier cultivé

L'amélioration génétique du cotonnier vise à créer des variétés susceptibles d'apporter des caractères répondant aux exigences des utilisateurs. Pendant longtemps, cette amélioration n'a concerné que l'hybridation intraspécifique, qui exploite la variabilité génétique existant à l'intérieur d'une espèce.

Cependant, dans un souci d'enrichir les espèces cultivées, l'exploitation de la variabilité génétique qu'offrent les espèces sauvages en gènes étrangers, portant des caractères d'intérêt, s'obtient par la réalisation d'hybrides interspécifiques à partir des nombreuses espèces diploïdes du genre *Gossypium*.

Le transfert de caractères en provenance d'espèces sauvages vers le cotonnier cultivé est une opération délicate compte tenu des barrières d'incompatibilité interspécifique qu'il est nécessaire de surmonter. Ainsi la connaissance des affinités intergénomiques permet au sélectionneur d'explorer les potentialités génétiques qu'offre le genre *Gossypium*. Il faut prendre en compte les barrières d'isolement entre espèces qui peuvent entraver le transfert de matériel génique. De ce fait, pour obtenir des cultivars améliorés, à la fois productifs et stables, une grande diversité génétique est nécessaire afin de servir de réservoir de gènes. Selon Harlan et de Wet (1971), les ressources génétiques d'une espèce cultivée se distinguent, suivant la difficulté croissante à surmonter les barrières d'incompatibilité, en pools géniques, primaire, secondaire et tertiaire.

2.4.1 Le pool génique primaire

Le réservoir génique primaire est constitué de toutes les formes cultivées, subspontanées et sauvages de *G. hirsutum* et de tous les cotonniers tétraploïdes du genre *Gossypium* (Stewart, 1995). Les croisements avec les formes cultivées aboutissent à des recombinaisons directes. La création d'hybrides par voie sexuée ne nécessite aucune technique particulière.

2.4.2 Le pool génique secondaire

Ce pool génique comprend les espèces à partir desquelles l'obtention d'hybrides fertiles avec *G. hirsutum* nécessite des manipulations relativement complexes. Il regroupe les espèces diploïdes des génomes A, D, B ou F (Stewart, 1995).

2.4.3 Le pool génique tertiaire

Le réservoir génique tertiaire de même que le pool secondaire, regroupe les espèces de cotonnier dont les chromosomes ont une homéologie envers ceux des deux sous-génomes constitutifs de l'espèce cultivée *G. hirsutum*. Ce sont les espèces diploïdes australiennes des génomes C, G, K et le génome E qui est génétiquement le plus éloigné de l'espèce cultivée. Ce sont les espèces dont l'utilisation pose le plus de difficultés en raison des obstacles à surmonter pour créer l'hybride et de la faiblesse du taux de recombinaison chromosomique (Stewart, 1995).

2.4.4 Les relations cytogénétiques entre génomes du genre *Gossypium*

La fertilité des hybrides d'espèces appartenant à des génomes différents varie en fonction du degré d'affinité qui existe entre leurs lots chromosomiques respectifs. Il a été démontré qu'il y a une forte relation entre la stérilité des hybrides et l'éloignement phylétique des parents. Les croisements réalisés entre différents génomes donnent des résultats très aléatoires en ce qui concerne : la fertilité des hybrides, la réussite des croisements, la viabilité des graines, la vigueur de la plante hybride, etc. En effet, il existe des différences marquées entre les génomes de *Gossypium* concernant en particulier la taille des chromosomes (Stephens, 1947 ; Katterman *et al.* 1970). L'établissement des niveaux de divergence entre génomes et les relations caryologiques sont basés sur la fréquence des chromosomes non appariés (univalents) ou appariés en excès (multivalents). Cette fréquence d'appariement des chromosomes dépend des différences structurelles qui existent entre les chromosomes.

L'obtention d'hybrides fertiles à partir du croisement d'espèces à génomes diploïdes et de cotonniers à génomes tétraploïdes est variable et dépend essentiellement des cytotypes en présence. Il ne peut y avoir introgression que s'il existe un degré suffisant d'appariements hétérogénétiques (Ndungo *et al.* 1988). Le niveau d'affinité des chromosomes des génomes diploïdes vis-à-vis des génomes tétraploïdes (AD) va en diminuant selon l'ordre A, D, F, B, C, G et E (Ndungo *et al.* 1988, Mergeai, 1992a).

2.4.5 Les méthodes d'amélioration par hybridation interspécifique

Compte tenu des nombreuses barrières d'incompatibilité pré ou post-zygotiques qu'il est nécessaire de surmonter, le transfert de caractères en provenance d'une espèce diploïde vers le cotonnier cultivé est une opération délicate. Cependant, certaines techniques permettent la réalisation de schémas de croisement. Il s'agit de la colchidiploïdisation, de l'application de

régulateurs de croissance au moment de la fécondation, et éventuellement du recours à l'embryoculture. Il existe quatre grands schémas de croisement permettant le transfert de caractères des espèces sauvages vers le cotonnier cultivé. Ceux-ci sont :

- la création d'un hybride bispécifique par la méthode dite aphyllétique d'introgession ;
- la méthode dite paraphyllétique qui nécessite le passage par un allotétraploïde bispécifique intermédiaire pour produire un hybride trispécifique ;
- la méthode pseudophyllétique qui utilise la synthèse d'un allohexaploïde bispécifique transitoire pour aboutir à l'obtention d'un hybride allohexaploïde trispécifique;
- la création d'un hybride trispécifique à partir de deux hybrides bispécifiques.

Ces voies exploitent des espèces diploïdes pour la création d'hybrides doubles et triples (Stewart, 1995 ; Ahoton, 2002 ; Mergeai 2006).

2.5 Déterminisme génétique de la formation des glandes à gossypol chez le cotonnier cultivé

La présence de glandes à gossypol chez le cotonnier (*Gossypium* sp.) est contrôlée par au moins six loci indépendants désignés par gl_1 , gl_2 , gl_3 , gl_4 , gl_5 et gl_6 (Pauly 1979). Parmi ceux-ci, les loci gl_2 et gl_3 sont les plus importants et les seuls qui contrôlent de manière significative le caractère glandulère dans l'amande de la graine. Chez les cotonniers allotétraploïdes, la combinaison des allèles dominants GL_2 et GL_3 se traduit par la présence de glandes à gossypol dans tous les organes de la plante et l'allèle GL_2 influence environ deux fois plus que l'allèle GL_3 la formation des glandes dans l'amande de la graine (Lee 1962, Pauly 1979). Le phénotype « *glandless* », c'est-à-dire des plantes totalement dépourvues de glandes, à la fois au niveau de leurs organes aériens et de leurs graines, se retrouve chez des plantes qui sont soit homozygotes récessives pour GL_2 et GL_3 ($gl_2gl_2gl_3gl_3$) (Lee et al. 1968), soit porteuses de l'allèle dominant GL_2^e au locus GL_2 (Kohel et Lee 1984). Cet allèle est issu d'une mutation observée chez une plante de l'espèce tétraploïde *G. barbadense*. Le dosage des allèles dominants et récessifs au niveau des locis GL_2 et GL_3 se traduit par des teneurs en gossypol d'autant plus élevées que le nombre d'allèles dominants est important (Pauly, 1979).

2.6 Création et exploitation des hybrides présentant un retard à la morphogénèse du gossypol dans les graines de cotonnier

2.6.1 Réservoirs génétiques utilisables pour une inhibition de la synthèse du gossypol

Les cotonniers australiens sont les seuls à présenter le caractère « *glandless-seed and glanded plant* » ou « morphogénèse retardée des glandes à gossypol dans la graine ». Le tableau 2 répertorie les espèces diploïdes du génome C et celles du génome G constitutifs de ce réservoir.

Tableau 2: Répertoire des espèces diploïdes australiennes

Sous-genre	Génome	Différenciation génomique	Espèces
<i>Sturtia</i>	C	C1	<i>G. sturtianum</i> Willis
		C2	<i>G. robersonii</i> F Muell
		C2	<i>G. nandewarensis</i> Derera
<i>Hibiscoidea</i> Tod	G	G1	<i>G. bickii</i> Prokhanov
		G2	<i>G. australe</i> F. Muell
		G3	<i>G. nelsonii</i> Fryxell

2.6.2 Bilan des recherches sur le cotonnier présentant le caractère « *glandless-seed and glanded plant* ».

Les tentatives d'introgression du caractère inhibition de la synthèse des glandes à gossypol de la graine de cotonnier chez la principale espèce cultivée *G. hirsutum* ont été réalisées avec *G. sturtianum* (génome C), *G. bickii* (génome G₁) et *G. australe* (génome G₂) (Muramoto 1969; Dilday 1986; Koto 1989 ; Shuijin et Biling 1993 ; Mergeai *et al.* 1997, Vroh Bi *et al.* 1998 ; Zhu *et al.* 2005, Benbouza *et al.* 2009).

L'efficacité des méthodes classiques de croisement interspécifique utilisées se heurte à la longueur des cycles de croisement et à la fixation fréquente de gènes non désirés (Cai *et al.* 2010). Néanmoins, l'exploitation des méthodes d'hybridation bi et tri-spécifique ont permis de réaliser de grandes avancées sur la sélection du caractère « *glandless-seed and glanded-plant* ». Depuis Muramoto, (1969), qui a été le premier à obtenir un hybride hexaploïde (*G. hirsutum* x *G. sturtianum*) exprimant ce caractère, beaucoup d'hybrides interspécifiques ont été obtenus avec les espèces sauvages australiennes. L'hexaploïde produit par Muramoto (1969) constitue le point de départ d'une longue série de recherches basées sur la réalisation de rétrocroisement de ce dernier avec *G. hirsutum*. En 1986, Dilday a identifié un hexaploïde fertile (2n = 78) produisant des graines totalement « *glandless* » à partir de ceux produit par

Muramoto alors que ces derniers présentaient toujours une très faible densité de glandes au niveau des graines. Les pentaploïdes obtenus après rétrocroisement de cet hexaploïde présentaient une réduction de la teneur en gossypol dans la graine mais étaient stériles. Altman, (1987), après avoir surmonté les barrières de fertilité existant au stade pentaploïde en utilisant les techniques de sauvetage d'embryons par culture *in vitro*, a trouvé en 1988 que le caractère « *glandless-seed* » ne se manifestait pas dans la descendance des graines BC4. De plus, le caractère ne se retrouve chez aucune des treize Lignées Monosomique d'Addition (LMA) obtenues en croisant *G. hirsutum* et une espèce australienne (Koto 1989; Rooney et Stelly 1991; Ahoton *et al.* 2003, Sarr et Mergeai, 2009 ; Chen *et al.* 2014). En 1991, Rooney et Stelly ont criblé quatre LMA ($2n=53$) de *G. sturtianum* dans *G. hirsutum* mais aucune d'entre elles ne produisait des graines « *glandless* ». Ils en ont conclu qu'il sera difficile d'obtenir une lignée pure du cotonnier cultivé avec le caractère recherché.

Deux autres équipes se sont particulièrement distinguées en suivant la voie de l'exploitation d'hybrides trispécifiques en vue d'introgesser le caractère « *glandless-seed and glanded-plant* ». L'équipe de Mergeai à Gembloux Agro Bio-Tech, dont le matériel fait l'objet de cette thèse, a utilisé l'espèce *G. sturtianum* comme donneuse du caractère pour obtenir l'hybride trispécifique HRS [$(G. hirsutum \times G. raimondii)^2 \times G. sturtianum$] (Mergeai *et al.* 1997, Vroh Bi *et al.* 1999, Benbouza *et al.* 2009). La seconde équipe est celle de Zhu à "Zhejiang University" en Chine qui a utilisé l'espèce *G. bickii* comme donneuse du caractère pour obtenir l'hybride trispécifique ABH [$(G. arboreum \times G. bickii)^2 \times G. hirsutum$] (Zhu *et al.* 2005) en croisant l'amphidiploïde ($G. arboreum \times G. bickii$)² comme parent femelle avec le cotonnier cultivé (Zhu *et al.* 2004).

Le travail réalisé à partir de l'hybride ABH est intéressant car l'équipe de Zhu *et al.* (2005) a réussi à obtenir une variété qui exprime le caractère recherché avec une espèce du génome G. Ceci, malgré que l'hybride tri-spécifique qu'ils avaient créé ne présentait pas la structure la plus favorable pour obtenir des recombinaisons avec le parent donneur du caractère. En effet, dans un tel hybride, les chromosomes de l'espèce *G. arboreum* qui appartiennent au génome A vont s'apparier prioritairement avec ceux du sous-génome Ah de *G. hirsutum*. Dans l'hybride ABH, les chromosomes du *G. bickii* devraient donc théoriquement, faute d'alternative, s'apparier avec ceux du sous-génome Dh mais la distance génétique entre ces deux espèces est très importante (Endrizzi *et al.* 1985) et les possibilités de recombinaison particulièrement réduites.

Afin d'analyser l'héritabilité de l'inhibition de la formation de glandes à gossypol dans l'amande des graines de cotonnier, Zhu et son équipe ont analysé treize (13) hybrides interspécifiques (Zhu *et al.* 2001). Six d'entre eux ont été obtenus en croisant entre elles cinq (5) espèces australiennes diploïdes (*G. sturtianum*, *G. nandewarensis*, *G. australe*, *G. nelsinii* et *G. bickii*). Quatre autres étaient des hybrides F1 triploïdes provenant du croisement de variétés de *G. hirsutum* respectivement de génotypes $GL_2GL_2GL_3GL_3$, $gl_2gl_2gl_3gl_3$, $GL_2GL_2gl_3gl_3$ ou $gl_2gl_2GL_3GL_3$ avec l'espèce australienne *G. sturtianum*. Deux autres étaient des hybrides F1 bispécifiques diploïdes obtenus en croisant *G. arboreum* par *G. bickii* et *G. davidsonii* par *G. australe*. Le dernier hybride étudié était l'allotétraploïde (*G. arboreum* x *G. bickii*)². Les observations réalisées sur ces hybrides ont permis de mettre en évidence que (i) la transmission du caractère « *glandless-seed and glanded-plant* » se fait de la même manière chez les cinq espèces australiennes et que le ou les gènes responsables du caractère sont probablement localisé(s) au(x) même(s) endroit(s), (ii) le caractère « *glandless-seed* » des espèces australiennes est dominant chez l'hybride bispécifique créé avec *G. arboreum* (génomme A) mais est récessif chez l'hybride bispécifique obtenu avec *G. davidsonii* (génomme D), ce qu'avait déjà mis en évidence Mergeai (1992b), (iii) le caractère « *glandless-seed* » apporté par *G. sturtianum* est récessif ou dominant incomplet chez les hybrides interspécifiques produits en utilisant *G. hirsutum*. Il est dominant ou dominant épistatique quand on emploie un cotonnier « *glandless* » $gl_2gl_2gl_3gl_3$ ou de type $GL_2GL_2gl_3gl_3$, alors qu'il est récessif épistatique quand on utilise un cotonnier $gl_2gl_2GL_3GL_3$. Ainsi, dans le but de produire un germplasma avec le caractère « *glandless-seed and glanded plant* », Zhu *et al.* (2001) conclurent qu'il valait mieux utiliser un cotonnier cultivé $GL_2GL_2gl_3gl_3$ dans un programme d'hybridation interspécifique. Cette stratégie a abouti à une variété relativement stable nommée ABH-0318, qui exprime le caractère. Ce matériel présente cependant encore des défauts d'appariement chromosomique, ce qui signifie qu'il existe toujours à son niveau des incompatibilités interspécifiques à lever (Zhu *et al.* 2004).

A Gembloux, le programme d'amélioration basé sur la création d'hybrides trispécifiques incluant *G. sturtianum* a débuté en 1990 (Mergeai 1992b, Mergeai *et al.* 1997, Vroh bi *et al.* 1998). Utilisant comme espèce donneuse *G. sturtianum*, Vroh Bi *et al.* (1999) développent deux (2) hybrides trispécifiques en utilisant comme espèces-ponts *G. raimondii* Ulb. ($2n = 2x = 26$, génome D₅) et *G. thurberi* Tor. ($2n = 2x = 26$, génome D₁). Les deux hybrides trispécifiques ont été obtenus respectivement avec les variétés C2 et NC8 de *G. hirsutum*.

L'observation des graines trispécifiques met en évidence l'expression du mécanisme répresseur de la formation des glandes à gossypol de *G. sturtianum* chez seulement une faible proportion d'entre-elles. Plusieurs graines provenant du rétrocroisement des hybrides trispécifiques sont totalement dépourvues de glandes à gossypol : 6 sur 41 (Mergeai *et al.* 1997). Les observations cytogénétiques réalisées sur les hybrides trispécifiques et leurs descendances introgressées ont confirmé le bien-fondé de la stratégie d'introgression trispécifique. Toutes ces structures étaient euploïdes ($2n = 4x = 52$) et montraient des fréquences élevées de bivalents, de multivalents et de chiasmata en métaphase 1, indices d'importants échanges de matériel génétique (Vroh Bi *et al.* 1998).

Les rétrocroisements avec le cotonnier cultivé de l'hybride HRS [$(G. hirsutum \times G. raimondii)^2 \times G. sturtianum$] ont abouti à l'obtention de BC1, BC2, BC3, BC2S1, BC2S2, BC2S3, BC2S4, BC2S5, BC3S2 (Vroh Bi *et al.* 1999, Benbouza, 2004).

Le suivi de l'introgression de fragments de chromosome de *G. sturtianum* chez ce matériel au moyen de marqueurs microsatellites cartographiés a mis en évidence la conservation chez les générations les plus avancées de 10 allèles spécifiques de l'espèce donneuse, sur les 146 SSRs spécifiques de *G. sturtianum* utilisés dans ce screening (Benbouza, 2004). Ces allèles sont situés sur les groupes de liaison (c2-c14, c3-c17 et c6-c25) et ont été identifiés comme étant associés à l'expression de l'inhibition de la synthèse du gossypol uniquement dans la graine (Benbouza, 2004). Mais, la majorité des segments d'ADN introgressés au niveau de ces groupes, sont toujours hétérozygotes. De plus, le caractère « inhibition de la synthèse du gossypol dans la graine » hérité de *G. sturtianum* s'exprime toujours partiellement ou totalement chez une partie de la descendance de l'hybride HRS (Benbouza *et al.* 2009). Ceci malgré la présence des allèles dominants GL_2 et GL_3 provenant de *G. hirsutum*, qui contribuent majoritairement à la formation de glandes à gossypol au niveau de la graine (McMicheal, 1960 ; Lee, 1981 et 1982). L'observation des symptômes de nécroses et/ou la non-germination des graines présentant une densité de glandes variables, indiquerait la présence de facteur (s) de létalité. Ces facteurs ne sont apparemment pas seulement liés au caractère « *glandless-seed* », puisque les mêmes symptômes ont été observés par Benbouza (2004) sur des graines dont les embryons montraient une forte densité de glandes à gossypol.

Les mêmes observations morphologiques ont été faites durant l'introgression à partir de *G. bickii* (Zhu *et al.* 2004). Par ailleurs, chez *G. hirsutum*, les deux gènes majeurs responsables du caractère glandulaire sont liés aux *loci* Le_1 et Le_2 responsables de la létalité hybride (Lee,

1982). Il est connu que des générations d'autofécondations successives augmentent les possibilités de crossing-over, et il devrait donc être possible de briser les liaisons défavorables avec les facteurs de létalité en multipliant les générations d'autofécondation (De Vienne, 1998).

3. LES OUTILS UTILISES POUR ANALYSER LA DESCENDANCE DE L'HYBRIDE HRS

Plusieurs outils ont été utilisés pour étudier les descendance de l'hybride HRS étudiées. Il s'agit essentiellement (i) de l'analyse phénotypique des plantes obtenues à partir de l'hybride HRS (ii) des marqueurs moléculaires (iii) de la cartographie génétique (iv) et la cytogénétique classique et moléculaire.

3.1 Analyse phénotypique

Le cotonnier est une plante vivace qui doit s'adapter aux conditions d'une culture annuelle. C'est un arbrisseau dont les phases végétative et générative se succèdent par étage.

Les différentes espèces cultivées du genre *Gossypium* présentent un polymorphisme phénotypique très prononcé. Ce polymorphisme peut se rencontrer au sein d'une même espèce sous l'influence d'un ou de plusieurs facteurs environnementaux.

Les résultats des observations phénotypiques réalisées dans le cadre de la thèse ont été comparés aux caractères morphologiques et phénologiques rencontrés chez les variétés cultivées de *G. hirsutum*.

3.1.1 Morphologie des cotonniers cultivés

Le cotonnier est un arbrisseau pouvant atteindre le plus souvent 1 à 1,5 m de haut (Sément, 1986). Il comprend une racine pivotante de longueur variable selon les sols, généralement de 0,60 m, mais elle peut atteindre 1,2 à 3 m avec des ramifications latérales (Demol, 1992). Selon les cultivars sélectionnés, le port de la plante change, mais en général il peut être rapporté à un modèle, le port dit pyramidal. La partie aérienne est composée d'une tige principale érigée, sur laquelle se développent, articulées en spirale, des branches latérales qui prennent naissance aux nœuds de cette dernière. Les branches monopodiales ou végétatives ne portent pas de fleurs, leur croissance est continue, alors que les branches sympodiales ou fructifères, à croissance discontinue sont situées sur les branches végétatives et portent directement les fleurs puis les capsules (Demol, 1992).

Les feuilles, palmatilobées chez le cotonnier adulte, se développent sur les nœuds de la tige et des branches. Sur sa face ventrale au niveau des nervures principales, elles portent des glandes externes dites nectarifères qui secrètent un suc attirant les insectes. A l'aisselle de la feuille, il existe deux bourgeons axillaires, dont l'un se développe en une branche, l'autre restant en réserve au cas où le premier avorterait. On rencontre également des cas où les deux

bourgeons se développent. Les branches, sans qu'une règle connue puisse le prédéterminer, sont soit végétatives, soit fructifères. Les fleurs fécondées chez *G. hirsutum*, virent au rouge vineux dans les 24h qui suivent leur éclosion avant de se faner, la corolle tombera alors laissant un jeune fruit à l'abri des bractées.

Le fruit du cotonnier est une capsule à déhiscence intercarpellaire à maturité (Kébé, 1999), comprenant un péricarpe constituant la paroi de l'ovaire. A l'intérieur de l'ovaire supère constitué de 3 à 5 carpelles ou loges, se développent 6 à 12 graines par loge sur lesquelles croissent les fibres.

3.1.2 Phénologie

Le développement du cotonnier peut se diviser de manière classique en deux états : l'état végétatif et l'état reproducteur. Ces deux états se subdivisent en cinq phénophases que sont : phase levée, plantule, préfloraison, floraison et enfin maturation.

Le cotonnier a un cycle d'une durée assez variable qui dépend des cultivars et des conditions pédoclimatiques (Parry, 1982). Il faut en moyenne 175 jours au cotonnier pour boucler son cycle complet du semis à la récolte (Parry, 1982 ; Demol, 1992).

3.1.2.1 L'état végétatif

C'est la période qui va du semis à l'initiation florale. Elle peut être scindée en trois phases : de la germination à la levée, de la formation des organes végétatifs à la phase plantule, enfin la phase de préfloraison :

- la phase de la levée : elle va du semis à l'étalement des cotylédons. Celle-ci survient environ 4 à 10 jours habituellement après semis, mais peut atteindre 30 jours en conditions défavorables ;
- la phase plantule : sa durée est de 20 à 25 jours, elle débute de l'étalement des cotylédons et va jusqu'à l'apparition de la 4^{ème} feuille.
- la phase de préfloraison : sa durée est de 30 jours en moyenne, elle va du stade 4^{ème} feuille jusqu'à l'ouverture de la première fleur (Sément, 1986). C'est une période assez critique, car une bonne floraison et une bonne fructification dépendent de la disponibilité en eau, en minéraux et de l'ensoleillement. Ce dernier est indispensable chez le cotonnier qui est une plante héliophile. Un manque au niveau de la

disponibilité d'un de ces éléments se traduit par la chute des bourgeons floraux et donc par un amoindrissement de la production (Parry, 1982 ; Demol, 1992).

3.1.2.2 L'état reproducteur

L'état reproducteur comprend deux phases : la floraison et la maturation.

- la phase de floraison débute en moyenne 60 jours après la levée et peut durer de 50 à 70 jours. La croissance végétative et la floraison coexistent avec la formation des capsules;
- la phase de maturation des capsules va durer de 50 à 80 jours, la maturation après déhiscence quant à elle durera entre 15 et 20 jours.

3.1.3 Quantification de la teneur en gossypol du matériel végétal

L'estimation de la teneur en gossypol du matériel végétal étudié a été faite selon la technique de quantification visuelle mise au point par Benbouza *et al.* (2002). Pour ce faire :

- les graines sélectionnées sont d'abord scarifiées légèrement afin de ne pas les abîmer. Cette opération qui consiste à enlever la coque à l'aide d'un scalpel, permet de découvrir une grande surface recouverte de glandes à gossypol au niveau de l'amande de la graine, afin de pouvoir les compter. Il faut noter que plus la surface de comptage est grande plus la quantification est correcte;
- les graines scarifiées sont ensuite photographiées au niveau de la section avec un binoculaire muni d'une caméra reliée à un ordinateur;
- A partir des images enregistrées, par le système d'archivage d'images LUCIA (Images Analysis Système – Nikon), on effectue un comptage du nombre de glandes à gossypol sur la section, suivie de l'évaluation de la surface de la section de chaque graine en mm². Ces données permettent ainsi, d'évaluer la teneur moyenne en gossypol qui s'obtient selon la formule de Benbouza (2004) : $\%G = b \times (N/S)$

b = constante dépend du génotype étudié (Tableau 3).

N = nombre total de glandes sur la section de la graine

S = surface de la section de la graine (mm²).

%G = pourcentage en gossypol

Tableau 3: Valeurs du coefficient « b » pour différents génotypes dans l'équation de calcul du pourcentage en gossypol des graines (Benbouza, 2004)

Génotypes parentaux	Equation de calcul du % G
<i>G. hirsutum</i>	0,18322 (N/S)
<i>G. raimondii</i>	0,24451 (N/S)
BC ₂ /0/01-S ₁ /09	0,12170 (N/S)
BC ₃ /01/01/09	0,17010 (N/S)

BC= backcross, S= selfing, les numéros au niveau du génotype désignent ceux des plantes dont le génotype est issu

3.2 Sélection assistée par l'emploi de marqueurs moléculaires

La sélection assistée par marqueurs moléculaires est basée sur la liaison de gènes d'intérêt agronomique à des marqueurs moléculaires. Elle vise à améliorer l'efficacité de la sélection par un gain de temps, un meilleur contrôle des recombinaisons et une plus grande précision dans la prédiction de la valeur génotypique d'individus candidats à la sélection (De Vienne, 1998).

3.2.1 Les marqueurs moléculaires

Les marqueurs moléculaires sont des fragments spécifiques d'ADN pouvant être identifiés au sein du génome. Ils peuvent, entre autre, servir de repères pour suivre la transmission d'un segment de chromosome d'une génération à l'autre.

Les marqueurs moléculaires ont ouvert de nouvelles perspectives dans deux domaines que sont l'identification génotypique et l'élaboration des cartes de liaisons génétiques.

L'utilisation en sélection de marqueurs moléculaires liés aux facteurs génétiques contrôlant l'expression de caractères d'intérêt agronomique a pour but de limiter les inconvénients de la sélection basée sur l'analyse exclusive du phénotype.

Tout l'apport du marquage moléculaire du génome nucléaire à la sélection est fondé sur la possibilité de disposer de marqueurs liés à des gènes impliqués dans la variation des caractères sélectionnés (De Vienne, 1998). Ainsi, la « sélection assistée par marqueurs » correspond à toute forme de sélection utilisant des marqueurs en vue de :

- diriger les recombinaisons pour accumuler dans un même génotype les gènes ou segments chromosomiques favorables ;

- lire, au moins partiellement, la valeur génotypique au travers du génotype aux différents *loci* marqueurs.

3.2.2 Les différents types de marqueurs en amélioration génétique

Un marqueur génétique ou *locus* marqueur est un caractère mendélien polymorphe qui renseigne sur le génotype de l'individu qui le porte et/ou sur le génotype des *loci* voisins (Santoni *et al.* 2000).

Le choix d'un marqueur dépend de plusieurs facteurs tels que les objectifs d'un programme de sélection, de la population dont on dispose, de la diversité génomique des espèces et du coût des analyses.

Un marqueur idéal doit être polymorphe, multiallélique, codominant, non épistatique ; ces deux derniers critères peuvent être respectivement définis comme l'absence d'interactions intra et inter *loci*. Il doit être aussi sélectivement neutre, insensible au milieu (le génotype peut être inféré à partir du phénotype quel que soit le milieu) (De Vienne, 1998).

Les différents marqueurs génétiques sont : les marqueurs morphologiques, les marqueurs biochimiques (isozymes), et les marqueurs moléculaires de l'ADN.

Les marqueurs moléculaires de l'ADN sont des séquences particulières d'ADN, spécifiquement repérables, codantes ou non et présentant du polymorphisme. Ils font partie aujourd'hui des plus utilisés en amélioration des plantes, car permettant la réalisation de cartes génétiques. On distingue les marqueurs basés sur l'hybridation moléculaire (la technique RFLP) et les marqueurs basés sur la PCR (l'ensemble des autres marqueurs : RAPD, AFLP, SSR, DAF, SNP etc.) (De Vienne, 1998 ; Santoni *et al.* 2000).

Chez le cotonnier, les marqueurs moléculaires ont permis de faire ressortir la diversité génétique, et de sélectionner les génotypes exprimant un caractère d'intérêt pour l'amélioration de la production au point de vue qualitatif et/ou quantitatif.

La technique RAPD (Random-Amplified Polymorphism DNA) a permis d'établir la diversité génétique existant dans une collection d'individus introgressés issus de croisements interspécifiques impliquant *G. hirsutum* et *G. barbadense* (Tatineni *et al.* 1996). C'est aussi cette même technique qui a permis de sélectionner les génotypes exprimant le plus le caractère inhibition de la synthèse de gossypol dans la graine dans la descendance de l'hybrides trispécifique HRS (Mergeai *et al.* 1998). La technique RFLP (Restriction Fragment

Length Polymorphism), en raison du nombre élevé de marqueurs et de bandes polymorphes qu'elle fournit par analyse a été souvent utilisée chez le cotonnier. Elle a aussi été utilisée pour la détection des QTLs liés à la qualité de la fibre (Paterson *et al.* 2003). Pour les AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), ils sont utilisés en raison de leur reproductibilité et du nombre élevé de marqueurs qu'ils génèrent (Zhu *et al.* 1998).

Ces marqueurs AFLP étant dominants, ils ne permettent pas de distinguer l'hétérozygotie de l'homozygotie, ce qui amoindrit leur utilité en cartographie. Cette limitation favorise l'utilisation des marqueurs microsatellites SSRs qui prend de l'ampleur dans la sélection chez le cotonnier. (Ulloa & Meredith, 2000).

3.2.3 Utilisation des microsatellites

Les microsatellites ou SSRs (Simple Sequence Repeats) sont constitués par la répétition en tandem de séquences nucléotidiques. Les motifs peuvent être mono-, di-, tri-, ou tétranucléotidiques. Les plus courants sont (A)_n, (TC)_n, (TAT)_n, (GATA)_n, n pouvant atteindre plusieurs dizaines. De tels motifs sont très abondants et très polymorphes dans le génome des eucaryotes.

La source de polymorphisme recherchée est la variation du nombre de répétitions du motif de base du microsatellite (De Vienne, 1998).

L'intérêt en génétique des microsatellites réside dans le fait qu'ils sont des marqueurs co-dominants et multialléliques.

Ils sont caractérisés par un taux de mutations élevé, une extrême variabilité du nombre de répétitions des motifs microsatellites, une répartition uniforme dans le génome, et leur transférabilité ou portabilité (Sarr, 2003b).

Toutefois, l'utilisation des microsatellites comporte des limites que sont :

- la lourdeur de l'étape de développement qui nécessite en général le séquençage de cinq clones positifs pour obtenir une paire d'amorces utilisable,
- l'homoplasie de taille est la conséquence des mutations chez les allèles microsatellites; il s'agit de trouver deux allèles identiques en ce qui concerne leurs poids moléculaire, mais qui ont en réalité des origines génétiques différentes.

Les microsatellites ont un rôle fonctionnel comme séquences codantes d'homopolymères d'acides aminés et un rôle d'éléments régulateurs comme promoteurs de la transcription pour

accroître l'expression des séquences codantes ou comme sites de fixation de facteurs de transcription (Kashi *et al.* 1997).

3.2.4 Les marqueurs moléculaires et la mise en évidence de QTL (Quantitative Trait Loci)

La plupart des caractères d'importance sont déterminés par l'action et l'interaction d'un grand nombre de gènes, dont il s'avère difficile d'isoler des gènes majeurs. Ces caractères quantitatifs sont contrôlés par des *loci* appelés QTL (Quantitative Trait Loci). La détection de QTL consiste à déterminer la position chromosomique des gènes contrôlant le caractère quantitatif ainsi que l'importance et le suivi de ses effets. Ainsi, pour une détection des QTL, il est nécessaire d'avoir (i) une descendance en ségrégation ; (ii) une carte génétique de bonne qualité ; (iii) une évaluation fiable du caractère. Leur cartographie (QTL) est fondée sur la recherche de déséquilibres de liaison entre *locus* marqueurs et *locus* contrôlant les caractères quantitatifs (De Vienne, 1998).

La combinaison de techniques de génétique quantitative et de marquage moléculaire permet la localisation et l'introgession de *loci* contrôlant la variation des caractères quantitatifs (QTL). Les marqueurs moléculaires permettent d'éviter les inconvénients de la sélection basée uniquement sur le phénotype. L'analyse simple marqueur est la méthode la plus simple et permet en l'absence de carte génétique, de localiser des QTL (Benbouza, 2004).

Dans la recherche de QTL responsables du caractère « inhibition de la synthèse de gossypol uniquement dans les graines » chez les descendants de HRS, l'analyse simple marqueur a permis la détection de six chromosomes (Tableau 4) liés significativement à l'expression du caractère (Benbouza, 2004). Quatre QTL avérés (BNL3590, BNL3971, BNL2443 et BNL3989) et deux autres QTLs potentiels (BNL226 et BNL3261) ont été identifiés, ils sont localisés sur les groupes de liaisons (c2, c3 et c12) de la carte génétique du coton.

Tableau 4: Les chromosomes liés à l'expression du caractère « *glandless-seed et glanded plant* »

Chromosomes	Locus marqueur	Niveaux de signification	R ² (%)
c2	BNL3590	****	13,7
	BNL3971	***	11,8
c3	BNL2443	***	10,4
	BNL226	***	8,1
	BNL3989	****	12,8
	CIR228	-	5,0
c6	BNL3353	-	6,7
c9	BNL3031	-	0,2
c12	BNL3261	***	8,9
c25	BNL3436	-	0,00
	BNL1153	-	0,76

Source (Benbouza, 2004). R²-pourcentage de la variation phénotypique expliqué, Seuils de signification : * $P < 0,1$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$.

3.3 Importance de la cytogenétique en hybridation interspécifique

3.3.1 Définition, principe et importance de la cytogénétique

La cytogénétique, permet la caractérisation d'un organisme (animal ou végétal) en donnant le caryotype. Elle est devenue incontournable en amélioration par hybridation interspécifique des plantes, de par son importance dans la classification taxonomique et phylétique entre les espèces. D'après Konan *et al.* (2009), elle a joué et continue de jouer un rôle très important dans les programmes d'amélioration des espèces cultivées de cotonnier.

La cytogénétique permet d'étudier les phénomènes génétiques au niveau d'une cellule en division, plus précisément au niveau des chromosomes. Elle montre la morphologie du matériel génétique, par la visualisation des chromosomes dont elle permet le dénombrement et l'identification (Jahier, 1992). En hybridation interspécifique, selon qu'on pratique la cytogénétique classique ou moléculaire, il est possible respectivement de mettre en évidence (i) l'appariement des chromosomes hétérologues et (ii) la présence ou pas des chromosomes entiers de l'espèce exotique dans le fond génétique du génotype cultivé. La cytogénétique moléculaire permet également de vérifier l'état recombiné d'un fragment de chromosome, ou l'apparition d'un chromosome en addition (Sarr et Mergeai, 2009).

3.3.2 La cytogénétique classique chez les plantes

3.3.2.1 Principe

Les observations du nombre de chromosomes et de l'appariement à la méiose sont réalisées sur des cellules-mères de pollen (CMP) après une simple coloration. L'appariement entre chromosomes dépend principalement de leur homologie.

La métaphase est le stade où les chromosomes sont plus faciles à observer parce qu'ils sont très contractés. En effet, à la métaphase de la mitose et à la métaphase I méiotique, les chromosomes sont sur-enroulés et peuvent être intensément colorés avec des produits comme le réactif de Schiff, le carmin acétique, le Giemsa ou l'orcéine acétique (Sarr et Mergeai, 2009). Cependant, la métaphase n'est pas le meilleur stade pour bien visualiser les appariements chromosomiques proprement dit, surtout quand les chromosomes en présence sont de petite taille. C'est au stade pachytène de la prophase, ou lors de la diacinèse qui sont des phases méiotiques antérieures à la métaphase que les chromosomes sont appariés sur toute leur longueur. Ici, le degré d'homologie entre deux chromosomes peut être étudié avec précision (Jahier 1992), bien que ces phases soient plus difficiles à observer (Mergeai, 1992).

3.3.2.2 La cytogénétique classique en hybridation interspécifique

Dans les programmes d'hybridation interspécifique, la cytogénétique classique a une grande importance parce qu'elle permet (i) la compréhension de l'affinité génomique dans le but d'optimiser le transfert de gènes exotiques portant des caractères d'intérêts au niveau des espèces cultivées, (ii) l'exploitation rationnelle des espèces par croisement intra ou interspécifique (iii) l'exploitation et la résolution des problèmes rencontrés par les sélectionneurs comme l'instabilité ou la stérilité.

Chez le cotonnier, la cytogénétique classique a révélé l'importance d'utiliser un diploïde appartenant au génome D comme espèce pont dans les programmes d'hybridation trispécifique (Konan *et al.* 2009). En effet, comme les chromosomes appartenant au même génome s'apparient préférentiellement à la méiose, les recombinaisons sont très faibles pour les chromosomes avec une faible homologie. Ceci est bien illustré par la configuration des chromosomes en métaphase I des hybrides trispécifiques ABH [$(G. arboreum \times G. bickii)^2 \times G. hirsutum$, $A_n A_2 D_n G_1$] observée par Shuijing et Biling (1993), et des hybrides trispécifique HRS et HTS [$(G. hirsutum \times G. thurberi)^2 \times G. sturtianum$] observés par Vroh Bi (1999).

3.3.3 La cytogénétique moléculaire : l'hybridation *in situ* génomique (GISH)

La cytogénétique moléculaire consiste à utiliser l'ADN comme sonde, pour mettre en évidence un simple fragment ou un chromosome entier.

3.3.3.1 Principe

Le principe est basé sur la possibilité de rendre simple-brin les molécules d'ADN cibles et de les hybrider, suivant la loi de complémentarité des bases, avec une sonde moléculaire (Sarr et Mergeai 2009). Cette sonde qui sera intégrée dans le génome du matériel à analyser va se fixer sur son homologue, et l'ensemble pourra être visualisé au microscope. L'hybridation *in situ* présente de nombreuses variantes selon le système de détection et le type de sonde utilisée. On distingue l'hybridation *in situ* isotopique qui utilise des sondes radioactives et l'hybridation *in situ* à fluorescence (FISH) qui utilise des sondes marquées avec des haptènes telles que la biotine ou la digoxygénine (Ahoton, 2002). En fonction du type de sonde, on distingue l'hybridation génomique *in situ* (GISH) où la sonde est constituée de l'ADN total d'un parent de l'hybride et les techniques qui utilisent les séquences d'ADN répétées.

La GISH consiste à prendre comme sonde l'ADN génomique total marqué d'une des espèces (généralement l'espèce exotique) mélangé en excès avec de l'ADN marqué différemment ou non marqué de l'espèce du fond génétique (ADN compétiteur). A la suite du marquage, les sondes doivent être digérées de sorte que la taille des fragments se situe entre 600 et 200 pb et hybridées sur la coupe histologique. Ainsi, seul les gros fragments de chromosome et les chromosomes entiers peuvent être visibles. Les deux types d'ADN vont alors s'hybrider avec leur séquences complémentaires communes (Ahoton, 2002 ; Sarr et Mergeai, 2009)).

3.3.3.2 L'hybridation *in situ* génomique (GISH) en hybridation interspécifique

La cytogénétique moléculaire permet de voir le caryotype et d'identifier les chromosomes ou fragments de chromosomes étrangers. Elle offre plus de précision comparée à la cytogénétique classique. En effet, l'ADN subit une coloration différentielle ce qui permet de détecter les remaniements chromosomiques. La GISH apporte des informations précises sur les relations homéologiques entre chromosomes et sur les remaniements des gros fragments. Elle permet de repérer ou de rechercher une molécule d'ADN spécifique dans une population hétérogène et de répondre à la question de la présence ou de l'absence d'un génome particulier, par exemple chez une lignée d'addition ou une lignée recombinée (Tagu, 1999).

La GISH présente beaucoup d'avantages, selon Schwarzacher et al., 1992 cité par Sarr et Mergeai (2009): (i) il n'est pas nécessaire de semer les graines ni d'extraire l'ADN car le criblage peut se faire sur les cellules de graines pré-germées ; (ii) si les deux espèces sont très éloignées, il n'est pas nécessaire d'ajouter de l'ADN compétiteur ; (iii) dans le cas des lignées d'addition, il n'est pas nécessaire de connaître l'espèce du chromosome en addition pour la détecter, il suffit juste de marquer l'ADN de l'espèce du fond génétique (ADN compétiteur). Ainsi, d'après Sarr et Mergeai (2009), ce sera le chromosome en addition qui prendra la couleur de la contre-coloration. Même si la GISH sert surtout à établir la formule caryologique des plantes, elle peut, combinée à des analyses avec des marqueurs moléculaires, permettre d'identifier les chromosomes étrangers. Utilisant les deux techniques, Ahoton (2002) a pu identifier des chromosomes de *Gossypium australe* dans un fond de *Gossypium hirsutum*.

Cependant, la GISH présente le grand inconvénient d'être assez lourde à mettre en œuvre surtout lorsqu'il s'agit d'observer des chromosomes aux stades précoces de la méiose (Jahier 1992 ; Haider Ali et al. 2001). Elle est aussi, d'après, Sarr et Mergeai (2009), limitée par le degré de parenté entre l'espèce receveuse et l'espèce donneuse ; un lien de parenté trop étroit entre les deux espèces empêche une différenciation des deux types de chromatine.

4. DISTORSIONS DE SÉGRÉGATION ET AMÉLIORATION GÉNÉTIQUE DES PLANTES

Le chapitre 4 a fait l'objet d'une publication.

Diouf F.B.H., Mergeai G., 2012. Distorsions de ségrégation et amélioration génétique des plantes (synthèse bibliographique). *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, **16** (4), 499-508.

Résumé

La distorsion de ségrégation des allèles est un phénomène commun à tous les êtres vivants. Décrite comme une grande force de l'évolution, elle est causée par divers facteurs génétiques ou physiologiques, influencés par l'environnement. Aléatoires ou non, les facteurs de distorsion de ségrégation ont des effets considérables sur l'amélioration des cultures et la cartographie de leur génome. L'analyse de nombreux résultats impliquant une distorsion de ségrégation d'allèles a permis la caractérisation partielle des causes et des effets de ce phénomène. Les résultats obtenus montrent que l'importance de la DS dépend du type de marqueurs moléculaires utilisés et de la nature des populations étudiées. Des recherches complémentaires sont nécessaires pour une meilleure identification des facteurs générateurs de distorsion de ségrégation et une plus précise évaluation de leurs effets. La réalisation de cartographies génétiques denses, associée à des analyses cytogénétiques, devraient permettre de rapide progrès.

Mots clé : distorsion de ségrégation, cartographie génétique, amélioration des plantes, marqueur moléculaire

4.1 Introduction

La distorsion de ségrégation (DS) est un phénomène commun aux animaux et aux végétaux (Taylor et Ingvarsson., 2003). Elle peut être définie comme une déviation significative des proportions des individus d'une classe génotypique donnée au sein d'une population ségréante (Xu *et al.* 1997 ; Castro *et al.* 2011). La DS va à l'encontre des lois fondamentales de la génétique mendélienne qui reposent sur la transmission prévisible des allèles d'un parent à ses descendants et sur la détermination des génotypes à partir des allèles transmis. La DS a été décrite pour la première fois chez le maïs par Mangelsdorf et Jones (1926). Elle a été par la suite observée chez presque toutes les grandes cultures ; le riz (Nakagahra, 1972), la tomate (Paterson *et al.* 1988), l'orge (Graner *et al.* 1991), le blé tendre (Endo, 1990), le cotonnier (Rooney et Stelly, 1991) le sorgho (Pereira *et al.* 1994), la luzerne (Echt *et al.* 1994), les agrumes (Luro *et al.* 1995), le café (Ky *et al.* 2000), le pois chiche (Castro *et al.* 2011). L'intérêt suscité par la découverte du phénomène s'est accentué avec le développement des marqueurs moléculaires. Ces derniers ont permis des études plus précises et plus approfondies de la génétique des plantes supérieures, ainsi que la mise en évidence d'un nombre toujours plus important de DS (Lorieux *et al.* 1995 a, b ; Liu *et al.* 2010).

Face au besoin toujours croissant de créer de nouvelles variétés capables de répondre à des besoins spécifiques, d'importants progrès ont été réalisés par l'exploitation de la variabilité génétique qu'offrent les espèces sauvages en caractères d'intérêt agronomique. Cependant, lors du flux de gènes, un allèle peut être présent dans plus de la moitié des gamètes féconds, et peut devenir de plus en plus fréquent dans la population, même s'il a un effet délétère. Ce comportement dit de «gène égoïste», ou de «conflits génétiques», a été décrit par Crow et Dove (1988) et va entraîner une DS chez les êtres vivants. Les DS ont des origines diverses. Elles sont spécifiquement liées à l'espèce, au type de population, à la direction du croisement, au type de marqueur moléculaire et à l'environnement. (Xu *et al.* 1997 ; Lu *et al.* 2002 ; Song *et al.* 2006). D'après Lorieux *et al.* (1995 a, b), une DS peut être due soit à une : (i) sélection gamétique ; dans ce cas, la distorsion est la conséquence d'un déroulement anormal de la méiose. Les gamétophytes sont alors moins viables ou moins fertiles. (ii) sélection zygotique ; ici, ce sont les individus d'un groupe qui se révèlent être moins viables. La distorsion est dans ce cas généralement due à un remaniement structural chromosomique comme la translocation. Il paraît donc évident qu'il est d'une importance capitale de prendre en compte la question de la DS en amélioration des plantes ; dans les processus de sélection

au sein des descendances en ségrégation. Cependant, malgré son importance, l'impact de la DS sur l'amélioration des plantes est peu étudié. C'est ainsi que nous nous proposons de résumer sous forme de revue, les différents facteurs qui entraînent une distorsion de ségrégation et leurs effets en amélioration des plantes.

4.2 Intensité de la distorsion de ségrégation selon le type de population

La DS concerne tous les types de population. Néanmoins, les recherches effectuées chez le sorgho, la tomate, le chou, le maïs et le cotonnier, ont montré que les déviations observées sont accentuées si les espèces croisées sont très éloignées (Xu *et al.* 1997 ; Lu *et al.* 2002 ; Wu *et al.* 2007). Dans ce cas, la distorsion est généralement causée par des différences structurelles entre les chromosomes qui peuvent conduire à un large éventail d'anomalies cytogénétiques et à une ségrégation inégale (Rick et Smith, 1953). Durant le processus de sélection, selon le schéma adopté, les DS sont fortement observées chez les populations issues de lignées haploïdes doublées et de lignées recombinantes. Chez les populations d'haploïdes doublés, certains gènes létaux deviennent homozygotes et s'expriment avec un taux élevé de distorsion de ségrégation (Song *et al.* 2006). Lashermes *et al.* (2001) ont trouvé entre des populations haploïdes doublées et les populations provenant de test cross issues des mêmes clones de café, 40% de différence sur les pourcentages des marqueurs présentant une distorsion de ségrégation. Les mêmes résultats ont été obtenus par Song *et al.* (2005) comparant les cartes génétiques de backcross (BC1) et d'haploïdes doublées issus d'une population interspécifique de cotonnier issue du croisement *G. hirsutum* L x *G. barbadense* L. Les lignées recombinantes occupent aussi une bonne place parmi les populations sensibles à la distorsion de ségrégation. D'après Wang *et al.* (2004) cette aptitude à être facilement biaisée est généralement liée à l'environnement et à la pression de la sélection sur plusieurs générations d'autofécondation. En effet, Lu *et al.* (2002) ont trouvé une relation positive entre le nombre de méioses et la fréquence de détection des DS. Une fois les parents choisis, une descendance en ségrégation de plusieurs dizaines d'individus sera nécessaire pour obtenir un échantillon d'événements méiotiques suffisant pour estimer le plus précisément possible les taux de recombinaison. Enfin, de tous les types de populations, celles issues de backcross ont habituellement les pourcentages de distorsion les plus faibles (Lorieux *et al.* 1995 a, b ; Song *et al.* 2006).

Par ailleurs, chez les populations issues de croisements intraspécifiques, des distorsions de ségrégation avec peu d'impact sur l'appariement des chromosomes au cours de la méiose et

sur la fertilité ont été observées (Slocum *et al.* 1990). La cause pourrait être de petits réarrangements chromosomiques, des liaisons avec un allèle incompatible (Wricke et Wehling., 1985), ou une liaison avec un allèle létal au niveau des gamètes (Wagner *et al.* 1992).

4.3 Identification, direction et localisation des distorsions de ségrégation

L'avènement des marqueurs moléculaires a permis d'améliorer l'efficacité de la sélection par un gain de temps, un meilleur contrôle des recombinaisons et une meilleure précision dans la prédiction de la valeur génotypique des individus candidats à la sélection. Etant donné que les marqueurs moléculaires sont neutres vis-à-vis du phénotype, lorsqu'un marqueur moléculaire montre une distorsion de ségrégation, c'est qu'il est fortement lié à un allèle dont il ne fait que subir la déviation. Néanmoins, lorsqu'il y a distorsion de ségrégation, la déviation chez les marqueurs co-dominants est moins affectée que chez les marqueurs dominants (Lorieux *et al.* 1995 a, b). Ne sachant pas comment exploiter les marqueurs révélant une distorsion, ces derniers sont généralement placés sur les cartes génétiques comme s'ils étaient mendéliens, entraînant ainsi de fausses conclusions. Par ailleurs, ils sont parfois écartés de l'analyse pour éviter des inexactitudes dans les cartes génétiques, ce qui peut entraîner d'importantes pertes de données. Ainsi, la liaison entre un marqueur et un gène distorateur de ségrégation doit être prise en compte dans l'estimation des fréquences de recombinaison entre deux marqueurs. Il en va de même pour le type de marqueur qui d'après Lorieux et al. (1995 a, b) est significativement lié à l'importance de la distorsion de ségrégation observée. Ces auteurs ont en outre montré que l'estimation des fréquences de recombinaison entre marqueurs co-dominants est moins affectée par une distorsion de ségrégation que chez les marqueurs dominants. D'après Lu *et al.* (2002) et Song *et al.* (2006), les distorsions de ségrégation chez les plantes, peuvent entraîner une déviation orientée vers l'un des parents d'un croisement. Toutefois, le cas le plus décrit est l'observation d'un taux d'hétérozygotie plus élevé que le taux attendu (Song *et al.* 2005, 2006). La distorsion de ségrégation peut aussi être spécifique à des zones précises appelées régions de distorsion de ségrégation (RDS). En effet, certaines régions sont propices à la distorsion de ségrégation ; il s'agit de zones où de nombreuses distorsions de *loci* sont toujours étroitement regroupées chez une plante donnée (Xu *et al.* 1997 ; Lu *et al.* 2002). Dans ce cas, en fonction du facteur en cause, les marqueurs sont biaisés de la même façon et au niveau de la même RDS ciblée. Selon Xu et al. (1997), Lu et al. (2002), Song et al. (2006) et Castro et al. (2011), ces distorsions de ségrégation ciblées

dans des RDS sont d'habitude considérées comme étant liées à des *loci* de distorsion de ségrégation (LDS). Lorsque plusieurs populations montrent la présence du même LDS ou d'autres gènes inconnus susceptibles de causer la distorsion de ségrégation, elles présentent une distorsion de ségrégation dans la même région chromosomique (Lu *et al.* 2002, Castro *et al.* 2011). Des régions chromosomiques associées à des distorsions de ségrégation ont été ainsi identifiées chez le maïs, le riz et le pois chiche (Gardiner *et al.* 1993 ; Xu *et al.* 1997, Castro *et al.* 2011). De même, on trouve également chez le cotonnier, plusieurs régions à fortes distorsions de ségrégation (Han *et al.* 2004, Song *et al.* 2006, Yu *et al.* 2007, He *et al.* 2008).

4.4 Les facteurs de distorsion de ségrégation

Les distorsions de ségrégation sont causées par une multitude de facteurs génétiques et physiologiques qui peuvent survenir de manière ciblée ou aléatoire.

4.4.1 Les facteurs non aléatoires

Habituellement, un regroupement non aléatoire de marqueurs avec distorsions de ségrégation est dû à l'effet sélectif de *loci* de distorsion de ségrégation (LDS) (Xu *et al.* 1997 ; Lu *et al.* 2002 ; Song *et al.* 2006 ; Castro *et al.* 2011). Chez les plantes, la distorsion de ségrégation est souvent attribuée à la sélection gamétique, à la sélection zygotique ou à la combinaison des deux (Endo 1990 ; Xu *et al.* 1997, Blair *et al.* 2006). Ces deux types de sélection peuvent être contrôlés par des LDS qui agissent respectivement avant et après la fécondation. Les LDS qui agissent lors de la formation des gamètes ne peuvent changer qu'indirectement les ratios génotypiques des zygotes, en altérant les ratios des gamètes. Alors que les LDS qui s'expriment après la fécondation affectent directement les ratios génotypiques du zygote (Lorieux *et al.* 1995 a,b ; Song *et al.* 2006). Les LDS peuvent agir sur : (i) la létalité ou l'avortement du pollen (Rick ,1966) ; (ii) les tubes polliniques avec une inégalité des chances dans la capacité de pollinisation (Mangelsdorf et Jones, 1926) ; et (iii) la fécondation préférentielle (Endo, 1990). L'avortement et la compétition des tubes polliniques sont des exemples de sélection gamétique qui sont très souvent observés lorsqu'il y a distorsion de ségrégation. La DS peut survenir aussi bien au niveau des gamètes femelles, que des gamètes mâles (Endo, 1990 ; Xu *et al.* 1997 ; Lu *et al.* 2002 ; Castro *et al.* 2011). Néanmoins, en présence d'un facteur de distorsion de ségrégation, les gamétophytes mâles sont généralement plus sensibles (Endo, 1990 ; Xu *et al.* 1997 ; Lu *et al.* 2002 ; Song *et al.* 2006). Cependant, on peut citer certains LDS qui agissent simultanément sur le micro et le macrogamétophyte

comme chez les gamètes Ga éliminateurs de gènes chez la tomate (Rick, 1966). En réalité ce sont les allèles ou gènes de distorsion de ségrégation qui sont situés sur les LDS. Ces gènes représentent généralement des allèles dominants nommés gènes «gamétocides» symbolisés par (Ga) (Nakagahra, 1972 ; Endo, 1990 ; Rooney et Stelly, 1991). Beaucoup de gènes gamétocides ont été identifiés et cartographiés. Ils sont corrélés à la sélection gamétique et donc à la distorsion de ségrégation détectée chez certaines populations ségréantes de riz et de tomate (Xu *et al.* 1997 ; Rick, 1966). Ces allèles dominants au niveau d'un seul *locus* mendélien confèrent un avantage sélectif marqué aux gamètes qui les contiennent créant ainsi des RDS (Xu *et al.* 1997 ; Lu *et al.* 2002 ; Castro *et al.* 2011). En cas d'introduction d'un gène provoquant une distorsion de ségrégation dans une population, les marqueurs à proximité auront tendance à présenter les mêmes distorsions. C'est notamment le cas chez le maïs, comme relaté par Song *et al.* (2006), où 14 RDS ont été détectées, dont quatre sont localisées sur les régions où la sélection gamétique a été signalée. De plus, les résultats obtenus chez le riz avec 13 gènes gamétocides identifiés et cartographiés laissent croire qu'une distorsion de ségrégation à un *locus* spécifique marqué est principalement due à une liaison de ce marqueur à un gène gamétocide situé à proximité de ce dernier sur le même chromosome (Iwata *et al.* 1964 ; Cheng *et al.* 1996).

4.4.2 Les facteurs aléatoires

Les gènes de létalité, les mutations génétiques, les instabilités chromosomiques et l'hétérozygotie structurelle peuvent entraîner des distorsions de ségrégation. Ces facteurs provoquent de manière aléatoire sur le chromosome des distorsions de ségrégation des marqueurs spécifiques qui leurs sont associés.

4.4.2.1 Les gènes de létalité

Un allèle léthal est une forme mutante d'un gène, qui entraîne la mort de l'individu à l'état homozygote s'il est récessif ou hétérozygote s'il est dominant. Dans le cas d'un allèle léthal dominant, il est automatiquement éliminé parce que les individus qui le portent ne survivent pas. Les LDS peuvent aussi être parfois liés à des allèles létaux récessifs. Toutefois, l'association des allèles létaux avec les systèmes distorceurs devrait être sélectivement favorisée, mais seulement quand ils permettent l'élimination précoce de la composante reproductrice déjà stérile à l'état homozygote (Lyttle, 1991).

4.4.2 Les mutations et les instabilités chromosomiques

Déterminées par des facteurs non contrôlés, les mutations se produisent inévitablement dans le cycle naturel de la vie (Robert, 1983). Les mutations peuvent être la conséquence de différences structurelles des chromosomes comme chez les hybrides interspécifiques (Luro *et al.* 1995). En outre, certains gènes gamétocides induisent aussi des mutations chromosomiques sur les gamétophytes ou les zygotes comme observées chez le blé tendre (Endo, 1990). Elles sont sources d'instabilités chromosomiques qui peuvent entraîner des distorsions de ségrégation au niveau des groupes de liaison (Song *et al.* 2006). Cette instabilité se traduit par de multiples types de cassures de la chromatine, des chromosomes et d'autres remaniements des noyaux des cellules (Endo, 1990 ; Livingstone *et al.* 1999 ; Rong *et al.* 2004). Elle conduit chez les espèces cultivées à l'apparition d'aneuploïdes, de polyploïdes (duplication complète du génome), de duplications géniques, de translocations et d'inversions. D'après Lagercrantz (1998) elles constituent le facteur majeur du réarrangement extensif du génome chez *Brassica nigra*. (L).

4.4.2.3 L'hétérozygotie structurelle

L'hétérozygotie structurelle est une diversité structurelle du génome, qui se traduit par la présence de chromosomes entiers ou de fragments de chromosomes structurellement différents dans un génome. Très peu documentée, l'hétérozygotie structurelle peut accentuer l'effet d'un *locus* soumis à sélection par de grands fragments chromosomiques étrangers, voire à un ou plusieurs chromosomes entiers. C'est un problème majeur dans le cadre de l'introgession de caractères d'intérêt d'espèces dites sauvages vers une espèce cultivée. Dans ce cas, seule la comparaison avec une carte ne comportant pas de distorsion de ségrégation pourrait confirmer les liaisons déterminées. Luro *et al.* (1995) ont montré que, chez le mandarinier, la contre sélection de chromosomes entiers pourrait provenir des conséquences d'une hétérozygotie structurelle et d'une sélection gamétique favorable à un ou plusieurs allèles.

4.4.3 Facteurs favorisant la distorsion de ségrégation

Habituellement, presque tous les facteurs qui provoquent une distorsion de ségrégation sont la conséquence d'une dérive génétique et/ou des conditions de l'environnement.

4.4.3.1 La dérive génétique

Les distorsions de ségrégation sont des éléments génétiques qui exposent un phénomène de « dérive » ou « biais » méiotique (Crow et Dove, 1988). D'importantes études théoriques ont conduit à des prédictions précises sur l'évolution des *loci* distorceurs de ségrégation, leurs *loci* cibles, les forces des agents modificateurs de la dérive méiotique, ainsi que les modalités des liaisons entre ces divers éléments. En effet, lors de la gamétogenèse, le gamétophyte est le siège de la multiplication et de la formation des cellules reproductrices au cours desquelles surviennent beaucoup de conflits génétiques. Tout se passe au niveau des centromères qui constituent d'importants sites de réarrangement chromosomique et qui jouent un rôle important lors de la méiose et de la mitose (Livingstone *et al.* 1999). Ainsi lors de la méiose dans une cellule hétérozygote, l'allèle qui a le pouvoir de biaiser la ségrégation sera sélectionné au fil des générations. Cependant, pour que la dérive génétique s'applique à tous, il doit y avoir des liens suffisamment étroits entre le distorceur de ségrégation et son *locus* cible pour permettre la génération de liens déséquilibrés (Lyttle, 1991).

4.4.3.2 Les conditions environnementales

Le type de sol, la température, les précipitations et/ou l'altitude peuvent causer des variations hétérogènes entre différents sites. L'interaction de ces éléments peut conditionner des avantages sélectifs et la pénétrance des facteurs génétiques (Wu *et al.* 2007). En effet, les facteurs environnementaux peuvent provoquer une variation dans les caractères quantitatifs. La diversité génétique peut ainsi résulter de la diversification des allèles et des gènes en interaction (épistasie) dont les expressions sont fortement influencées par l'environnement (Sano, 2005). Il faut noter que l'importance des flux de gènes est liée aux conditions environnementales, ce qui peut entraîner un changement rapide de l'architecture génétique des plantes, causant l'émergence de nouveautés telles que les DS. De ce fait, il est difficile de séparer les effets des facteurs génétiques (G) et des facteurs environnementaux (E) sur les DS qui sont un peu la conséquence de l'interaction des deux (Xu *et al.* 1997 ; Vancetovic, 2008). Xu *et al.* (1997) ont ainsi montré que sur plusieurs générations, certaines populations recombinantes issues d'une seule graine, représentent l'effet cumulatif des facteurs G x E qui devient plus prononcé avec la progression des autofécondations. D'autre part, l'environnement a un avantage sélectif sur les RDS (Xu *et al.* 1997). De ce fait, une forte héritabilité des distorsions de ségrégation sera détectée dans tous les types d'environnement (Xu *et al.* 1997). Par contre, une faible héritabilité des distorsions sera influencée par l'environnement et ne

sera donc détectée que si les conditions sont contrôlées. Sachant que la distorsion de ségrégation peut se produire à tous les stades de la gamétogenèse et/ou après celle-ci, ses effets ne seront détectés que chez les descendances (Xu *et al.* 1997).

Cependant, aussi nombreux que soient les facteurs de distorsion de ségrégation, il est important de savoir qu'une simple erreur de génotypage et de statistique durant l'analyse génétique des populations peut conduire à une distorsion (Lorieux *et al.* 1995 a,b).

4.5 Cartographie génétiques des *loci* avec distorsion de ségrégation

En cartographie, la stratégie consiste à : (i) déterminer les groupes de liaison, et (ii) ordonner les marqueurs au sein des groupes de liaison. Cependant, tous les algorithmes de cartographie actuellement développés sont construits sur l'hypothèse d'une ségrégation mendélienne des marqueurs (Lorieux *et al.* 1995 a,b). Cette méthodologie peut conduire à des erreurs en présence de DS, parce que dans une population les marqueurs liés à un LDS sont généralement biaisés. En effet, une étroite liaison entre un marqueur et un LDS, conduit à une grande valeur de χ^2 , mettant ainsi en évidence une DS (Song *et al.* 2006). Par conséquent, la localisation du LDS pourrait être de prime abord déterminée lorsque les valeurs du χ^2 sont tracées en fonction de la localisation du marqueur biaisé (Cheng *et al.* 1996). Dans ce cas, des régions chromosomiques de distorsion de ségrégation seront identifiées lorsque les LDS ségrégent dans plusieurs populations. C'est le cas du maïs chez qui, plusieurs RDS ont été observées en comparant la distribution des marqueurs biaisés dans quatre populations que sont : F₂ Syn, RIL, F_{6,7}, F₂ (Lu *et al.* 2002). Iwata *et al.* (1964) ont estimé les valeurs des fréquences de recombinaison et la différence de capacité de fécondation des gamètes mâles en utilisant des populations ségrégantes F₂ et F₃ dérivées de croisements entre un mutant et des lignées testeuses. Avec cette méthode, ils sont les premiers à décrire une liaison entre un facteur de létalité et deux marqueurs morphologiques, et ils ont pu identifier 12 gènes gamétocides chez le riz. Cheng *et al.* (1996) ont quant à eux développé une méthode pratique pour estimer la recombinaison entre le *locus* du facteur létal et les marqueurs voisins. Les données d'une F₂ ségrégante sont nécessaires pour estimer la relative viabilité ou la capacité de fécondation des gamètes ou encore la viabilité des zygotes affectés par le facteur de létalité dans une population (Castro *et al.* 2011). Les modèles de sélection (gamétique, et zygotique) du *locus* des facteurs de létalité peuvent aussi être déterminés. Avec cette méthode, Cheng *et al.* (1996), ont localisé avec succès au niveau du chromosome 11 du riz, le *locus* du facteur de létalité qui cause une sélection gamétique partielle chez les deux parents mâle et femelle. Ils

ont aussi indiqué que la chance de fécondation des gamètes mâles et femelles possédant le facteur létal est en moyenne de 41,5% par rapport à celle du gamète normal. Fu et Ritland, (1994) et Mitchell- Old (1995) ont aussi développé une stratégie pour estimer la recombinaison entre les gènes de viabilité et les marqueurs voisins de ceux-ci après plusieurs générations d'autofécondation. Toutes ces méthodes mentionnées ont en commun un *locus* de distorsion de ségrégation présent par chromosome. Cependant, lorsqu'il y a plusieurs *loci* de distorsion de ségrégation par chromosome, la valeur de la recombinaison et les effets génétiques estimés par ces méthodes deviennent inefficaces et biaisés (Lorieux *et al.* 1995 a,b). Pour surmonter cette difficulté, Song et al. (2006) rapportent l'utilisation de la méthode des multipoints pour estimer l'emplacement et les effets génétiques des LDS dans une population issue de backcross. D'après ces auteurs, il est possible avec cette méthode d'analyser efficacement le nombre, les positions et les effets des LDS chez les organismes qu'on peut facilement autoféconder et pour lesquels une carte avec des marqueurs à grande résolution a déjà été développée. On peut même envisager, avec quelques changements, d'étendre ces analyses à d'autres types de populations.

4.6 Implication de la distorsion de ségrégation en amélioration des plantes

Les nombreux mécanismes induisant la distorsion de ségrégation ont généralement des effets délétères sur la fertilité, la croissance, la viabilité et le phénotype. Ces effets ne sont que le reflet des perturbations intrinsèques à la plante. Etant donné l'importance de la cartographie des caractères quantitatifs (QTL) en amélioration des cultures, l'influence des distorsions de ségrégation sur l'analyse des QTL doit être négligeable pour une bonne interprétation des cartes (cartographie des distances et ordre des marqueurs). Si la fréquence de recombinaison ou l'ordre des marqueurs est déterminé de manière incorrecte, les hypothèses de base de l'analyse des QTL seront biaisées et les résultats ne seront pas précis. Ainsi, la sélection d'une méthode appropriée pour l'analyse de la cartographie génétique requiert beaucoup d'attention, d'autant plus que de nombreux résultats font état de fausses liaisons lorsqu'il y a distorsion de ségrégation (Lorieux *et al.* 1995 a,b ; Kalo *et al.* 2000, Liu *et al.* 2010). En effet, chez le caféier, une sélection en faveur des génotypes recombinants et /ou contre les génotypes parentaux a été observée. Elle résulte, d'après Lashermes et al. (2001), d'une surestimation des valeurs des fréquences de recombinaison. L'intensité de la distorsion joue aussi un rôle important. Ainsi, chez *Brassica napus* L, la réduction de l'estimation des fréquences de recombinaison entraîne de petites distorsions de ségrégation, mais qui sont quand même

significatives. Par ailleurs, les fortes distorsions orientées vers l'allèle du même parent favorisent la formation de fausses liaisons supplémentaires (Cloutier *et al.* 1997). Des résultats similaires ont été observés par Kalo *et al.* (2000) qui ont montré chez la luzerne (*Medicago sativa* L.) qu'une forte distorsion de ségrégation en faveur des individus hétérozygotes peut artificiellement lier des régions génétiques qui ne le sont pas en réalité.

Cependant, Liu *et al.* (2010) rapportent que les DS peuvent être ignorées si elles ne sont pas sévères et si leurs effets ne sont pas nécessairement préjudiciables pour les QTL, d'autant plus qu'elles peuvent influencer positivement ou négativement les résultats des analyses statistiques.

4.7 Comment surmonter les distorsions de ségrégation ?

4.7.1 En amélioration des cultures

L'introgession de caractères en provenance d'espèces sauvages vers les espèces cultivées est généralement difficile à cause des barrières d'incompatibilités interspécifiques. Malheureusement, les caractères d'intérêt ciblés sont également souvent accompagnés par des LDS avec des effets sévères sur le phénotype, le développement, la fertilité des plantes et la qualité des graines (Ahloowalia *et al.* 2004 ; Marais *et al.* 2010). Pour tenter de dissocier ces liaisons dites délétères, la mutagenèse et l'induction de recombinaisons sont souvent utilisées (Marais et Pretorius, 1996 ; Marais *et al.* 2010). Les techniques de mutagenèse physique comme l'irradiation aux rayons gamma sont souvent utilisées dans les programmes de sélection parce qu'elles permettent la rupture du lien entre un gène dit utile et un gène létal. Par contre, la mutagenèse chimique n'entraîne que des changements de paires de bases. Cependant, l'efficacité des traitements pour provoquer des mutations n'est pas sans conséquences. Comme des anomalies cytogénétiques peuvent avoir des effets sur le phénotypique, une augmentation des avortements des graines et la stérilité des plantes sont généralement observées (Sheidai *et al.* 2002 ; Koornneef, 2002 ; Diouf *et al.* 2010). Ces effets indésirables rendent peu efficace l'association hybridation interspécifique et mutagenèse, à cause de la probable multiplication des effets délétères. Ainsi, pour minimiser les perturbations du génome, l'induction de recombinaisons par de multiples croisements reste la méthode la plus utilisée chez les plantes pour surmonter les DS. La recombinaison a lieu entre le stade tétrade de la sporogénèse et la fin de la maturation gamétique. Des cassures peuvent survenir sur toute la longueur des chromosomes causant l'élimination des gamètes, la perte ou une distribution inégale des chromosomes durant les mitoses qui vont suivre (Endo, 1990,

2002). Cependant, il est à noter que certaines régions chromosomiques sont plus fragiles que d'autres. En effet, il peut arriver que les anomalies soient présentes sur les deux chromosomes homologues d'une paire, suggérant que certaines des aberrations soient induites après la fécondation (King et Laurie, 1993). Plusieurs rétrocroisements d'un hybride de blé, effectués par Marais et al. (2010) pour induire des crossing over ont montré qu'il est possible de séparer complètement le gène gamétocide du gène S13 responsable de la résistance à la rouille des feuilles. D'après Xu et al. (1997), l'utilisation des lignées isogéniques et du matériel pour le clonage des facteurs génétiques pourrait permettre une caractérisation plus approfondie de leur structure moléculaire et de leur fonction. En effet, de tels matériaux sont presque identiques aux espèces cultivées à part au niveau du caractère qui est recherché. Cette méthodologie aiderait à comprendre et à surmonter les mécanismes sous-jacents qui causent la distorsion de ségrégation dans différents fonds génétiques et types d'environnements. Cependant, malgré leur efficacité, les techniques utilisées pour surmonter les distorsions de ségrégation en amélioration restent aléatoires et peuvent conduire à des pertes de données.

4.7.2 En cartographie génétique

Généralement, pour éviter que les marqueurs qui montrent une distorsion de ségrégation entraînent des inexactitudes dans la cartographie, ils sont souvent exclus de l'analyse. Cette solution n'est pas sans inconvénients car elle réduit la couverture du génome, d'autant plus que les informations concernant les caractères quantitatifs ou qualitatifs des *loci* peuvent être perdus (Lorieux *et al.* 1995 a, b ; Song *et al.* 2006). De plus, il n'y a pas de standard approprié pour éliminer les marqueurs biaisés d'une carte génétique. Une autre solution serait de placer les marqueurs biaisés sur la carte comme s'ils étaient mendéliens, au risque d'aboutir à de fausses conclusions (Lorieux *et al.* 1995 a, b ; Song *et al.* 2006). Même si le test d'indépendance χ^2 et la valeur du Lodscore sont utilisés pour déterminer les effets des distorsions sur les liaisons, l'utilisation de tests de liaison plus stricts a été recommandée pour les marqueurs montrant une distorsion de ségrégation extrême, comme les fortes valeurs du LOD ou une très faible fréquence de recombinaison (Lorieux *et al.* 1995 a, b). Ainsi, pour tenir compte des distorsions de ségrégation dans l'analyse des données, Lorieux et al. (1995 a,b) ont développé un modèle avec un maximum de vraisemblance. Sur base du fait que la distorsion de ségrégation est généralement causée par une sélection gamétique et zygotique, ils ont spécifiquement travaillé avec des populations de type backcross et F₂, et avec des marqueurs dominants et co-dominants pour évaluer l'effet du type de marqueurs et du type de populations sur la DS. Ainsi, les résultats montrent qu'il n'est pas nécessaire de faire la

distinction entre sélection zygotique et gamétique, ni entre marqueurs dominants et co-dominants pour les populations issues de backcross. Dans ce cas, il est plus avantageux d'après Lorieux *et al.* (1995 a, b) d'utiliser l'estimateur de Bailey (1949). Contrairement au backcross, il est nécessaire de faire la distinction, d'une part, entre sélection zygotique et gamétique et, d'autre part, entre marqueurs dominants et co-dominants pour analyser une F₂ avec DS. Ils ont aussi montré que l'estimation des fréquences de recombinaison entre marqueurs co-dominants est moins affectée par la distorsion de ségrégation que les marqueurs dominants qui sont moins informatifs. Compte tenu de ces résultats, il est en général conseillé d'utiliser, si possible, des marqueurs co-dominants lors de la construction de cartes génétiques chez les espèces facilement affectées par les distorsions de ségrégation. Lorieux (2007, 2012), se basant sur les résultats obtenus, a mis au point la dernière version d'un logiciel développé pour élaborer des cartes génétiques avec des données ségrégantes incluant des marqueurs biaisés. Le logiciel nommé Mapdisto (<http://mapdisto.free.fr/>) peut être utilisé pour la construction et les dessins de cartes pour des populations de type F₂, BC₁, DH et les populations descendant d'une seule graine. La méthodologie de Lorieux est certes efficace mais comporte cependant des limites. Elle n'a en effet pas pris en compte certains modèles de sélection : par exemple l'épistasie ou un déroulement anormal de la méiose dû à des remaniements structurels chromosomiques tels que l'hétérozygotie structurelle. En effet, en présence d'hétérozygotie structurelle, la solution n'est sans doute pas statistique, elle relève plutôt de la cytogénétique (Lorieux *et al.* 1995a, b). D'autres logiciels qui disposent d'une option pour analyser des populations ayant une DS ont par la suite été développés : MapManager et PROC QTL (Liu *et al.* 2010). Certains chercheurs ont aussi prôné l'utilisation de populations sélectives pour réduire l'influence de la distorsion de ségrégation sur la carte génétique. Il s'agit de détecter la progression des distorsions de ségrégation sur des lignées recombinantes, puis tester et ajuster les populations en supprimant les lignées biaisées, afin de construire une carte appropriée utilisant les lignées recombinantes ajustées (Wang *et al.* 2004). Avec cette méthode Wang *et al.* (2004) ont ajusté une population de 201 à 184 lignées pour construire une carte appropriée du soja. Toutefois, la meilleure méthode pour analyser des données avec distorsion de ségrégation avec plus de précision est de faire la combinaison de plusieurs modèles. Ainsi Kalo *et al.* (2000) ont pu estimer plus précisément les distances génétiques, et éliminer de fausses liaisons causées par de fortes distorsions de ségrégation chez la luzerne diploïde (*Medicago sativa* L). Pour ce faire, ils ont associé la formule du maximum de vraisemblance de Lorieux *et al.* (1995a, b) et une méthode

indépendante non mathématique de Kesseli et al. (1994). De même, la cartographie comparée est aussi un outil qui permet d'identifier de fausses liaisons. Elle a permis à Cloutier et al. (1997) de mettre en évidence chez le maïs des pertes de données et des fausses liaisons. Cependant, il faut noter que ce genre de cartes comparatives est d'habitude plus performant pour un même type de populations ou de croisement (Song *et al.* 2006).

4.8 Conclusion

Observée dans un large éventail d'organismes, la distorsion de ségrégation est un phénomène commun en cartographie génétique. Toutefois, malgré le grand nombre de facteurs de distorsion de ségrégation identifiés, plusieurs questions nécessitent une clarification. D'abord, le nombre et les conséquences exacts des gènes distorceurs ne sont, à notre connaissance, pas bien déterminés. Ensuite, peu de types de populations cartographiées peuvent être analysés avec les méthodes de cartographie disponibles pour les LDS. De plus, les effets des interactions entre les LDS localisés sur différents chromosomes ne peuvent pas encore être estimés ; c'est notamment le cas quand on a affaire à deux marqueurs qui subissent des sélections (zygotique et gamétique) différentes et/ou quand, plus de deux allèles par *locus* après croisement entre parents hétérozygotes de type « pseudo F2 » sont observés. Enfin, les modèles avec épistasie conduisant à la sélection préférentielle de certains génotypes, sont biaisés et ne sont non plus pas encore bien étudiés. Néanmoins, la plupart des recherches convergent vers le fait que les distorsions de ségrégation sont plus fréquentes chez les descendances interspécifiques. L'hétérozygotie structurelle y joue probablement un rôle important (Song *et al.* 2006 ; Luro *et al.* 1995).

Des études complémentaires devront donc être effectuées chez les plantes pour améliorer notre compréhension de la létalité hybride et de la ségrégation des gènes déviants, durant l'introggression de gènes ciblés d'espèces sauvages vers les espèces cultivées. De telles investigations faciliteraient, d'une part, l'identification et l'emplacement de nouveaux LDS, leur évaluation correcte et l'utilisation des effets sélectifs des LDS (dans la transmission de gènes d'intérêts avec les gènes gamétocides) et, d'autre part, la production de cartes génétiques précises des résultats de QTLs.

Il est important de noter que les inversions d'ordre de gènes dues à l'existence de distorsions de ségrégations ont plus de conséquences sur les QTL que le simple biais d'estimation des distances génétiques. Ainsi, dans le cadre d'un programme d'amélioration, la présence de distorsions de ségrégation dans une région génomique particulière pourrait compromettre

l'utilisation de ces marqueurs moléculaires soumis aux effets de sélection. En effet, d'après Luro *et al.* (1995) il est pratiquement impossible d'utiliser des marqueurs moléculaires pour assister un programme d'introgression quand ces marqueurs sont associés à des fragments de chromosomes porteurs de facteurs de distorsion de ségrégation. Ces facteurs de distorsion peuvent en effet induire des modifications artificielles des fréquences de recombinaison entre allèles et donc laisser faussement croire à l'existence de liaisons entre les *loci* étudiés. Par conséquent, les connaissances sur la génétique de l'espèce étudiée apparaissent déterminantes pour connaître l'origine des distorsions et utiliser la méthode d'estimation la plus appropriée à un programme de cartographie. D'après Lorieux *et al.* (1995 a,b) et Cloutier *et al.* (1997), les techniques expérimentales utilisées et l'hétérozygotie résiduelle des lignées parentales aboutissent à des difficultés dans l'assignation des allèles et dans la détermination des groupes de liaisons. Cependant, les avancées de la recherche en matière d'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) et de séquençage devraient permettre une meilleure connaissance de la nature des gènes responsables de la DS et des mécanismes moléculaires sous-jacents.

5 MODALITES D'OBTENTION ET NATURE DU MATERIEL VEGETAL ETUDIE

5.1 Introduction

L'objectif de ce chapitre est d'identifier le matériel végétal qui a été utilisé au cours de la thèse et d'expliquer comment il a été obtenu.

5.2 Schéma suivi pour la création de l'hybride HRS

La méthode pseudophylétique (Mergeai, 2006) a été adoptée pour introgresser le caractère «*glanded-plant & glandless-seed* ». L'espèce cultivée *G. hirsutum* a été d'abord croisée avec *G. raimondii* qui est utilisée comme espèce pont. Après traitement à la colchicine, l'allohexaploïde intermédiaire obtenu a été croisé avec l'espèce donneuse *G. sturtianum* pour aboutir à l'hybride trispécifique HRS [$(G. hirsutum \times G. raimondii)^2 \times G. sturtianum$]. La figure 2 illustre le schéma de création de HRS.

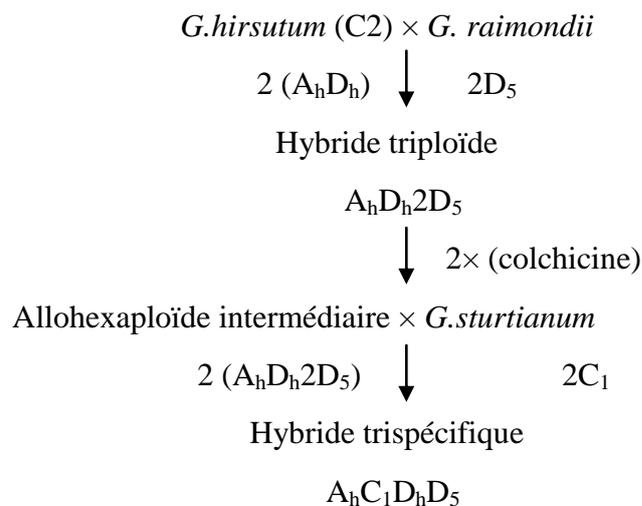


Figure 2: Schéma de création de l'hybride HRS par la méthode pseudophylétique (Vroh bi, 1999)

Le cultivar *G. hirsutum* C2 sélectionné en République Démocratique du Congo (RDC, ex-Zaïre), a servi à la création de l'hybride trispécifique HRS, alors que les cultivars *G. hirsutum* STAM F sélectionné au Togo et NC8 sélectionné en RDC ont été utilisés lors des travaux de rétrocroisements. Toutes les plantes utilisées et produites dans ce schéma de croisement sont répertoriées de la manière suivante dans la collection de Gembloux Agro-Bio-Tech/ULg.

- G 107 : *G. hirsutum* L. [2(A_hD_h)] (cultivar C2)
- G 173 : *G. hirsutum* L. [2(A_hD_h)] (cultivar NC8)
- G 7 : *G. raimondii* Ulbrich (2D₅)
- G 320 : *G. sturtianum* Willis (2C₁)
- G 289 : (*G. hirsutum* x *G. raimondii*) [(AD)₁D₅]
- G 376 ou HRS : [(*G. hirsutum* x *G. raimondii*)² x *G. sturtianum*] [(AD)₁D₅C₁]

5.3 Modalités de sélection du matériel retenu à chaque génération

A chaque génération d'autofécondation ou de rétrocroisement du matériel issu de l'hybride HRS, le choix des graines retenues pour produire des plantes adultes se fait en se basant sur leur état (bien ou mal formée) et sur leur teneur en gossypol. Ainsi une ou plusieurs souches sont étudiées selon les graines disponibles, pour chaque descendance.

5.4 Modalités de mise en culture des graines et les conditions expérimentales

5.4.1 Les modalités de mise en culture

Les graines de coton étudiées ont d'abord été égrenées puis délintées avec de l'acide sulfurique concentré (94%). Elles ont ensuite été scarifiées pour évaluer leur teneur en gossypol, puis elles sont mises en germination dans des boîtes de Pétri dont le fond est tapissé de papier filtre humide. Les graines ayant germé sont semées dans de petits pots remplis de terreau stérilisé à raison d'une graine par pot. Après le premier mois, les jeunes plantules qui ont bien levé sont repotées dans des pots de 5 à 10 litres.

Les plantes ont été arrosées à la capacité au champ, à raison d'une fois tous les deux jours durant la phase juvénile et durant la phase de la fructification-maturation.

Chez les hybrides issus de HRS, un dessèchement et une chute des jeunes capsules faisant suite à l'épanouissement de la fleur ont été observés. Pour pallier à cette situation, une solution d'hormones de croissance mise au point par Altman (1988), a été utilisée. Elle se compose d'acide gibbérellique (50mg/L) et d'acide β naphthoxy-acétique (100mg/L). Cette solution a été utilisée afin d'obtenir des capsules aussi bien pour les génotypes issus d'autofécondations que de croisements. A cet effet, un tampon d'ouate de coton imbibé de la solution de régulateurs de croissance est utilisé pour recouvrir l'ovaire de la plante après fécondation. L'ensemble est alors recouvert d'un petit sachet en plastique durant 48 heures.

L'étude s'est déroulée au Sénégal en conditions tropicales et en Belgique (sous serre).

5.4.2 Conditions expérimentales en Belgique

Les graines sélectionnées sont mises à pré-germer à l'étuve pendant 48h à une température moyenne de 27°C dans des boîtes de Pétri. Après germination, les graines sont semées et placées durant les premiers mois dans des chambres de culture afin de limiter les pertes. Les conditions de culture dans ces cellules étaient : 12h de photopériode, températures diurnes et nocturnes respectives de 26 et 22°C, humidité relative entre 50 et 60%. Les plantes ont ensuite été transférées au niveau des serres où les températures moyennes nocturne et diurne varient respectivement entre 17-18°C et 25-28°C. Les conditions dans les serres varient fortement selon les saisons, avec des températures maximales atteignant parfois 50°C en cas de fort ensoleillement (été).

5.4.3 Conditions expérimentales au Sénégal

Les observations ont été menées au Centre d'Application des Techniques d'Agriculture (CATA) de l'Ecole Nationale Supérieure d'Agriculture (ENSA) dans la région de Thiès (14°46'N et 16°57'O) au Sénégal. Le climat de la région est de type sahélien, les températures moyennes oscillent entre 19°C et 40°C (Bâ, 2005), avec deux saisons bien différenciées. Une saison pluvieuse de juin à octobre avec un maximum des pluies entre août et septembre et une saison sèche de novembre à mai. Thiès sur le plan pluviométrique est située entre l'isohyète 500 et 700 mm (Bâ, 2005).

Les travaux ont été conduits sur deux années successives (2006 et 2007), entre les mois de juin et de décembre pendant la saison des pluies avec des cumuls de pluviosité respectifs de 674,2 et 512 mm (CERAAS¹).

5.5 Méthodes appliquées pour obtenir le matériel végétal étudié

Les méthodes décrites ci-dessous ont été utilisées pour produire les graines utilisées à chaque génération et pour multiplier végétativement les plantes d'intérêt retenues.

¹ CERAAS : Centre d'Etude Régional pour l'Amélioration de l'Adaptation à la Sécheresse localisé à Thiès

5.5.1 Les croisements

Ils se déroulent en plusieurs étapes. Tout d'abord on procède à la castration de la fleur. Cette opération s'effectue la veille de son épanouissement, puis le gynécée est isolé à l'aide d'un sachet en plastique (polyéthylène) pour éviter toute fécondation.

La seconde étape consiste à appliquer la colonne séminale de la fleur du parent mâle sur le pistil de la fleur femelle choisie ; elle se déroule le lendemain de la castration.

Enfin, pour prévenir une chute précoce des capsules, et maximiser les chances d'obtenir des graines, il est appliqué la solution d'hormones de croissance mis au point par Altman. (1988), puis l'ensemble est recouvert d'un sachet pour éviter toute pollution par du pollen étranger.

La solution de régulateurs de croissance utilisée se compose d'acide gibbérellique (50mg/L) et d'acide β naphthoxy-acétique (100mg/L).

5.5.2 Les autofécondations

Elles se déroulent exactement comme les croisements avec toutes les étapes, sauf qu'ici la fleur n'est pas castrée. L'ensemble est isolé à l'aide d'un sachet en plastique (polyéthylène) pour éviter toute fécondation extérieure.

5.5.3 Le greffage des plants

Le greffage est une opération visant à multiplier végétativement une plante. Il a été utilisé dans le but, d'augmenter le nombre et préserver les individus présentant le génotype intéressant. Il permet ainsi, en sauvant ces génotypes qui sont généralement, génétiquement déséquilibrés, d'obtenir un plus grand nombre de descendants à étudier.

La technique utilisée est le greffage en fente. Le sujet porte-greffe est une plantule de *G. hirsutum*, robuste au stade 4 feuilles, dont on coupe la partie supérieure ; deux nœuds au-dessus du méristème terminal. Les greffons sont constitués de la partie supérieure des branches végétatives (monopodiales). Au moyen d'une lame de rasoir, une fente dans laquelle viendra se nicher le greffon incisé à cet effet est effectuée, en partant du sommet sectionné. L'adhésion de l'ensemble ; porte-greffe et greffon est obtenue à l'aide d'un bandage compressif, et le tout est hermétiquement recouvert d'un sachet en plastique pour créer une atmosphère saturée en humidité pendant 8 à 10 jours.

5.6 Schéma suivi pour l'obtention du matériel végétal étudié

La figure 3 donne la généalogie du matériel végétal. A chaque génération, quelques souches issues chacune d'une graine présentant au plus haut niveau le caractère recherché a été utilisée pour passer à la génération suivante par autofécondation ou par rétrocroisement avec la variété de cotonnier cultivé de *G. hirsutum*. La terminologie utilisée dans la figure 3 permet de se rendre compte de toutes les manipulations qui ont été effectuées depuis la création de l'hybride HRS :

- BC= backcross et le chiffre qui le suit renseigne sur le nombre de backcross réalisé depuis la création de l'hybride ;
- S= autofécondation et le chiffre qui le suit renseigne sur le nombre d'autofécondations réalisées depuis la création de l'hybride.

L'ensemble des plantes impliquées dans le programme d'amélioration sont issues d'une souche BC2 produite à partir de l'hybride HRS créé par Vroh bi *et al.* (1999). A partir de cette plante, quatre voies ont été suivies pour obtenir le matériel végétal étudié.

La voie 1 est constituée de sept générations successives d'autofécondation à partir de la BC2.

La voie 2 se compose d'une génération issue d'un backcross de la souche BC2S2 suivie de trois générations obtenues par autofécondation.

La voie 3 se compose d'une génération issue d'un backcross de la souche BC3S3, avec cette dernière comme parent femelle (♀), suivi d'une autofécondation ;

La voie 4 se compose d'une génération issue d'un backcross de la souche BC3S3, avec cette dernière comme parent mâle (♂), suivi d'une autofécondation.

Vroh, (1999), et Benbouza, (2004) ont développé les générations présentées dans la figure 3 jusqu'aux stades BC2S5 et BC3S3. Nos travaux ont porté sur les générations ultérieures.

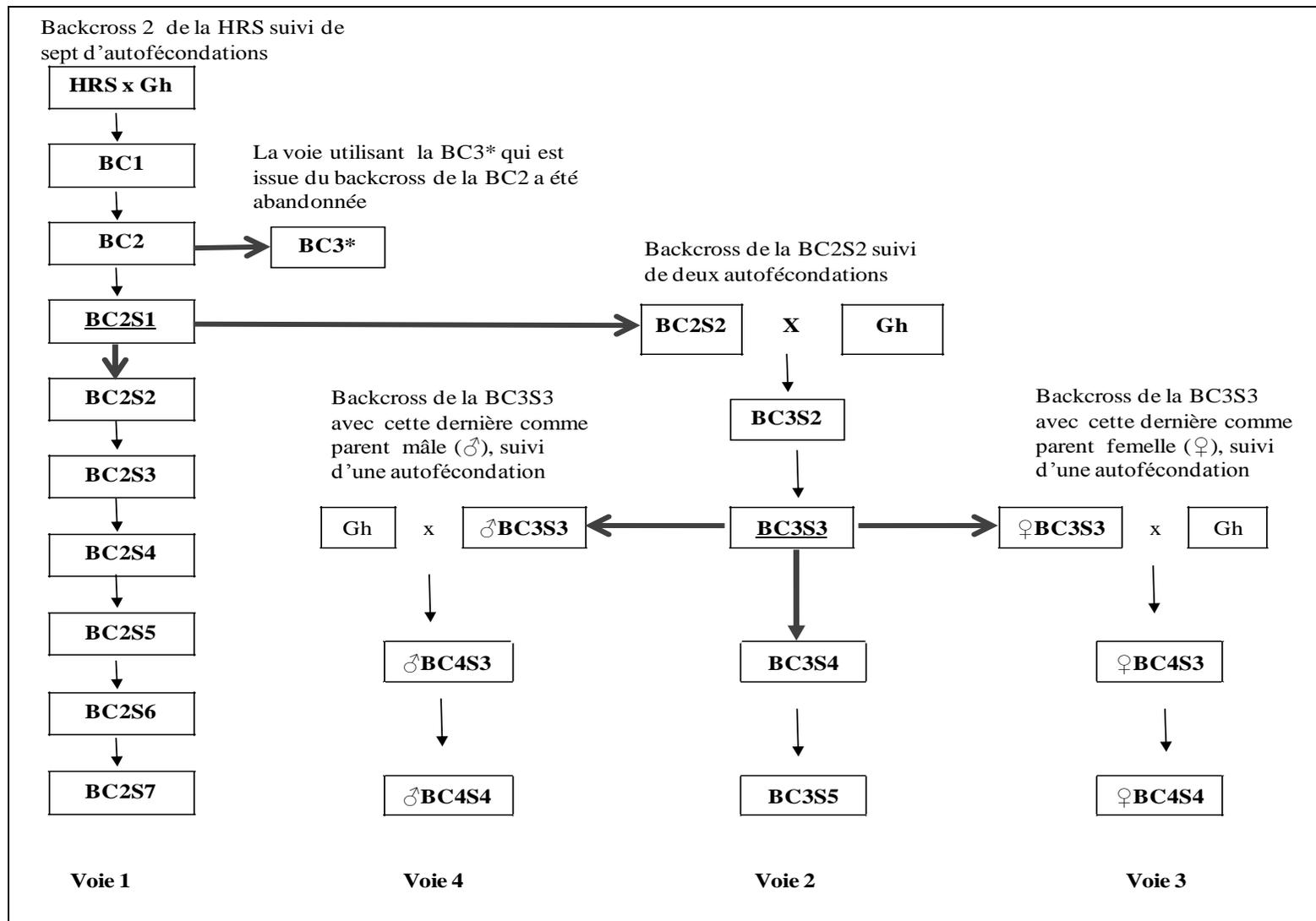


Figure 3: Généalogie du matériel végétal étudié.
G.h : *Gossypium hirsutum*

5.6.1 Les descendance autofécondées de la voie 1

Tout le programme d'amélioration dans le cadre duquel nous travaillons repose sur la sélection d'une souche HRS BC2. La réalisation de sept générations d'autofécondation à partir de ce matériel a permis d'obtenir des descendance BC2S1 à BC2S7. Le tableau 5 donne le pédigrée du matériel végétal étudié au niveau de la voie 1.

Tableau 5: Pedigrée des populations de graines et de plantes appartenant à la voie 1

Souches parentales		Génération des graines produites	Nombre de graines produites dont la teneur en gossypol a été évaluée	Nombre de graines produites analysées au moyen de marqueurs SSRs
Identification complète	Identification abrégée			
BC2/01/01	BC2	BC2S1	102	-
BC2/01/01-S1/09	BC2S1	BC2S2	63	-
BC2/01/01-S2/09/06	BC2S2	BC2S3	42	-
BC2/01/01-S3/09/06/01	BC2S3a	BC2S4	113	-
BC2/01/01-S4/09//06/01	BC2S4a	BC2S5	166	2
BC2/01/01-S4/09/06/02	BC2S4b			7
BC2/01/01-S5/09/06/01/51	BC2S5a	BC2S6	90	78
BC2/01/01-S5/09/06/01/54	BC2S5b			
BC2/01/01-S5/09/06/02/08	BC2S5c			
BC2/01/01-S5/09/06/02/09	BC2S5d			
BC2/01/01-S5/09/06/02/10	BC2S5e			
BC2/01/01-S6/09/06/01/51/14	BC2S6a	BC2S7	319	-
BC2/01/01-S6/09/06/01/51/15	BC2S6b			

5.6.2 Les descendance des voies 2, 3 et 4

Le schéma de croisement suivi pour produire la souche BC3S3 à la base des voies 2, 3 et 4 est décrit dans la figure 3. Ces trois voies de croisement concernent les descendance suivantes :

- Voie 2 : générations BC3S4 et BC3S5 obtenues par autofécondation de la BC3S3 ;
- Voie 3 : plantes ♀BC4S3 obtenues par rétrocroisement avec une variété de *G. hirsutum* de la souche BC3S3 comme parent femelle (♀) et plantes ♀BC4S4 obtenues par autofécondation de souches ♀BC4S3 sélectionnées sur base de l'expression du caractère recherché au niveau des graines dont elles sont issues;
- Voie 4 : plantes ♂BC4S3 obtenues par rétrocroisement avec une variété de *G. hisutum* de la souche BC3S3 comme parent mâle (♂) et plantes ♂BC4S4 obtenues par autofécondation de souches ♂BC4S3 sélectionnées sur base de l'expression du caractère recherché au niveau des graines dont elles sont issues.

Le tableau 6 donne les pédigrées du matériel végétal étudié au niveau des voies 2, 3 et 4.

Tableau 6: Pédigrée des populations de graines et de plantes appartenant aux descendance issues du rétrocroisement et de l'autofécondation de la souche HRS BC3S3 (voies 2, 3 et 4)

Souches parentales		Génération des graines produites	Nombre de graines produites dont la teneur en gossypol a été évaluée	Nombre de graines produites analysées au moyen de marqueurs SSRs
Identification complète	Identification abrégée			
BC2/01/01-S2/09/08-BC1/03-S1/14	BC3S3	BC3S4	681	138
BC2/01/01-S2/09/08-BC1/03-S2/14/069	BC3S4a	BC3S5	344	
BC2/01/01-S2/09/08-BC1/03-S2/14/109	BC3S4b			
BC2/01/01-S2/09/08-BC1/03-S2/14/110	BC3S4c			
BC2/01/01-S2/09/08-BC1/03-S2/14/362	BC3S4d			
BC2/01/01-S2/09/08-BC1/03-S2/14/694	BC3S4e			
BC2/01/01-S2/09/08-BC1/03-S1/14 x STAM F	♀BC4a	♀BC4S3	471	35
BC2/01/01-S2/09/08-BC1/03-S1/14 x NC8	♀BC4b			
BC2/01/01-S2/09/08-BC1/03-S1/14 x NC8-S1/20	♀BC4S3	♀BC4S4	96	
STAM F x BC2/01/01-S2/09/08-BC1/03-S1/14	♂BC4	♂BC4S3	208	33
STAM F x BC2/01/01-S2/09/08-BC1/03-S1/14-S1/139	♂BC4S3a	♂BC4S4	572	
STAM F x BC2/01/01-S2/09/08-BC1/03-S1/14-S1/145	♂BC4S3b			

6 EVALUATION DE L'EXPRESSION DU CARACTÈRE "INHIBITION DE LA SYNTHÈSE DU GOSSYPOL UNIQUEMENT DANS LA GRAINE".

6.1 Introduction

Les descendants obtenus au fil des générations de rétrocroisement et d'autofécondation qui ont suivi la création de l'hybride trispécifique HRS présentent une forte variabilité de l'expression du caractère « *glandless-seed and glanded-plant* » (Benbouza *et al.* 2009).

Ce chapitre a pour objectif d'évaluer l'expression du caractère inhibition de la synthèse de gossypol au niveau de la graine chez toutes les générations étudiées obtenues à partir de l'hybride HRS, afin d'essayer de comprendre les facteurs qui affectent celle-ci.

6.2 Matériel et méthodes

6.2.1 Matériel végétal

L'origine et le schéma de sélection du matériel végétal étudié ont été présentés dans le chapitre 4. Les effectifs des graines étudiées par génération et leur lieu de production sont présentés dans les tableaux 7 et 8. En ce qui concerne le tableau 7, le nombre de graines scarifiées de la BC2S1 à la BC2S5 n'est pas disponible, car nous avons travaillé sur des graines qui avaient déjà été scarifiées avant le démarrage de nos travaux. Une partie des graines de la génération ♂BC4S3 avait aussi été déjà scarifiée avant le démarrage de nos travaux. C'est la raison pour laquelle au niveau du tableau 8, le nombre de graines scarifiées est moins important que le nombre de graines évaluées pour la ♂BC4S3. Il est important de rappeler que d'une génération à l'autre, il y a toujours un travail de sélection qui privilégie l'utilisation des graines bien formées, exprimant le caractère « *glandless-seed* » qui se fait, pour avancer dans la sélection.

Tableau 7: Nombre de graines scarifiées et évaluées par génération de la voie 1

Descendance autofécondée de le BC2	Nombre de graines scarifiées	Nombre de graines évaluées	Lieu de production des graines
BC2S1	-	102	Gembloux
BC2S2	-	63	
BC2S3	-	42	
BC2S4	-	113	
BC2S5	-	166	
BC2S6	408	90	
BC2S7	514	319	Sénégal
Total	922	895	

Tableau 8: Nombre de graines scarifiées et évalués par génération des voies 2, 3 et 4

Génotypes	Nombre de graines scarifiées	Nombre de graines évaluées	Zone de production des graines
BC3S4	1082	681	Gembloux
BC3S5	495	344	Sénégal
♀BC4S3	523	471	Gembloux
♂BC4S3	168	208	
♂BC4S4	681	572	Sénégal
♀BC4S4	114	96	
Total	3063	2372	

6.2.2 Observations et mesures

Le nombre de graines produites par les descendances des souches analysées étant très variable, les observations ont été faites sur des effectifs différents. Les grandes différences qui existent entre les effectifs des graines analysées par génération sont dues à la variabilité du niveau de fertilité des plantes obtenues pour chacune d'elle et au nombre variable de plantes obtenues par génération (certaines souches ont été largement multipliées par greffage)

Les manipulations et les observations réalisées sur les graines sont le comptage des graines récoltées, leur scarification et l'évaluation de leur teneur en gossypol.

6.2.2.1 Analyse de l'état des graines récoltées

Après scarification du tégument des graines produites, il est procédé au comptage du nombre et au calcul du taux de graines bien formées, mal formées et vides. Le taux de chaque état est calculé par rapport au nombre de graines récoltées. Les graines malformées et vides sont considérées comme perdues. Le taux de graines perdues est alors calculé selon la formule ci-dessous :

$$\text{Taux de graines perdues} = \frac{\text{Nombre de graines mal formées} + \text{Nombre de graines vides}}{\text{Nombre de graines récoltées}} \times 100$$

6.2.2.2 Analyse de l'expression du caractère « glandless-seed »

L'estimation de la teneur en gossypol du matériel végétal étudié a été faite selon la technique de quantification visuelle mise au point par Benbouza *et al.* (2002) comme expliqué dans le chapitre 3. Elle a concerné toutes les graines qui n'étaient pas vides.

Les données obtenues ont été analysées avec le logiciel Minitab 17 et Excel. Les analyses ont principalement portées sur une comparaison de moyenne, le calcul de l'écart-type et du coefficient de variation.

6.3 Résultats

6.3.1 Analyse de l'état des graines produites dans le cadre de la thèse

Le tableau 9 reprend les résultats obtenus concernant l'état des graines analysées pour les générations étudiées dans le cadre de la thèse.

Tableau 9: Fréquences de graines vides, mal-formées et bien formées produites dans le cadre de la thèse

Génération	Nombre de graines récoltées	Nombre de graines bien formées (%)	Nombre de graines mal formées (%)	Nombre de graines vides (%)	Taux de graines perdues (%)
Matériel végétal de la voie 1					
BC2S6	408	296(73)	89(22)	23(6)	27
BC2S7	514	319(62)	80(16)	115(22)	38
Matériel végétal de la voie 2					
BC3S4	1082	628(58)	187(17)	267(25)	42
BC3S5	495	257(52)	94(19)	144(29)	48
Matériel végétal de la voie 3					
♂BC4S3	168	154(92)	14(8)	0	8
♂BC4S4	681	452(66)	120(18)	109(16)	34
Matériel végétal de la voie 4					
♀BC4S3	523	400(76)	73(14)	50(10)	24
♀BC4S4	114	90(79)	6(5)	18(16)	21

Les fréquences relatives de graines bien formées varient de 52% à 92%. En conséquence, 8 à 48 % des graines récoltées (mal formées ou vides) sont inutilisables à moins d'utiliser des techniques de sauvetage d'embryon pour récupérer ceux des graines mal formées.

Une classification des descendance testées en fonction des pertes enregistrées permet d'identifier trois groupes:

- le premier groupe est celui qui a enregistré les pertes les plus importantes. Il est constitué des descendance BC3S4 et BC3S5 qui ont enregistré des taux de perte sensiblement égaux ; avec respectivement 42% et 48% ;
- ensuite suivent les descendance ♀BC4S4, ♀BC4S3, BC2S7, BC2S6 et la ♂BC4S4 qui ont enregistré des pertes allant de 21% à 34% ;

- enfin vient la descendance ♂BC4S3 au niveau de laquelle on observe seulement 8% de graines qui sont perdues.

Ce travail de sélection des graines a permis d'observer *de visu* que la majorité des graines à faible teneur en gossypol (qui expriment le caractère inhibition de la synthèse du gossypol) étaient chétives et mal formées.

Par ailleurs, une comparaison de l'état des graines et de l'expression du caractère « *glandless-seed* » a mis en évidence l'absence de lien direct entre ces deux paramètres. Des graines mal-formées peuvent présenter une haute teneur en gossypol et vice-versa. Les figures 4 et 5 illustrent ce constat.



Figure 4: graines mal formées à forte et à faible teneur en gossypol

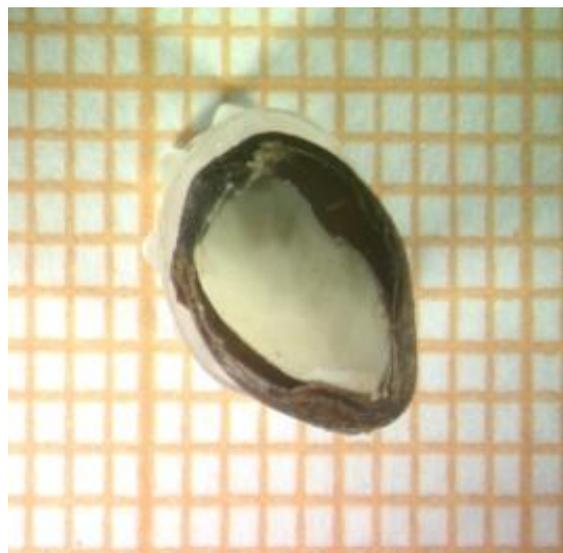


Figure 5: graines bien formées à forte et à faible teneur en gossypol

6.3.2 Expression du caractère inhibition de la synthèse de gossypol au niveau de la graine

Les résultats indiquent une ségrégation importante de l'expression du caractère inhibition de la synthèse du gossypol dans la graine chez le matériel végétal analysé.

L'analyse de la variance effectuée sur les descendance issues des quatre (4) voies de sélection exploitées présentées à la Figure 3 (chapitre 5) montre des différences très hautement significatives, d'une génération à une autre.

6.3.2.1 Expression du caractère chez les sept générations issues de l'autofécondation de BC2

La figure 6 donne l'évolution des moyennes de la teneur en gossypol observées de la BC2S1 à la BC2S7. Le résultats montrent une tendance générale à la baisse de la teneur en gossypol de la BC2S1 (1,16%) à la BC2S4 (0,25%) puis une remontée de la teneur en gossypol des graines à partir de la BC2S5 (0,40%) jusqu'à la BC2S7 (0,68%), avec un palier pour les moyennes des teneurs en gossypol des graines BC2S5 et BC2S6 qui sont identiques.

Les données concernant la variabilité des mesures réalisées sont reprises dans le tableau 10. Il montre que le coefficient de variation observé pour la génération BC2S4 dépasse les 90 % alors qu'il varie entre 23 et 54 % pour les autres générations.

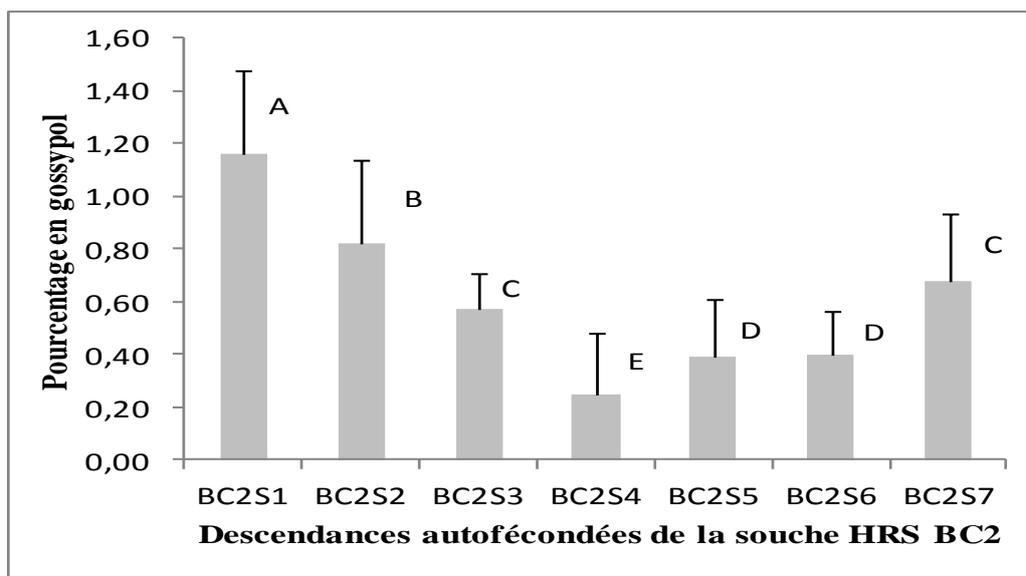


Figure 6: Comparaison des moyennes de la teneur en gossypol des descendance autofécondées de la souche BC2

Les barres au dessus des histogrammes représentent les écarts-type
Les lettres au dessus des histogrammes représentent les groupes

Tableau 10: Analyse de l'expression de la teneur en gossypol des descendances de la voie 1

Génotype	Effectifs	Teneur moyenne en gossypol (%)	Ecart type	Coef de variation	Groupe
BC2S1	102	1,16	0,32	0,27	A
BC2S2	63	0,82	0,32	0,38	B
BC2S3	42	0,58	0,13	0,23	C
BC2S4	113	0,25	0,24	0,96	E
BC2S5	166	0,40	0,21	0,54	D
BC2S6	90	0,40	0,17	0,42	D
BC2S7	319	0,68	0,25	0,38	C

Les valeurs moyennes affectées d'une même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de probabilité de 5%

Le tableau 11 représente les fréquences absolues et relatives de graines par classe de teneur en gossypol chez les descendants de la voie 1. Il montre qu'on ne trouve des graines totalement exemptes de gossypol que chez les générations BC2S4 et BC2S5 et chez ces générations, respectivement 31 % et 10% des graines présentent une teneur en gossypol inférieure à 0,2%. A partir de la BC2S1, la proportion de graines dont la teneur en gossypol est inférieure à 0,20 % augmente avec le nombre de générations d'autofécondation pour atteindre un maximum en BC2S4, avant de diminuer progressivement dans les générations suivantes.

Tableau 11: Fréquences absolues et relatives de graines par classe de teneur en gossypol chez les descendants de la voie 1

Classes de %G	Matériel végétal de la voie 1							STAM F (%)
	BC2S1 (%)	BC2S2 (%)	BC2S3 (%)	BC2S4 (%)	BC2S5 (%)	BC2S6 (%)	BC2S7 (%)	
0%	0	0	0	17 (15)	10 (6)	0	0	0 (0)
0,001-0,2%	2 (2)	4 (6)	1 (2)	35 (31)	24 (14)	12 (13)	7 (2)	0 (0)
0,21-0,50%	2 (2)	7 (11)	9 (21)	52 (46)	79 (48)	52 (58)	70 (22)	0 (0)
0,51-1,50%	99 (96)	52 (83)	32 (76)	9 (8)	53 (32)	26 (29)	242 (76)	103 (100)
Total	103	63	42	113	166	90	319	103

6.3.2.2 Expression du caractère chez les générations des voies 2,3 et 4

La figure 7 donne l'évolution des moyennes de la teneur en gossypol observées chez les descendances issues du rétrocroisement de la souche BC2S2. Les données concernant la variabilité des mesures réalisées sont reprises dans le tableau 12. La tendance observée, est une augmentation significative de la production glandulaire après chaque autofécondation qui succède à un rétrocroisement.

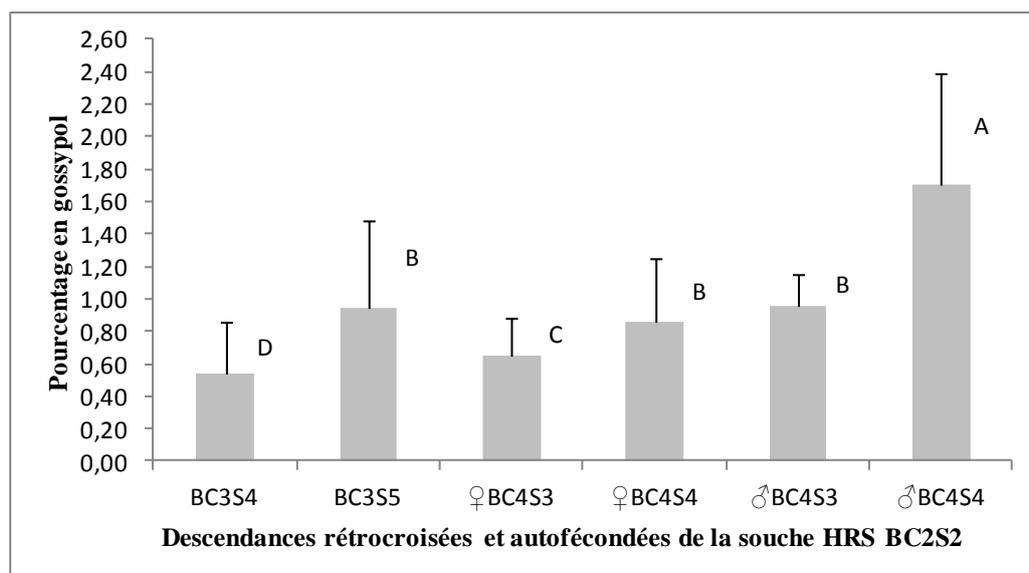


Figure 7: Comparaison des moyennes de la teneur en gossypol des descendances rétrocroisées puis autofécondées de la souche BC2S2

Les barres au dessus des histogrammes représentent les écarts-type

Tableau 12: Analyse de l'expression de la teneur en gossypol des descendances des voies 2, 3 et 4

Génotype	Effectifs	Teneur moyenne en gossypol (%)	Ecart-type	Coef de variation	Groupe
BC3S4	681	0,55	0,31	0,57	D
BC3S5	344	0,95	0,54	0,57	B
♀BC4S3	471	0,66	0,23	0,35	C
♀BC4S4	96	0,85	0,40	0,47	B
♂BC4S3	208	0,96	0,19	0,20	B
♂BC4S4	572	1,71	0,68	0,40	A

Les valeurs moyennes affectées d'une même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de probabilité de 5%

Le tableau 13 donne la distribution de fréquence des teneurs en gossypol des graines analysées par génération en considérant quatre grandes classes d'expression du caractère.

Tableau 13: Fréquences absolues et relatives par classe de teneur en gossypol chez les descendants des voies 2, 3 et 4

Classes de %G	Matériel végétal des voies 2, 3 et 4						STAM F (%)
	BC3S4 (%)	BC3S5 (%)	♀BC4S3 (%)	♀BC4S4 (%)	♂BC4S3 (%)	♂BC4S4 (%)	
0%	67 (10)	21 (6)	0 (0)	3 (3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
0,001-0,2%	61 (9)	21 (6)	12 (3)	6 (6)	0 (0)	16 (3)	0 (0)
0,21-0,50%	136 (20)	22 (6)	85 (18)	7 (7)	3 (1)	15 (3)	0 (0)
0,51-1,50%	417 (61)	280 (81)	374 (79)	80 (83)	205 (99)	541 (95)	103 (100)
Total	681	344	471	96	208	572	103

Les graines issues de l'autofécondation de souches ♀BC4S3 et ♂BC4S3 présentent des moyennes de teneurs en gossypol significativement supérieures à celles de la génération à laquelle appartenaient leurs parents (Figure 7). Ces augmentations de teneur en gossypol s'accompagnent d'une très forte augmentation des coefficients de variation des moyennes qui passent de 35 à 47 % pour la ♀BC4S4 par rapport à la génération ♀BC4S3 et de 20 à 40 % pour la ♂BC4S4 par rapport à son parent ♂BC4S3 (Tableau 12). Des proportions non négligeables des graines BC3S4 et BC3S5 présentent des teneurs en gossypol inférieures à 0,2 % (respectivement 19 et 12 % des effectifs totaux) mais la teneur moyenne est nettement plus élevée chez les BC3S5 que chez les BC3S4. Ces deux catégories de graines se caractérisent par les coefficients de variation les plus élevés (proches de 60 %).

La réalisation de rétrocroisements avec une variété de *G. hirsutum* se traduit par la disparition des graines « *glandless* » et une augmentation de la teneur moyenne en gossypol par rapport aux graines produites par autofécondation du parent BC3S3 (Tableau 12). Le coefficient de variation de la teneur moyenne en gossypol est fortement réduit chez les graines ♀BC4S3 et ♂BC4S3 par rapport à ce qui est observé pour les graines BC3S4 (Tableau 13).

6.4 Discussion

6.4.1 Analyse des problèmes de viabilité des graines

Toutes les descendance testées ont montré des problèmes de viabilité des graines produites à des niveaux variables avec des taux de graines perdues allant de 8% à 42%. Le grand nombre de graines mal formées ou vides observées chez les descendance testées à un stade avancé de la sélection (BC2S7 et BC4S4), indique que les facteurs induisant ces problèmes de viabilité persistent. Ces résultats font suite aux problèmes de viabilité que Vroh bi *et al.* (1999) et Benbouza, (2004) ont constaté dans les premières générations obtenues par rétrocroisement et autofécondation de l'hybride HRS. Ils vont dans le même sens que ceux obtenus par ces auteurs qui n'ont pas quantifié ces paramètres.

Les descendance BC2S6 et la BC2S7 ont enregistré respectivement 27% et 38% de perte de graines. Les pourcentages de perte de graines observés en BC3S4 et BC3S5 atteignent des niveaux beaucoup plus élevés (42 % et 48 % respectivement). La multiplication des générations d'autofécondation n'a donc pas permis d'éliminer la ou les causes des problèmes de viabilité des graines. Les données obtenues mettent également en évidence que la mauvaise viabilité des graines n'est pas nécessairement liée à une bonne expression du caractère

recherché, ce qui laisse supposer que d'autres facteurs que celui (ou ceux) contrôlant l'inhibition de la synthèse du gossypol uniquement dans la graine sont en cause.

La réalisation de rétrocroisements s'est traduite par une forte diminution du problème de viabilité des graines produites. Les taux de graines perdues étaient de 8 % pour les ♂BC4S3 et de 24 % pour les descendants ♀BC4S3. Cette réduction est l'indice d'un retour vers le fond génétique de *G. hirsutum* par une réduction de la présence des gènes de *G. sturtianum*. Le passage par autofécondation de la génération ♂BC4S3 à la ♂BC4S4 s'accompagne d'une forte augmentation (34%) du pourcentage de graines perdues qui pourrait être due à l'expression à l'état homozygote de gènes de létalité transmis au matériel ♂BC4S3 par le pollen du parent BC3S3. Le fait que le pourcentage de perte de graines reste quasi identique entre les générations ♀BC4S3 et ♀BC4S4 (respectivement 24 et 21 % de pertes de graines) et les générations BC3S4 et BC3S5 (respectivement 42 et 48%), pourrait indiquer des interactions stabilisatrices au niveau du matériel génétique transmis via l'ovule par le parent BC3S3.

6.4.2 Expression du caractère inhibition de la synthèse du gossypol dans la graine

Si on considère que l'observation de graines qui présentent une teneur en gossypol inférieure à 0,5 % ne peut s'expliquer que par l'expression au moins partielle du caractère recherché, on peut affirmer que toutes les générations testées expriment ce caractère mais que cette expression se fait à des niveaux très variables. Ces observations confirment celles effectuées par nos prédécesseurs (Vroh bi 1999 et Benbouza 2004) qui ont trouvé que le caractère « *glandless-seed* » est quantitatif et polygénique.

Une amélioration de l'expression du caractère recherché au fil des générations de la BC2S1 jusqu'à la BC2S4 a été observée. Par ailleurs, Benbouza, (2004) a trouvé que la teneur en gossypol des graines produites par autofécondation des plantes BC2S4 était globalement plus élevée, comparé à celle de la génération antérieure BC2S3. La différence entre les résultats de Benbouza, (2004) et les nôtres peut être expliquée par les effectifs étudiés. Nous avons travaillé sur 63 graines BC2S3 et 42 graines BC2S4, alors que Benbouza, (2004) en a évalué un plus grand nombre ; 91graines BC2S3 et 140 graines BC2S4, ce qui rend ses résultats plus fiables. Ainsi la diminution de cette expression du caractère recherché observée dans les générations suivantes (BC2S5 à BC2S7) laisse penser que des gènes importants liés à l'expression de l'inhibition de la synthèse du gossypol uniquement dans la graine ont été perdus entre la BC2S3 et la BC2S4 si on se réfère aux résultats de Benbouza, (2004). Mais, il

est aussi possible que les réarrangements génétiques qui se seraient produits à ce niveau ont entraîné une désactivation des gènes impliqués, dans le cas où ceux-ci auraient été conservés dans les générations suivantes.

La production glandulaire fait intervenir plusieurs paramètres, elle varie en fonction des lignées de la même espèce, du stade de développement de la plante, de l'état physiologique, des conditions de l'environnement, des organes et de leur taille (Alteman, 1988 ; Hedin *et al.* 1991 ; Benbouza, 2004). Ainsi, selon Benbouza (2004), en fonction de tous ces paramètres, la teneur en gossypol de certaines graines HRS, peut être plus importante que celle du cotonnier cultivé. Le fait que les graines des générations BC2S7, BC3S5, ♂BC4S4 et ♀BC4S4 aient été produites au Sénégal, avec ses conditions climatiques en terme de température, d'ensoleillement et de pluviométrie, peut être une cause de l'augmentation de leur production glandulaire. Pons *et al.* (1953) ont montré que la teneur en gossypol des graines de coton est négativement corrélée à la température et positivement à la pluviométrie. Selon cet auteur, la teneur en gossypol peut varier du simple au triple sur une même variété selon la pluviométrie. Cependant l'augmentation après autofécondation de la production glandulaire de graines produites à Gembloux, au niveau des générations BC2S4 rapportée par Benbouza (2004), et des générations BC2S5 et BC2S6 montre que chez les plantes HRS, même si les effets de l'environnement peuvent accentuer la teneur en gossypol, d'autres facteurs semblent être en cause.

Ainsi, l'augmentation de la teneur en gossypol constatée dans les générations ♂BC4S3 et ♀BC4S3 est conforme avec les mécanismes de la production glandulaire chez le cotonnier. La production glandulaire est un phénomène très complexe chez les deux (2) espèces allotétraploïde de cotonniers cultivés. Selon Pauly, (1979), elle est contrôlée par six (6) *loci* indépendants (GL₁, GL₂, GL₃, GL₄, GL₅, GL₆). Parmi ceux-ci, GL₂ et GL₃ qui sont des *loci* dominants interviennent dans la production glandulaire au niveau de la graine. La nature amphidiploïde du cotonnier tétraploïde fait qu'il possède des *loci* doubles ou dupliqués pour une même fonction et en particulier pour le caractère glandulaire ; c'est le phénomène de redondance (Liu *et al.* 2001). La variabilité observée dans l'expression du caractère « *glandless-seed* » chez les générations de HRS, prouve que les gènes répresseurs de la synthèse du gossypol apporté par *G. sturtianum* sont présents dans le fond génétique de *G. hirsutum* et jouent leur rôle. Mais, il est important de savoir que l'expression des deux (2) allèles dominants GL₂ et GL₃ est sous l'influence du fond génique dans lequel ils agissent

(Lee, 1974 ; Benbouza, 2004). Les deux espèces parentales diploïdes des cotonniers tétraploïdes étant bien glandulaires et possédant donc ces deux *loci* contrôlant la production de glandes à gossypol, le génome de chacune d'elle contribue dans l'expression glandulaire des tétraploïdes naturels (Wilson et Lee 1971 ; Pauly, 1979). Zhu et Daofan (2001) ont démontré que le mécanisme de transmission du caractère « *glandless-seed* », est le même chez cinq (5) espèces australiennes (*G. nandewarensis*, *G. bickii*, *G. australe*, *G. nelsonii* et *G. sturtianum*). Chez ces dernières, le ou les gènes responsables du caractère seraient localisés au(x) même(s) locus. Ils ont aussi trouvé que le caractère « *glandless-seed* » de l'espèce sauvage australienne *G. bickii* est dominant chez l'hybride créé en croisant cette espèce et *G. arboreum* (génome A), et récessif chez l'hybride créé en croisant *G. bickii* et *G. davidsonii* (génome D). Le cotonnier *G. hirsutum* utilisé dans notre recherche étant du génome AD, cette caractéristique peut affecter l'effet du caractère « *glandless-seed* » de l'espèce sauvage australienne *G. sturtianum*, entraînant ainsi une expression variable du caractère.

Selon Lee, (1974), l'interaction des allèles contrôlant le caractère glandulaire influence aussi la teneur en gossypol. Il est donc difficile de déterminer avec exactitude la fonction des allèles contrôlant le caractère glandulaire dans la production et/ou le stockage des terpénoïdes. Mais, ce qui est sûr c'est que le gène GL_2 intervient deux fois plus que le GL_3 dans la teneur en gossypol des graines. Ces gènes indépendants et complémentaires, sont des gènes majeurs. Séparément leurs allèles contrôlent la distribution des glandes sur une grande partie de la plante avec un effet de dosage allélique. Plus il y a d'allèles dominants au niveau de chacun de deux loci, plus la densité de glandes est importante. Celle-ci est maximale pour les individus $GL_2GL_2GL_3GL_3$ et nulle pour les individus $gl_2gl_2gl_3gl_3$ (Lee, 1974).

L'augmentation du caractère glandulaire après autofécondation trouve son explication dans les effets d'additivité des allèles glandulaires. Ces effets sont toujours hautement significatifs, et constituent la principale source de variation de la variance génétique totale en pourcentage pour la teneur en gossypol dans la graine, les cotylédons et les jeunes boutons floraux (entre 92% et 98%) (McMichael, 1960 ; Wilson *et al.* 1971 ; Pauly, 1979). La teneur en gossypol est un caractère qui s'hérite de façon additive et cette caractéristique est deux fois plus importante chez le locus GL_2 (Lee *et al.* 1968 ; Yang *et al.* 1976). Lorsqu'on procède à une autofécondation, on augmente les chances d'interaction, donc l'additivité des différents allèles, et on favorise ainsi l'expression glandulaire des graines. Dans notre cas, cette additivité des effets glandulaires est encore plus importante avec les descendances issues de

backcross. Le cotonnier cultivé *G. hirsutum* qui est utilisé pour réaliser les backcross, manifeste une production glandulaire normale induite par la présence des allèles glandulaires GL₂ et GL₃ à l'état homozygote. Donc, le rétrocroisement avec le cotonnier cultivé se traduit automatiquement par l'inclusion des allèles GL₂ et GL₃ dans le matériel produit et ainsi par l'augmentation du pourcentage de graines à forte densité de glandes.

Kohel et Lee, (1984), travaillant sur un cotonnier mutant glandless obtenu par irradiation de plantes de *G. barbadense* au ³²P, ont découvert que la complète absence de glandes à gossypol chez cette plante était due à un allèle dominant au niveau du locus GL₂. Ils l'ont nommé Gl₂^e. Tang *et al.* (1994) ont confirmé la dominance du caractère « *glandless-seed* » induit par l'allèle GL₂^e dans une variété glandless de *G. barbadense*. D'autre part, Muramoto, (1969) et Dilday, (1986) ont montré que chez des hybrides hexaploïdes (*G. hirsutum* x *G. struttianum*)² ce caractère était le plus souvent partiellement dominant, mais qu'exceptionnellement il pouvait l'être totalement.

En croisant l'espèce *G. struttianum* avec des variétés de *G. hirsutum* de génomes GL₂GL₂GL₃GL₃, GL₂GL₂gl₃gl₃, gl₂gl₂GL₃GL₃ et gl₂gl₂gl₃gl₃, Zhu et Daofan, (2001) ont montré que le caractère « *glandless-seed* » de l'espèce australienne est récessif chez l'hybride obtenu avec le cotonnier glandulaire normal (GL₂GL₂GL₃GL₃) alors qu'il est récessif épistatique quand on utilise un cotonnier gl₂gl₂GL₃GL₃, dominant épistatique quand on emploie un cotonnier GL₂GL₂gl₃gl₃ et totalement dominant quand on utilise un cotonnier « *glandless* » gl₂gl₂gl₃gl₃. Par la suite, Zhu *et al.* (2004) ont démontré, après une analyse génétique réalisée sur la descendance de l'hybride trispécifique ABH [(*G. arboreum* x *G. bickii*)² x *G. hirsutum*], que le caractère inhibition de la synthèse du gossypol au niveau de la graine de *G. bickii* est contrôlé par un gène localisé au niveau du locus de GL₂, qu'ils ont temporairement nommé GL₂^b (b pour *Bickii*). Cet allèle GL₂^b, est dominant pour les allèles glandulaires GL₂ et gl₂ du cotonnier cultivé, mais est épistatique récessif par rapport à l'autre gène glandulaire GL₃. Ils en concluent que seules des plantes de *G. hirsutum* de génome Gl^b₂GL₂gl₃gl₃ ou Gl^b₂Gl^b₂gl₃gl₃ devraient exprimer le caractère « *glandless-seed and glanded-plant* ».

Se basant sur ces résultats, Chen *et al.* (2014) interprètent le fait qu'aucune des treize lignées monosomiques d'addition (LMA) de *G. australe* (génome G) dans *G. hirsutum* qu'ils ont isolées ne manifestent le caractère « *glandless-seed and glanded-plant* » par le fait que la variété de *G. hirsutum* utilisée pour créer les LMA étaient de génotype GL₂GL₂GL₃GL₃, alors

que, selon les résultats obtenus par Zhu *et al.* (2001), seules les LMA de génotypes $Gl^b_2GL_2GL_2gl_3gl_3$ ou $Gl^b_2gl_2gl_2gl_3gl_3$ pourraient exprimer ce dernier.

Nos données recourent les résultats obtenus par nos prédécesseurs. En effet, certaines des générations que nous avons étudiées, par exemple, celles issues de l'autofécondation de la BC2, ou du rétrocroisement avec la BC3S3 comme parent femelle, produisent des graines complètement « *glandless* » et des graines avec une extrême faible densité en glandes. Par contre, en backcross, lorsque le cotonnier cultivé est pris comme parent femelle, seule une expression partielle de l'inhibition de la synthèse du gossypol est observée chez une très faible proportion de plantes.

Les générations de rétrocroisement avec la BC3S3 comme parent femelle ont enregistré les pourcentages les plus élevés de graines à faible teneur en gossypol, même si l'action des gènes glandulaires majeurs apportés par *G. hirsutum* est encore prononcée. Ceci nous amène à dire que les facteurs répresseurs du caractère glandulaire se transmettent via l'ovule en même temps que le matériel génétique de *G. sturtianum* encore présent chez les descendants de HRS. Ainsi, le taux le plus élevé de graines à faible teneur en gossypol a été observé chez les graines BC3S4 et BC3S5. Cependant, c'est aussi au niveau de ces générations, que les taux les plus importants de graines perdues, respectivement 42 et 48%, ont été observés. Ceci conforte l'hypothèse d'une liaison étroite entre les facteurs responsables de l'inhibition de la synthèse de gossypol dans les graines et un ou plusieurs facteurs de létalité énoncée par Benbouza *et al.* (2009).

L'observation de graines très mal formées avec de forte teneur en gossypol indiquerait qu'en plus du ou des facteurs lié(s) à l'expression du caractère recherché, au moins un autre facteur non lié au caractère « *glandless-seed* » amené par *G. sturtianum* jouerait un rôle dans ces malformations et pertes de graines observées.

La réapparition de graines présentant une teneur en gossypol inférieure à 0,2 % au niveau de la descendance autofécondée ♂BC4S4 et de graines totalement « *glandless* » au niveau de la descendance autofécondée ♀BC4S4 confirmerait l'effet additif des facteurs qui contrôlent l'expression du caractère recherché : il est probable que lors de ces autofécondations, des allèles de *G. sturtianum* impliqués dans le contrôle du caractère recherché sont redevenus homozygotes.

6.5 Conclusion

Les résultats obtenus pour l'analyse de l'expression du caractère recherché au niveau des graines produites dans notre matériel d'étude nous amènent aux conclusions suivantes :

- (i) plusieurs gènes de *G. sturtianum* sont impliqués dans le contrôle du caractère;
- (ii) ces gènes se transmettent mieux via l'ovule, que par le pollen ;
- (iii) les allèles impliqués dans le contrôle du caractère semblent fonctionner selon des modes à la fois additif et épistatique complexes ;
- (iv) L'augmentation du fond génétique de *G. hirsutum* au niveau des générations les plus avancées sélectionnées dans la descendance de l'hybride HRS se traduit par une diminution de l'efficacité du caractère recherché ;
- (v) Il n'a pas été possible de produire un matériel qui exprime de manière stable le caractère « *glandless-seed and glanded-plant* », ce qui laisse supposer que les gènes liés à son expression sont associés à des facteurs de létalité qui empêchent leur fixation à l'état homozygote ;
- (vi) l'expression de l'inhibition de la formation de glandes chez une partie du matériel ♂BC4S4 (6 % des amandes ont une teneur en gossypol inférieure à 0,5 %) pourrait indiquer le passage chez ces plantes de gènes qui agissent également sur le caractère recherché ;
- (vii) les facteurs de létalité qui empêchent la fixation du caractère recherché peuvent être impliqués dans les problèmes de viabilité des graines observés dans toutes les générations analysées, mais ils ne sont pas nécessairement les seuls à ce niveau car ce problème touche également des graines dont les amandes présentent de fortes teneurs en gossypol.

7 EVALUATION AGRO-MORPHOLOGIQUE DE QUATRE GENERATIONS ISSUES DE L'HYBRIDE TRISPÉCIFIQUE HRS

7.1 Introduction

L'objectif de ce chapitre est de réaliser une caractérisation agro-morphologique de plantes appartenant à quatre générations différentes de la descendance de l'hybride HRS issues de plusieurs rétrocroisements et autofécondations successives, afin d'évaluer la conformité de celles-ci par rapport aux cotonniers cultivés de l'espèce *G. hirsutum*. Les plantes étudiées sont toutes issues d'une graine qui présentait au plus haut niveau le caractère d'inhibition de la synthèse du gossypol uniquement dans la graine. Le travail de caractérisation agro-morphologique réalisé sur la descendance de celles-ci doit donc permettre d'évaluer la nature des caractères sauvages encore associés au caractère recherché à ce stade du processus de sélection. Il doit aussi permettre d'évaluer l'importance des efforts qu'il reste à réaliser pour obtenir une variété agronomique de grandes cultures.

7.2 Matériel et méthodes

7.2.1 Caractéristiques du site d'expérimentation

Les observations ont été menées au Centre d'Application des Techniques d'Agriculture (CATA) de l'Ecole Nationale Supérieure d'Agriculture (ENSA) dans la région de Thiès au Sénégal, dont les caractéristiques ont été décrites dans le chapitre 4.

7.2.2 Matériel végétal

Les graines étudiées ont été produites à Gembloux Agro-Bio Tech dans les conditions décrites dans le chapitre 4 à l'exception du témoin STAM 42 qui est une variété cultivée au Sénégal. Le nombre de graines et de plantes étudiées pour chacune des générations caractérisées sont consignées dans le tableau 14.

- **Les graines sélectionnées** correspondent aux graines bien formées choisies pour l'étude après la scarification. Cette dernière permet d'éliminer les graines avortées et mal formées.
- **Les plantes analysées** correspondent aux plantes qui ont survécu après la levée et qui ont permis d'effectuer les observations et mesures.

- **La teneur moyenne en gossypol des plantes analysées** correspond à la moyenne de la teneur en gossypol des graines qui ont donné les plantes analysées pour chaque génération.

Tableau 14: Effectifs des graines sélectionnées, des plantes analysées et teneur en gossypol des plantes analysées

Génération	Nombre de graines sélectionnées	Nombre de plantes analysées	Teneur en gossypol moyenne des graines sélectionnées (%)	Ecart type	Année
BC2S6	61	39	0,39	0,17	2006
STAM F	10	10	Normal (> à 1)	-	
BC3S4	40	15	0,38	0,39	2007
♀BC4S3	69	16	0,73	0,39	
♂BC4S3	40	24	1,1	0,29	
STAM 42	12	10	Normal (> à 1)	-	

7.2.3 Conduite de l'étude

7.2.3.1 Germination et semis

La germination et le semis ont été précédés par une étape de sélection des graines à étudier (Chapitre 4). Pour se faire, après scarification, la teneur en gossypol de chaque graine est estimée selon la technique de quantification visuelle mise au point par Benbouza *et al.* (2002) décrite dans le chapitre 4.

Les graines ainsi sélectionnées, sont ensuite pré-germées dans des boîtes de Pétri à la température ambiante (environ 25°C) entre 24h et 48h. Les graines ayant germé sont d'abord semées dans de petits pots, puis après trois semaines, c'est-à-dire au stade quatre feuilles, les plantules sont repotées dans des pots de dix litres (10L) pour le reste du cycle.

7.2.3.2 Pratiques culturales

Selon Benbouza *et al.* (2009), les descendants de l'hybride HRS sont encore instables, les pratiques culturales ont été très rigoureuses, afin d'optimiser les chances d'obtention de plantes viables qui produisent des graines fertiles. Ainsi, du terreau fertilisé et stérilisé dont les propriétés physico-chimiques sont résumées dans le tableau 15 a été utilisé.

Au cours du repotage dans les pots de 10L, les 2/3 du substrat sont constitués par du terreau fertilisé et stérilisé et le 1/3 restant par du sable, pour améliorer les propriétés physiques du substrat.

Tableau 15: Propriétés physico chimiques du substrat de culture

Matières organiques	22%
Matières sèches	25% au minimum
Résistivité	600-1400hm.cm
P ^H (H ₂ O)	4.2-4.6
Capacité de rétention pour l'eau	750ml/L
Capacité de rétention pour l'air	200ml/L
N	30-240ml/L
P ₂ O ₅	25- 150ml/L dans l'acide citrique à 2%
P ₂ O ₅	20-150ml/L soluble dans l'eau
K ₂ O	50-300mg/L soluble dans l'eau
CaO	30-50mg/L soluble dans l'eau
S ₂ O	40-150mg/L soluble dans l'eau
Cl	5-40mg/L soluble dans l'eau

Une fertilisation a été appliquée 3 à 6 semaines après le semis pour compenser les exportations minérales de la plante et éviter les carences qui pourraient affecter la croissance et le développement des plantes au cours de cycle. Ainsi, l'engrais 14-23-14-5-1 à la dose de 2g par 10L d'eau, a été utilisé.

Les plantes ont été irriguées en fonction de la température ambiante et du stade phénologique. Ainsi, le substrat de culture est maintenu à la capacité au champ pour palier à tout déficit hydrique qui pourrait entraver la croissance et le développement des plantes.

Des traitements au fénitrothion et à l'imidachlopride à des doses respectives de 1ml/L d'eau et 1,4 ml/L d'eau ont été appliqués en alternance contre la mouche blanche, *Bemisia tabaci* Genn à la fréquence d'une fois par semaine, à partir du stade de préfloraison.

L'Abamectin communément appelé «Vertimec» à la dose de 0,5ml/L a été utilisé contre la mouche mineuse, *Liriomyza trifolii* Burgess en début de préfloraison et de capsulaison.

Afin de prévenir la chute des capsules chez les plantes testées, une solution d'hormones de croissance composée d'acide gibbérellique (50mg/L) et d'acide β naphtoxy-acétique (100mg/L) mise au point par Altman (1988), a été systématiquement appliquée. A cet effet, après fécondation, un tampon d'ouate de coton imbibé de la solution de régulateurs de

croissance est enroulé autour de l'ovaire. L'ensemble est alors recouvert d'un petit sachet en plastique durant 48 heures.

7.2.3.3 Observations et mesures

Les observations et les mesures ont débuté juste après le semis. Elles ont porté sur la morphologie des différents organes, la phénologie, la croissance et la production. Il s'agissait essentiellement de déterminer et d'évaluer :

- la durée des différentes phases phénologiques par l'observation des dates de levée, de préfloraison, de floraison et de maturation. Ces phases sont considérées comme atteintes lorsque plus de 50% des plantes d'une population sont à ce stade ;
- le port de la plante, la forme et la couleur des feuilles ;
- les paramètres de croissance : hauteur, diamètre des tiges, nombre de branches monopodiales, nombre de branches sympodiales, de boutons floraux et de fleurs ;
- les paramètres de production : nombre de capsules et de graines.

Les mesures ont été effectuées tous les dix jours au cours du cycle cultural, elles ont permis de suivre le rythme d'évolution des différents paramètres pour chaque génération.

7.2.4 Analyse des données

Les données ont fait l'objet d'une analyse de variance réalisée avec le logiciel MNITAB (version 17). Avec le logiciel XLSTAT (version 6.1.9), nous avons mis en évidence les liaisons entre variables par le calcul des corrélations totales. Puis, une analyse en composantes principales (ACP) a été effectuée sur l'ensemble des données pour identifier les paramètres qui permettent davantage une caractérisation agro-morphologique. De plus une classification ascendante hiérarchique (CAH) a été faite avec troncature de l'arbre hiérarchique à 0,20 de dissimilarité. Les contributions relatives des axes obtenus par combinaison des variables explicatives ont servi à choisir les axes à retenir. Ainsi, des groupes de géotypes semblables du point de vue agro-morphologique ont été constitués grâce à la troncature de l'arbre hiérarchique en maximisant la variance interclasse.

7.3 Résultats

7.3.1 Phénologie

7.3.1.1 Germination, levée et survie des plantes

La germination est observée en moyenne à partir du 2^{ième} jour après incubation en boîte de Pétri chez toutes les générations testées. Elle est supérieure à 50% pour l'ensemble des générations avec un taux minimal de 57% et un taux maximal de 100%. Cependant, les taux de levée et de plantes ayant survécu après la levée sont plus faibles. Ils varient respectivement de 29% à 90% pour la levée et de 26% à 90% pour la survie.

La figure 8 donne une appréciation des paramètres de germination, levée et nombre de plantes survivantes. Elle montre que les meilleurs taux ont été observés chez les cotonniers cultivés var STAM F et var STAM 42, qui ont un pourcentage de gossypol normal (>1). Ils sont ensuite suivis par la génération BC2S6 qui a une teneur en gossypol moyenne de 0,39%. Puis, viennent les plantes des générations ♂BC4S3 et ♀BC4S3 qui sont issues de graines présentant respectivement une teneur en gossypol de 1,1% et 0,73%. Les graines de la descendance BC3S4 avec la teneur en gossypol moyenne la plus faible (0,38%), ont montré les taux les plus faibles pour tous les paramètres observés.

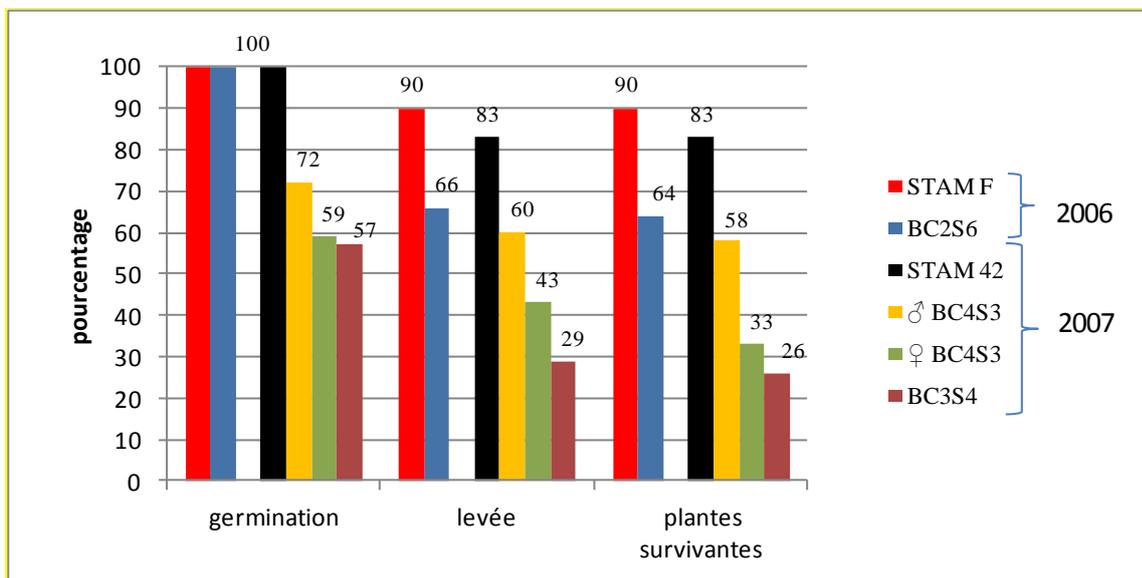


Figure 8: Pourcentage de germination de levée et de survie des descendance HRS testées

7.3.1.2 Croissance et développement des plantes

De grandes différences existent au sein et entre les populations de plantes analysées en ce qui concerne leur croissance et leur développement (Figure 9 et 10). Ces différences se répercutent sur l'estimation des nombres de jours avant l'atteinte d'un stade phénologique donné dans une population. Ce nombre correspond en effet au temps nécessaire pour que la moitié des plantes d'une population atteigne un stade phénologique donné. La figure 11 illustre le temps d'atteinte des différentes phénophases en fonction des jours après semis de toutes les générations caractérisées.



Figure 9: Aspect de 3 plantes BC3S3 65 jours après germination



Figure 10: Aspect de 4 plantes ♂BC4S3 à 50 jours après germination

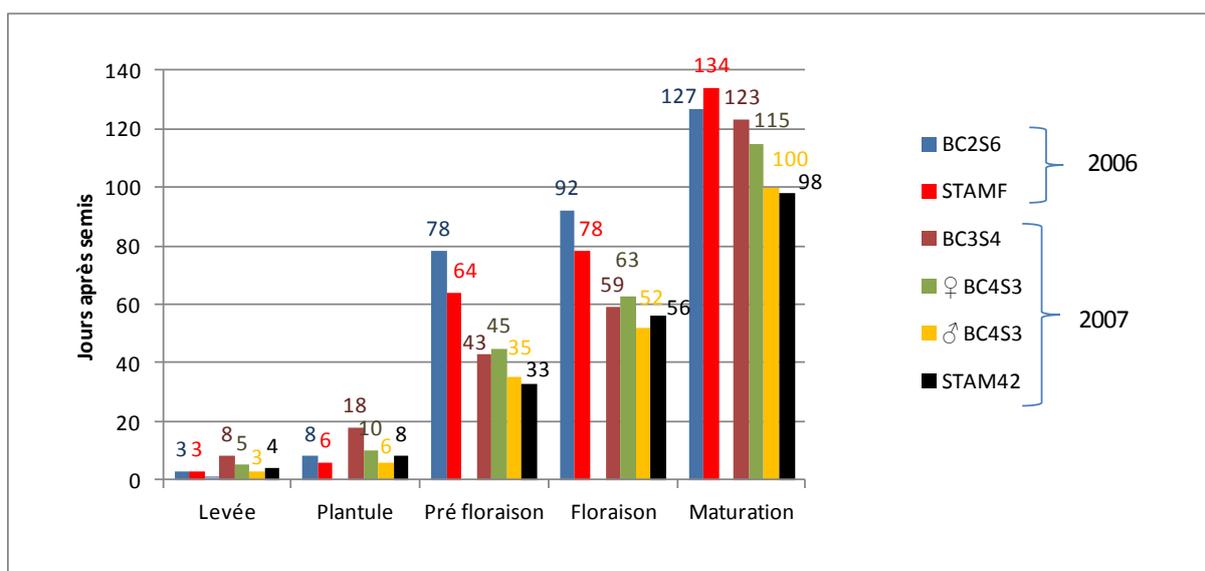


Figure 11: Evolution des différents stades phénologiques des générations étudiées en fonction des jours après semis

En 2006, le cotonnier cultivé var STAM F atteint beaucoup plus vite tous les stades phénologiques jusqu'à la phase de floraison. Cependant, les plantes BC2S6 atteignent la fin du cycle cultural en premier (Figure 11).

Quand aux plantes des générations BC3S4, ♂BC4S3 et ♀BC4S3 testées en 2007, elles semblent plus précoces que celles de la génération BC2S6. Les plantes de la variété STAM 42 et de la génération ♂BC4S3 se développent quasiment au même rythme et un peu plus rapidement que celles des autres générations testées en 2007, ces dernières atteignant le même stade de développement phénologique presque au même moment. Cependant, la grande différence d'évolution des deux variétés du cotonnier cultivé STAM F et STAM 42, testées sur deux années différentes pourrait indiquer une variation des conditions de croissance entre les années 2006 et 2007.

Ces résultats nous amène à dire que les génotypes qui ont les teneurs en gossypol les plus élevées, atteignent en moyenne plus rapidement les différents stades de développement.

7.3.2 La morphologie

L'étude de la morphologie des plantes testées se fait à deux niveaux ; une évaluation des caractères morphologiques qualitatifs, qui renseignent sur les formes, le port, les couleurs et une évaluation des caractères morphologiques quantitatifs qui renseignent sur la croissance des plantes.

7.3.2.1 Les caractères morphologiques qualitatifs

Au stade juvénile, toutes les plantules sont quasi identiques, les observations phénotypiques n'ont montré aucune différence morphologique marquante entre les plantules du cotonnier cultivé et les plantules issues de l'hybride HRS. Par contre, au stade adulte, des différences morphologiques marquées sont observées entre celles-ci.

L'observation phénotypique a montré un port érigé pour toutes les plantes, ce qui rappelle le port de *G. hirsutum*. Cependant, les plantes hybrides HRS, portent un nombre très important de branches végétatives. De plus, cet important développement de branches végétatives s'accompagne d'une forte densité du feuillage, dont l'ensemble donne parfois un aspect buissonnant aux plantes hybrides. Chez tous les hybrides, l'important développement des branches végétatives s'accompagne d'une forte densité du feuillage.

Les feuilles des plantes HRS sont comparables à celles du cotonnier cultivé ; elles sont de couleur vert-clair à vert-foncé avec des formes différentes selon le stade phénologique. Elles

sont entières au stade juvénile, mais deviennent lobées au stade adulte avec un nombre variant entre trois et cinq lobes. Elles sont cependant légèrement gaufrées comparées aux feuilles du cotonnier cultivé.

Les fleurs des plantes HRS présentent aussi un aspect similaire à celles du cotonnier cultivé. Elles sont de couleur jaune pâle et virent au rouge vineux 24 heures après leurs épanouissements. Puis, elles se fanent et la corolle tombe signe de la fécondation, libérant un jeune fruit à l'abri des bractées. Par contre, elles sont toujours de plus petite taille et ne s'épanouissent pas systématiquement comparées à celle du cotonnier cultivé. Une autre particularité des fleurs chez les plantes HRS, c'est une position du stigmate largement au dessus de la corolle. Cette caractéristique pourrait favoriser une augmentation du taux d'allogamie. De plus, *de visu*, les fleurs des plantes issues de l'hybride HRS produisent très peu ou pas de pollen.

Les capsules produites par les plantes issues de l'hybride HRS sont globulaires comme celles produites par les plantes témoins du cotonnier cultivé. Elles sont cependant de plus petite taille. De plus, le coton-graine produit par ces capsules laisse apparaître une boule de fibre généralement compacte, qui a moins tendance à s'épanouir en dehors des carpelles que le coton-graine contenu dans les capsules des plantes des variétés témoins.

Même si les plantes hybrides semblent morphologiquement s'approcher du cotonnier cultivé, les différences observées démontre l'existence d'un déséquilibre génétique encore important.

7.3.2.2 Les caractères morphologiques quantitatifs

Le suivi des caractères quantitatifs permet d'évaluer le rythme de la croissance des plantes en fonction des jours après semis (JAS). Les figures 12 à 23 mettent en évidence une même tendance d'évolution des plantes HRS par rapport aux plantes témoins (cotonnier cultivé) pour chaque paramètre étudié. Il ressort globalement que les plantes BC2S6 et ♂BC4S3 évoluent plus vite que les plantes des variétés témoins STAM F et STAM 42. Par contre, les plantes ♀BC4S3 et la BC3S3, évoluent généralement moins vite que celles de la variété STAM 42. Le test de Newman et Keuls au seuil de 5% montre que les différences observées entre les générations sont significatives.

Evolution de la croissance des géotypes testés en 2006

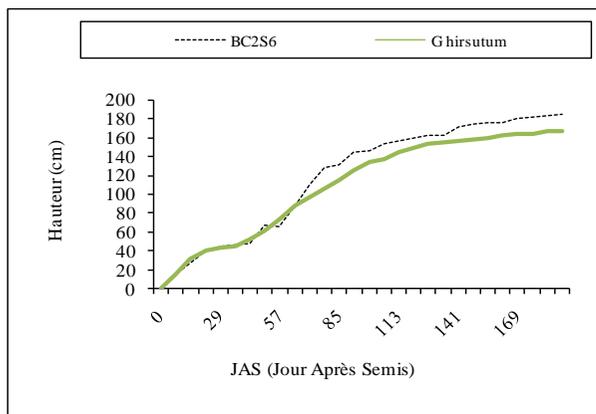


Figure 12: Croissance en hauteur

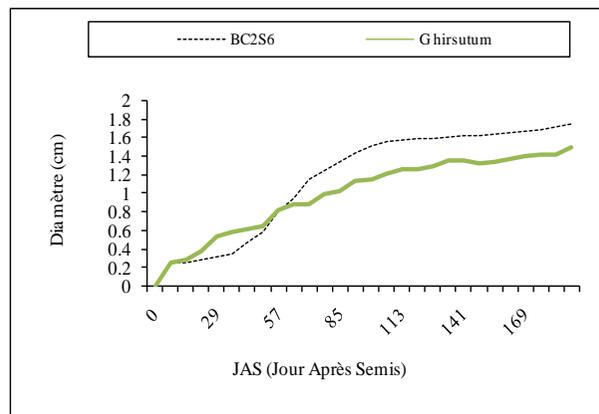


Figure 13: Croissance du diamètre de la tige principale

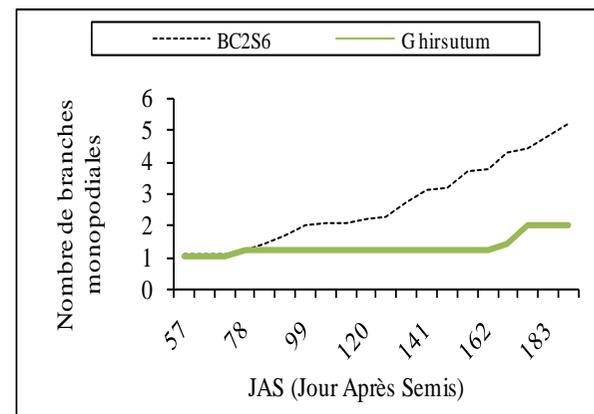


Figure 14: Rythme d'apparition des branches monopodiales

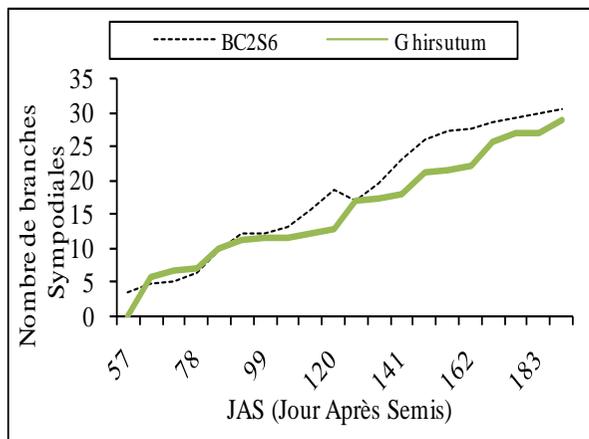


Figure 15: Rythme d'apparition des branches sympodiales

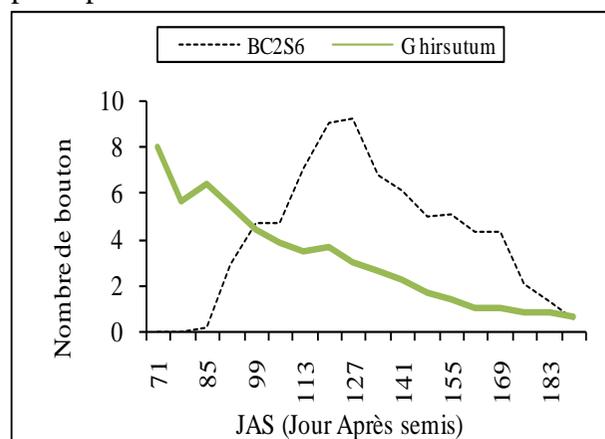


Figure 16: Rythme d'apparition des boutons floraux

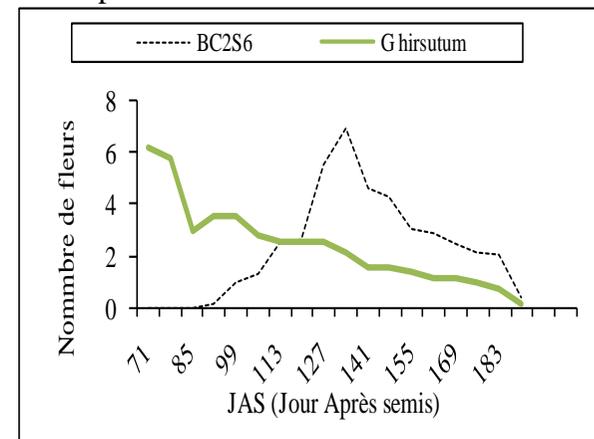


Figure 17 : Rythme d'apparition des fleurs

Evolution de la croissance des génotypes testés en 2007

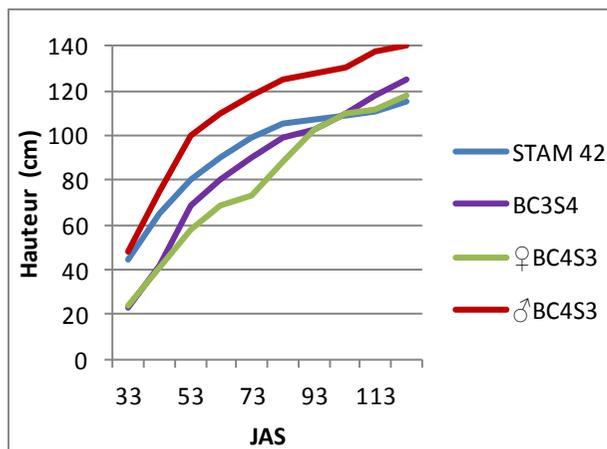


Figure 18: Croissance en hauteur

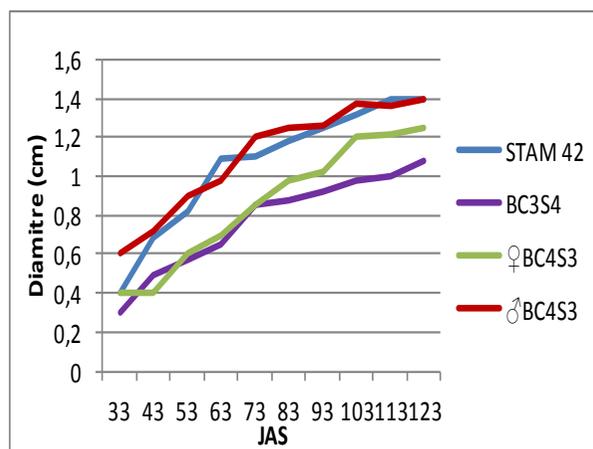


Figure 19: Croissance du diamètre de la tige principale

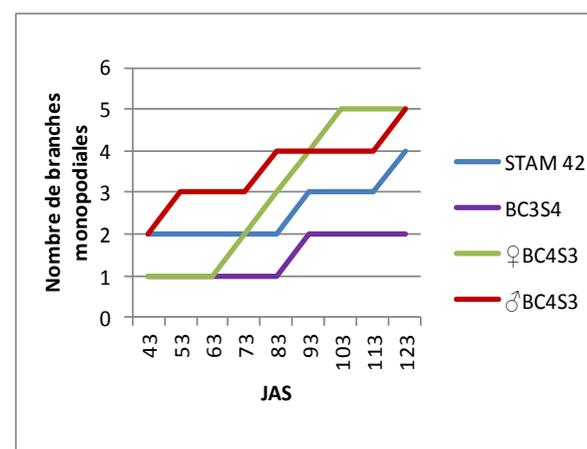


Figure 20: Rythme d'apparition des branches monopodiales

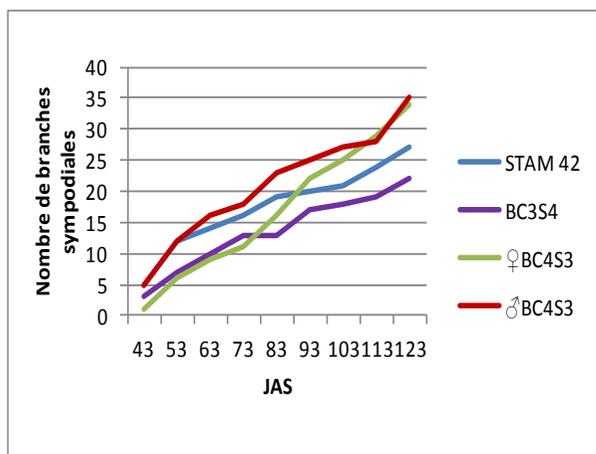


Figure 21: Rythme d'apparition des branches sympodiales

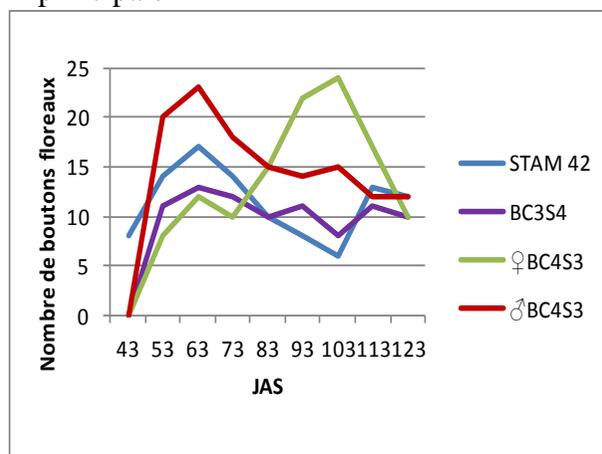


Figure 22: Rythme d'apparition des boutons floraux

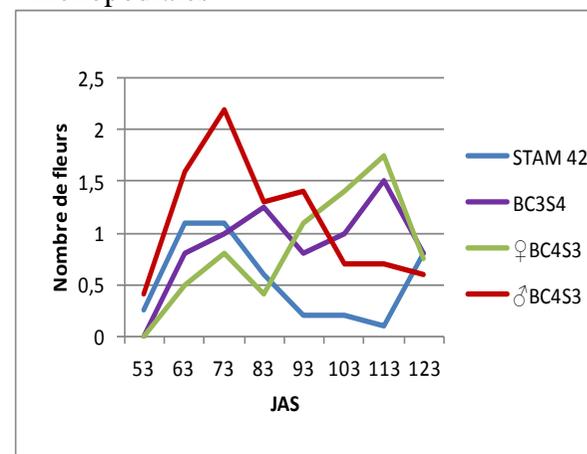


Figure 23: Rythme d'apparition des fleurs

7.3.3 Evaluation de la production des plantes HRS testées

L'analyse du niveau de production des plantes HRS se fait à deux niveaux : la proportion de plantes stériles et les nombres de capsules et de graines produites par plante (Tableau 16). Les comptages réalisés pour ces paramètres ont été répartis en trois groupes correspondant à des intervalles de teneur en gossypol des graines dans le but de déterminer s'il existe un lien entre cette teneur et la fertilité des plantes. Les intervalles de teneur en gossypol des graines considérés sont les suivants :

- C1 = [0,001-0,2%] = correspond aux plantes qui ont des teneurs faibles en gossypol
- C2 = [0,21-0,50%] = correspond aux plantes qui ont des teneurs moyennes en gossypol
- C3 = [0,51-1,50%] = correspond aux plantes qui ont des teneurs élevées en gossypol

Il est important de rappeler que toutes les capsules des plantes HRS ont reçu un traitement d'hormones de croissance pour optimiser leur production, ce qui peut biaiser les résultats. Mais, malgré cela, les données obtenues montrent que la production du cotonnier cultivée var STAM 42 cultivée au Sénégal en 2007, dépasse largement celle des plantes HRS. Par contre les résultats de la variété cultivée STAM F dont les graines avaient été produites à Gembloux sont anormalement basses. Cependant, comme les plantes de la génération BC2S6 testées en même temps que la STAM F en 2006 semblent suivre la même tendance, on suppose que ces résultats sont dus à une variabilité des conditions climatiques entre 2006 et 2007 ou à un manque d'adaptation des plantes de cette variété aux conditions de culture.

Tableau 16: Evaluation de la fertilité des plantes analysées par génération et en fonction de la teneur en gossypol

Teneur en gossypol*	Nbre plantes (%)	Nbre plantes stériles (%)	Nbre Plantes récoltées (%)	Total capsules récoltées	Total graines récoltées	Nbr moy capsule/plante récoltée	Nbr moy graines/plante récoltée	Nbr moy graines/capsule
BC2S6								
0,001-0,2%	6 (15)	1 (17)	5 (83)	38	330	7,6	66	8,7
0,21-0,50%	22 (56)	0	22 (100)	203	1826	9,2	83	9
0,51-1,50%	11 (28)	0	11 (100)	62	423	5,6	38,5	6,8
Total / Moy	39	1 (3)	38 (97)	303	2579	8	67,9	8,5
BC3S4								
0,001-0,2%	6 (43)	2 (33)	4 (67)	73	607	18,3	151,8	8,3
0,21-0,50%	5 (36)	1 (20)	4 (80)	112	731	28	182,8	6,5
0,51-1,50%	3 (21)	0	3 (100)	27	293	9	97,7	10,9
Total / Moy	14	3 (21)	11 (79)	212	1631	19,3	148,3	7,7
♀BC4S3								
0,001-0,2%	3 (13)	1 (33)	2 (67)	20	164	10	82	8,2
0,21-0,50%	5 (21)	0	5 (100)	127	730	25,4	146	5,7
0,51-1,50%	16 (67)	1 (6)	15 (94)	310	2493	20,7	166,2	8
Total / Moy	24.0	2 (8)	22 (92)	457	3387	20,8	154	7,4
♂BC4S3								
0,21-0,50%	1 (6)	0	1 (100)	53	345	53	345	6,5
0,51-1,50%	15 (94)	0	15 (100)	400	4996	26,7	333,1	12,5
Total / Moy	16.0	0	16 (100)	453	5341	28,3	333,8	11,8
STAM 42								
Normal	10	0	10 (100)	215	4636	21,5	463,6	21,6
STAM F								
Normal	9	0	9(100)	81	948	9	105,3	11,7

7.3.3.1 La productivité des différentes générations

Une analyse de la variance nous a permis d'observer des différences très hautement significatives entre les générations pour tous les paramètres étudiés.

La production de capsules est très hétérogène, les résultats montrent qu'à l'exception des données concernant les plantes BC3S4 et STAM F qui ne sont pas significativement différentes, chaque génération produit un nombre de capsules par plante récoltée qui est significativement différent de l'autre. Ainsi selon l'ordre décroissant, les plantes ♂BC4S3(28,3) produisent le plus de capsules, elles sont suivies par celle de la variété STAM

42 (21,5), puis par les plantes ♀BC4S3 (20,8), ensuite viennent les plantes BC3S4 (19,3) et celles de la variété STAM F (9) et enfin nous avons les plantes BC2S6 (8) qui produisent le nombre de capsules le plus faible (Tableau 16).

Néanmoins, malgré les nombres importants de capsules produites par certaines générations, les résultats montrent uniquement, deux (2) groupes significativement différents pour la production de graines par plante récoltée (Tableau 16). Le premier groupe est composé des plantes ♂BC4S3 (333,8 graines/plante) et de la variété STAM 42 (463,6 graines/plante) avec le plus grand nombre de graines produit par plante, et le second regroupe, rassemble, les plantes de toutes les autres générations étudiées. Cela prouve que la production de graines par capsule chez les descendants de l'hybride HRS comparés ici n'a pas suivi la même logique que la production de capsules. On en déduit que le taux de remplissage en coton graines, des capsules obtenues avec l'hormone de croissance chez ces descendances de HRS est très faible.

Ainsi, de manière croissante, on observe une production moyenne de graines par capsules chez les plantes HRS de 7,4 chez ♀BC4S3, 7,7 chez la BC3S4, 8,5 chez BC2S6 et 11,8 chez ♂BC4S3 (Tableau 16). A côté, les deux variétés de cotonnier cultivé, utilisées comme témoins, ont produit en moyenne respectivement : 21,6 graines par capsule pour la STAM 42 et la moitié (11,7 graines par capsule) pour la STAM F. Malgré une production plus importante ou quasi identique en capsules des plantes HRS étudiées, le cotonnier cultivé STAM 42 a produit beaucoup plus de graines par plante.

Une analyse de la production en fonction de la teneur en gossypol des plantes mère montre que la production des plantes ayant une faible teneur en gossypol (C1) est moins importante que celle des plantes à forte teneur en gossypol (C3), à l'exception de la génération BC3S4. Cette dernière, dont les plantes fertiles à forte teneur en gossypol ont donné moins de capsules et de graines que les plantes à faible teneur en gossypol (Tableau 16), montre que le caractère recherché peut être lié aux facteurs qui affectent la productivité, mais que cette liaison est complexe.

En conclusion, ces résultats indiquent que :

- les plantes ♂BC4S3 et le cotonnier cultivé var STAM 42 avec des teneurs en gossypol élevés, présentent des niveaux de production de capsules et de graines par plante qui sont comparables;

- le taux de remplissage des capsules est faible pour les plantes des générations BC3S4, BC2S6 et la ♀BC4S3 qui conservent sans doute encore de nombreux gènes de l'espèce *G. sturtianum* ;
- les facteurs qui affectent la productivité sont probablement liés au caractère recherché, mais une analyse plus poussée est nécessaire pour confirmer ce résultat.

7.3.3.2 La productivité intra-génération

A l'intérieur des générations, l'analyse de la variance a permis de voir que chez :

- **la BC2S6**, les trois classes de pourcentage en gossypol sont significativement différentes. Ainsi, les plantes de la classe 2 ont produit plus de capsules et de graines par plante suivies de celles de la C1 puis de la C3 ;
- **la BC3S4 et la ♀BC4S3**, il n'existe pas de différence entre les moyennes des paramètres comparés pour les plantes appartenant aux trois classes de pourcentage en gossypol; quel que soit leurs teneurs en gossypol, les plantes produisent les mêmes quantités de capsules et de graines ;
- **la ♂BC4S3**, qui ne comporte pas de plantes à faible teneur en gossypol (C1), une différence significative existe entre les moyennes mesurées chez les plantes de la classe 2 (qui ont produit plus de capsules et de graines) et celle de la classe 3.

En conclusion, ces résultats permettent de dire que pour la production :

- les plantes hybrides ont des comportements différents quelle que soit la teneur en gossypol ;
- les plantes BC3S4 et ♀BC4S3 avec les teneurs en gossypol les plus faibles semblent être plus déséquilibrées et ont une production homogène quelle que soit la teneur en gossypol des plantes ;
- les plantes qui ont des teneurs en gossypol moyennes (C2) ont une production plus importante en capsules et en graines.

7.3.3.3 La stérilité

Toutes les générations HRS étudiées présentent des individus qui sont stériles, excepté la ♂BC4S3 qui est comparable aux variétés de cotonniers cultivés testés avec 100% de plantes fertiles (Tableau 10). Selon les générations, le taux de stérilité observé est variable ; le plus élevé (21%) a été observé chez les descendances BC3S4 et le plus faible (3%) a été observé

chez les plantes de la BC2S6. En ce qui concerne la descendance ♀BC4S3, un taux de stérilité de 8% a été observé.

L'analyse de la stérilité en fonction des classes de teneur en gossypol montre que les plantes qui ont des faibles teneurs en gossypol (C1), présentent les taux de stérilité les plus importants (entre 17% et 33%) (Tableau 10).

Néanmoins, chez les plantes à forte teneur en gossypol, c'est uniquement dans la génération ♀BC4S3 qu'on a observé des individus stériles (6%). Ce constat confirme encore la présence de facteurs d'instabilités non liés au caractère « *glandless-seed and glanded-plant* ».

7.3.4 Associations des paramètres

Le calcul des coefficients de corrélation entre les paramètres mesurés a permis d'établir une matrice de corrélation (Tableau 18) qui révèle que :

- les taux de germination, de levée et de plantes survivantes sont fortement liés ; une augmentation de l'un s'accompagne forcément d'une augmentation des autres;
- le durée nécessaire pour atteindre le stade levée présente une corrélation positive significative avec la durée nécessaire pour atteindre le stade plantule, par contre plus tôt le stade levée est atteint, moins le diamètre au collet est important ;
- Les temps nécessaires pour atteindre les stades préfloraison et floraison présentent une corrélation positive significative entre eux et avec le nombre de fleurs. Par contre, plus vite les plantes atteignent ces phénophases, moins elles produisent de boutons floraux et de capsules ;
- Le temps nécessaire pour atteindre le stade de maturation présente une corrélation négative significative avec les nombres moyens par plante de branches sympodiales, de boutons floraux, de capsules et de graines. Plus la maturation est précoce, moins les nombres moyens observés pour ces variables sont élevés;
- L'augmentation de la hauteur des plantes est positivement, fortement liée à celui du diamètre et à l'augmentation de la production de fleurs ;
- L'augmentation du nombre de branches monopodiales est positivement liée à celui des branches sympodiales, ainsi qu'à celui du nombre de boutons floraux et de capsules ;
- L'augmentation du nombre de bouton floraux est de manière significative négativement corrélée au nombre de fleurs : plus il y a de bouton moins il y a de

fleurs ; ce qui pourrait signifier qu'il existe un avortement précoce des organes floraux chez les plantes les plus déséquilibrées qui se traduit par la production continue de nouveaux boutons floraux car peu des fleurs et donc de capsules sont produites par plante.

- La teneur en gossypol n'est corrélée significativement à aucune variable ; cependant, à titre indicatif la matrice de corrélation donne une idée des tendances qui existent pour les relations entre la teneur en gossypol et les paramètres agro-morphologiques étudiés (Tableau 17). Ces corrélations mettent en évidence, que plus la teneur en gossypol est élevée, plus les plantes HRS semblent équilibrées.

Tableau 17: Tendances observées pour les relations non significatives entre la teneur en gossypol et les paramètres agro morphologiques étudiés

	Corrélation positive	Corrélation négative
Teneur en gossypol	Plus la teneur en gossypol est élevée, plus est important : <ul style="list-style-type: none"> ➤ le taux de germination, de levée et de plantes survivantes ; ➤ la production des plantes ; ➤ la croissance des plantes. 	Plus la teneur en gossypol est élevée, plus: <ul style="list-style-type: none"> ➤ le nombre de fleurs produit diminue. ➤ Les phases phénologiques sont longues.

Tableau 18: Matrice de corrélation

TG	1																	
TL	0,913	1																
TPS	0,924	0,994	1															
SL	-0,712	-0,792	-0,761	1														
SP	-0,646	-0,801	-0,761	0,979	1													
SPF	0,476	0,245	0,237	-0,341	-0,189	1												
SF	0,552	0,308	0,296	-0,374	-0,224	0,990	1											
SM	0,134	-0,006	-0,004	0,095	0,190	0,818	0,766	1										
H	0,701	0,580	0,606	-0,728	-0,594	0,723	0,706	0,384	1									
Ø	0,642	0,575	0,578	-0,886	-0,790	0,422	0,439	-0,097	0,851	1								
NBM	-0,224	-0,114	-0,155	-0,348	-0,397	-0,439	-0,417	-0,768	-0,130	0,384	1							
NBS	-0,335	-0,150	-0,165	-0,138	-0,234	-0,762	-0,749	-0,926	-0,336	0,153	0,904	1						
NBF	-0,646	-0,455	-0,473	0,283	0,155	-0,897	-0,895	-0,832	-0,708	-0,300	0,719	0,894	1					
NF	0,464	0,370	0,376	-0,506	-0,386	0,879	0,826	0,752	0,869	0,553	-0,380	-0,617	-0,833	1				
NC	-0,412	-0,184	-0,188	0,003	-0,116	-0,881	-0,881	-0,917	-0,444	-0,015	0,777	0,970	0,930	-0,690	1			
NG	0,168	0,326	0,339	-0,200	-0,301	-0,762	-0,692	-0,915	-0,256	0,124	0,514	0,736	0,611	-0,659	0,767	1		
%G	0,444	0,101	0,108	-0,347	-0,160	0,784	0,811	0,356	0,661	0,618	-0,006	-0,351	-0,573	0,564	-0,543	-0,417	1	
	TG	TL	TPS	SL	SP	SPF	SF	SM	H	Ø	NBM	NBS	NBF	NF	NC	NG	%G	

Les valeurs en gras sont significativement différentes de 0 à un niveau de signification $\alpha=0,05$

TG=Taux de germination ; TL=Taux de levée ; TPS= Taux de plantes survivantes ; SL= Stade levée ; SP= Stade plantule ; SPF= Stade pré floraison ; SF= Stade floraison ; SM= Stade maturation ; H= Hauteur ; Ø ; NBM= Nombre de branches monopodiales ; NBS= Nombre de branches sympodiales ; NBF= Nombre de boutons floraux ; NF= Nombre de fleurs ; NC= Nombre de capsules ; NG= Nombre de graines ; %G=Teneur en gossypol

7.3.5 Stratification de la variabilité des générations testées (ACP)

Une partie de la variabilité des générations étudiées a été décrite ici, grâce à l'analyse en composantes principales (ACP). Les deux premières composantes de l'ACP expliquant 84,49% de l'information ont été retenues (Figure 24). Le tableau 19 représente, le cosinus carrés des variables qui permet d'évaluer la précision du positionnement des paramètres étudiés sur les 5 premiers axes factoriels. Un paramètre est bien représenté, si son cosinus carré qui doit tendre vers 1, est $\geq 0,5$.

La première composante explique 49,65% de l'information (Figure 24). Elle est liée aux variables taux de germination, durées pour atteindre les stades de préfloraison, de floraison et de maturation, nombre de branches sympodiales par plante, nombre de boutons floraux, de fleurs et de capsules par plante (Tableau 19). L'axe deux qui explique 34,85% de l'information est plus lié aux variables : taux de levée, taux de plantes survivantes, durées pour atteindre les stades levée et plantule, mais aussi au diamètre, au nombre de branches monopodiales, au nombre de graines et enfin à la teneur en gossypol des plantes.

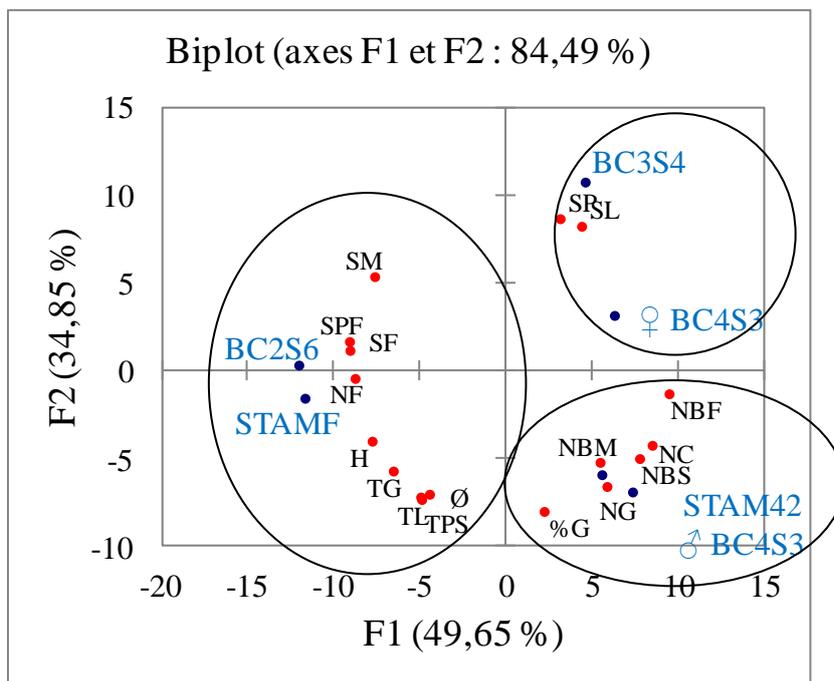


Figure 24: Représentation des variables et des génotypes selon les axes 1 et 2

TG=Taux de germination ; TL=Taux de levée ; TPS= Taux de plantes survivantes ; SL= Nombre de jours jusqu'au Stade levée ; SP= Nombre de jours jusqu'au Stade plantule ; SPF= Nombre de jours jusqu'au Stade pré floraison ; SF= Nombre de jours jusqu'au Stade floraison ; SM= Nombre de jours jusqu'au Stade maturation ; H= Hauteur (cm) ; Ø; NBM= Nombre de branches monopodiales ; NBS= Nombre de branches sympodiales ; NBF= Nombre de boutons floraux ; NF= Nombre de fleurs ; NC= Nombre de capsules ; NG= Nombre de graines ; %G=Teneur en gossypol

Tableau 19: Cosinus carrés des variables

	F1	F2	F3	F4	F5
TG	0,459	0,344	0,100	0,097	0,001
TL	0,257	0,568	0,169	0,000	0,006
TPS	0,263	0,546	0,190	0,000	0,001
SL	0,204	0,725	0,047	0,008	0,015
SP	0,104	0,803	0,018	0,040	0,035
SPF	0,884	0,030	0,069	0,004	0,012
SF	0,878	0,015	0,045	0,025	0,036
SM	0,622	0,309	0,000	0,068	0,000
H	0,647	0,169	0,074	0,002	0,108
Ø	0,212	0,522	0,209	0,033	0,024
NBM	0,316	0,286	0,354	0,006	0,037
NBS	0,639	0,263	0,097	0,000	0,001
NBF	0,953	0,018	0,024	0,003	0,003
NF	0,822	0,002	0,075	0,069	0,033
MC	0,765	0,189	0,021	0,006	0,019
MG	0,364	0,458	0,104	0,067	0,007
%G	0,051	0,678	0,073	0,198	0,000

TG=Taux de germination ; TL=Taux de levée; TPS= Taux de plantes survivantes ; SL= Nombre de jours jusqu'au Stade levée;SP= Nombre de jours jusqu'au Stade plantule; SPF= Nombre de jours jusqu'au Stade pré floraison; SF= Nombre de jours jusqu'au Stade floraison; SM= Nombre de jours jusqu'au Stade maturation; H= Hauteur ; Ø; NBM= Nombre de branches monopodiales ; NBS= Nombre de branches sympodiales; NBF= Nombre de boutons floraux; NF= Nombre de fleurs; NC= Nombre de capsules; NG= Nombre de graines; %G=Teneur en gossypol

7.3.6 La classification ascendante

La classification ascendante suivie de la troncature de l'arbre hiérarchique à 0,20 de dissimilarité, vient compléter, la variabilité des générations étudiées. Elle a permis la constitution de 3 groupes (Figure 25). Le premier est constitué du cotonnier cultivé var STAM 42 et la ♂BC4S3, le second regroupe la BC3S4 et la ♀BC4S3 et le troisième groupe est constitué de la BC2S6 et du cotonnier cultivé var STAM F.

Les caractéristiques agro-morphologiques de la génération ♂BC4S3 sont comparables à celles de la variété cultivée STAM 42, alors que les générations BC3S4 et ♀BC4S3 se retrouvent dans le même groupe, parce qu'elles sont comparables, mais elles ont des caractéristiques différentes de celles des variétés cultivées analysées et de la BC2S6.

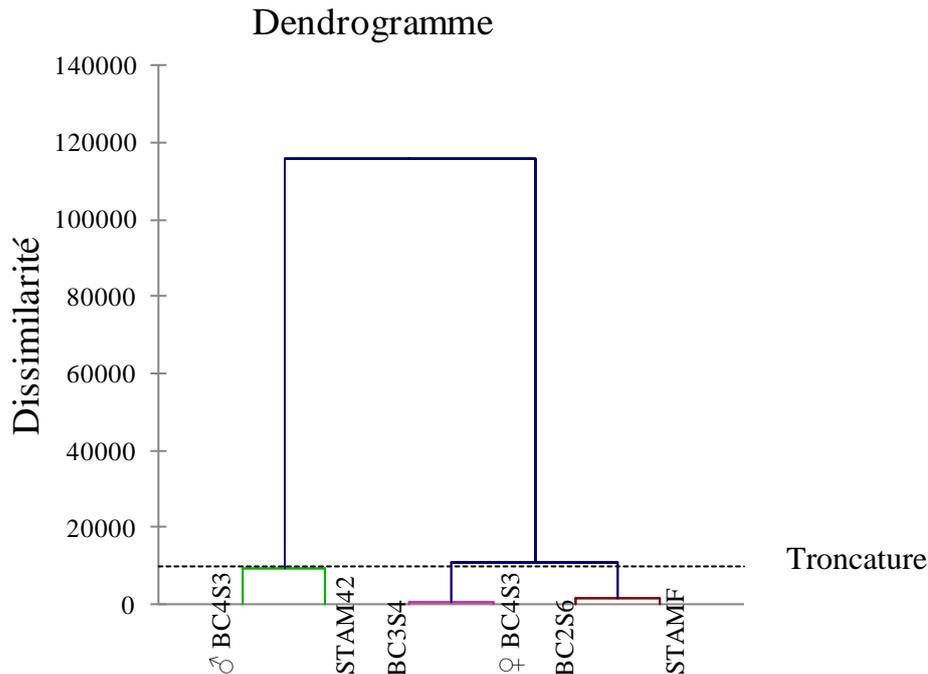


Figure 25: Classification hiérarchique ascendante des différentes générations

7.4 Discussion

7.4.1 Caractérisation agro morphologique des hybrides HRS

La comparaison entre les différentes générations de HRS testées avec le cotonnier cultivé a révélé des différences de comportement à un stade précoce, dès la germination. En effet, des taux de germination et de survie plus élevés ont été constatés chez le cotonnier cultivé var STAM 42 par rapport aux hybrides HRS testés. A cela s'ajoute d'importantes différences au niveau des rythmes de croissance, mais plus encore au niveau de la fertilité des plantes. Ces différences chez les hybrides HRS se constatent depuis le matériel végétal de départ qui produisait une grande proportion de graines vides et mal-formées (entre 8 et 48%) pour toutes les générations étudiées. Mais aussi les différences se constatent sur les graines survivantes, qui ont dans l'ensemble, une capacité germinative qui varie, avec un minimum de 57% chez la BC3S4 et un maximum de 72% chez la ♂BC4S3, comparées aux variétés de cotonnier cultivé qui sont à 100% de germination. Des observations similaires ont déjà été faites par Benbouza (2004), qui a révélé que la majorité des graines qui exprimaient totalement ou partiellement le caractère « *glandless* » étaient chétives et/ou mal formées avec des proportions dépassant parfois 50% de germination. De plus, chez les plantes HRS, les graines qui ont levé ont donné naissance à des plantes généralement chétives et mal formées.

Le taux de survie après la levée, qui varie de 26 à 64% selon les génotypes, est de 100% pour le cotonnier cultivé dans les mêmes conditions. Ces résultats montrent que la mortalité des plantes hybrides est liée à des facteurs qui leurs sont intrinsèques.

Jusqu'à la floraison, aucune différence significative concernant l'atteinte des différentes phases phénologiques de toutes les plantes testées n'est constatée. A partir de la floraison, les plantes HRS évoluent moins vite que le cotonnier cultivé, ce qui allonge le cycle cultural chez celles-ci, comparé au cotonnier cultivé. En outre, une grande variabilité d'évolution est observée durant les différentes phénophases, certaines plantes HRS se développent plus rapidement que d'autres. Cependant, le cycle de l'ensemble des plantes testées (hybrides et témoins) est précoce par rapport à ce qui est mentionné dans la littérature (Parry, 1982).

Toutes les fleurs des plantes HRS ont la particularité d'avoir leurs stigmates situés largement au-dessus des anthères. Le cotonnier étant une plante autogame avec 30% d'allogamie, cette anomalie est susceptible d'augmenter le taux d'allogamie. Cependant, le suivi de la production à travers le rendement en capsules et en coton-graine montre que la majorité des plantes hybrides sont fertiles, même si le nombre de graines qu'elles produisent est encore loin de celui du cotonnier cultivé var STAM 42. Par ailleurs, exceptionnellement, les plantes HRS ont produit beaucoup de capsules (Tableau 16), ceci est probablement dû à l'hormone de croissance utilisée pour empêcher la chute des capsules. Cependant, l'instabilité des plantes a fait que le taux de remplissage en graines de ces capsules est très faible comparé au cotonnier cultivé. On observe également un taux de shedding (chutte) très important des boutons floraux, ce qui peut s'interpréter comme un signe de déséquilibre génétique au niveau des méioses qui se produisent à ce stade de développement des organes génératifs. D'après la littérature, une capsule peut produire entre 20 et 60 graines et une plante peut donner jusqu'à 50 capsules en moyenne par cycle (Parry, 1982). Même les cotonniers cultivés utilisés comme témoins dans notre étude n'ont pas atteint ces performances. Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait que les plantes étudiées ont évolué dans des pots qui constituent une contrainte pour le développement racinaire des cotonniers. En effet, la partie souterraine du cotonnier se caractérise par un système racinaire de type pivotant formé d'une racine principale ou pivot d'où partent des ramifications latérales se terminant par une zone pilifère (Parry, 1982). Dans des conditions de température et d'humidité favorables, les racines se développent très rapidement autour du pivot, qui peut aller jusqu'à trois mètres de profondeur (Parry, 1982). Cette croissance racinaire est aussi liée à la nature du sol (Parry, 1982; Caillot *et al.* 1982).

D'après Carmi et Shalhevet (1982), c'est la colonisation du sol par les racines qui détermine la productivité du cotonnier. En effet, des racines latérales et superficielles se développent, si la croissance de la racine principale est arrêtée par un obstacle (comme dans un seau), ce qui rend le cotonnier sensible aux variations d'humidité, (Benedict, 1984).

En ce qui concerne la teneur en gossypol des plantes constitutives des générations qui ont servi à réaliser cette étude, la ♂BC4S3 et les deux (2) variétés de cotonnier cultivées ont les teneurs en gossypol les plus élevées ($\geq 1\%$), suivies par celles de la ♀BC4S3 et enfin celles de la BC3S4 et de la BC2S6 qui ont les teneurs en gossypol les plus faibles. Force est de constater que la classification ascendante hiérarchique des différentes générations en fonction de tous les paramètres étudiés, suit pratiquement l'ordre préétabli par les teneurs moyens en gossypol des générations étudiées. C'est-à-dire que les différentes générations de HRS semblent se regrouper en fonction de la teneur en gossypol.

Les générations à forte teneur en gossypol (♂BC4S3, STAM 42) ont le taux de plantes survivantes le plus élevé (58%) (Figure 8) et une plus grande fertilité. A l'opposé, les générations BC3S4 et ♀BC4S3 qui expriment le caractère ont les taux de plantes survivantes les plus faibles avec respectivement 26 et 35% (Figure 8), et sont moins fertiles. Enfin, les plantes de la génération BC2S6 ont un taux de 64% de plantes survivantes, sont moins fertiles et expriment le caractère plus que les BC3S4 et ♀BC4S3.

7.4.2 L'instabilité observée chez HRS et sa relation avec la teneur en gossypol des plantes

L'instabilité observée est commune à toutes les générations hybrides testées. Le constat se fait essentiellement :

- à la germination : la graine peut ne pas germer, même si elle semble bien formée ;
- au semis : la graine peut germer mais meurt après le semis (fonte de semis) ;
- à la levée : la jeune plantule peut présenter des nécroses et mourir ;
- à la reproduction : la plante peut être stérile malgré une bonne évolution morphologique. De plus, les plantes issues de graines à faible teneur en gossypol ont tendance à être moins fertiles que celles provenant de graines à teneur en gossypol moyenne ou élevée.
- à la récolte : le constat se fait lors de la scarification des graines récoltées avec l'observation de graines vides et de graines très mal formées.

La germination et la levée sont les moments les plus sensibles, donc ceux où les pertes sont plus importantes. La proportion de plantes stériles, parmi celles qui ont été obtenues est plus faible que celle des graines qui ne donnent pas de plantes adultes, mais elle est plus élevée chez les plantes issues de graines présentant une plus faible teneur en gossypol. Ces symptômes ont été signalés lors de la mise en culture *in vitro* de la descendance BC2S3 de l'hybride HRS par Benbouza (2004). Si le même constat est fait au niveau de générations plus avancées en BC2S6 et en BC4S3, cela veut dire que cette caractéristique est sélectionnée en même temps que le caractère « *glandless-seed* ». Selon Harushima et al. (1996), les gènes de stérilité chez les hybrides sont la cause de l'avortement des gamètes et des zygotes, ce qui est en accord avec nos résultats.

D'après Benbouza *et al.* (2009), toute cette instabilité serait causée par un ou des fragments de chromosomes de *G. sturtianum*, qui seraient étroitement liés aux gènes contribuant à la diminution de la teneur en gossypol chez les hybrides HRS. Un tel phénomène est observé dans les descendances de tous les hybrides interspécifiques. Le nombre de générations de rétrocroisement nécessaire pour retourner vers des formes morphologiquement équilibrées est plus ou moins important en fonction de la distance génétique qui sépare les parents de l'hybride interspécifique et des linkats qui existent entre les caractères d'intérêt faisant l'objet du programme de sélection et des caractères rédhibitoires apportés par le parent sauvage. De manière générale, nos résultats confortent l'hypothèse de Benbouza, parce que c'est au niveau des graines à faible teneur en gossypol, que les pertes les plus importantes sont observées.

Cependant, l'analyse de la production de graines en fonction de la teneur en gossypol des plantes, montre des plantes de la génération BC3S4 issues de graines à faible teneur en gossypol qui sont plus fertiles que les plantes issues de graines à forte teneur en gossypol. Ce constat sème le doute sur l'étroite liaison qui existerait entre le caractère recherché et les facteurs qui affectent la productivité. En outre, un contre-exemple est fourni par des plantes stériles, issues de graines à forte teneur en gossypol. Cette observation conforte l'hypothèse formulée au niveau du chapitre 6, après observation de graines à forte teneur en gossypol mal formées. Ainsi, l'instabilité chez les plantes HRS étudiées, n'est pas forcément liée à l'expression du caractère recherché. Ce constat est consolidé par les résultats des calculs de corrélation (Tableau 17 et 18) qui ne montrent pas de liaisons significatives entre la teneur en gossypol et les différents paramètres agro-morphologiques.

Les résultats obtenus peuvent également indiquer une transmission préférentielle de plusieurs facteurs d'instabilité chez les plantes HRS indépendamment des facteurs de réduction de la teneur en gossypol.

Pour comprendre ces phénomènes, il est nécessaire de revenir sur les espèces qui ont contribué à la création de l'hybride HRS. En effet, le cotonnier cultivé appartient au génome AD alors que l'espèce donneuse du caractère appartient au génome C du pool génétique tertiaire du cotonnier. Ce dernier, se trouve être le pool le plus difficile à exploiter pour introgresser des caractères chez l'espèce cultivée. Le pool tertiaire regroupe les espèces de cotonniers dont les chromosomes présentent l'homéologie la plus faible envers ceux des deux sous-génomes constitutifs de l'espèce cultivée (Stewart 1995) et donc le taux de recombinaison le plus bas avec ceux-ci. Dans ce contexte, certains gènes, chromosomes ou fragments de chromosomes, qu'ils soient utiles ou non, peuvent être transmis au détriment d'autres dans un génome (Doolittle *et al.* 1980; Orgel *et al.* 1980). Ces éléments qui se transmettent systématiquement à la descendance peuvent être la cause de l'instabilité de l'hybride HRS.

A notre connaissance, aucune étude approfondie sur les relations existant entre la teneur en gossypol des cotonniers et les paramètres agro-morphologiques n'a encore été réalisée. Les seules études effectuées concernent les cotonniers « *glandless* ». Pour ceux-ci, il a été signalé des baisses de rendement et des retards de croissance dus aux attaques de ravageurs (Zagbaï *et al.* 2008). Chez le cotonnier cultivé la production glandulaire est un phénomène complexe indépendant des paramètres agro-morphologiques. Selon Pauly, (1979), elle est contrôlée par six (6) *loci* indépendants qui interviennent à des niveaux différents. Parmi ceux-ci, les *loci* GL₂ et la GL₃ sont ceux qui influencent le plus l'expression du caractère au niveau de la graine.

7.5 Conclusion

A ce stade avancé de la sélection des plantes HRS exprimant le caractère « *glanded-plant and glandless-seed* », les cotonniers de la génération ♂BC4S3 qui n'expriment pas ce caractère sont les plus proches des cotonniers cultivés. Les anomalies agro-morphologiques combinées à la mortalité et la stérilité des plantes, en plus de l'avortement et la mal-formation des graines, montrent la forte présence de facteurs indésirables provenant de l'espèce sauvage *G. sturtianum*. Les résultats ont montré que l'instabilité qui est plus observée chez les plantes qui

expriment le caractère « *glandless-seed* », se constate aussi chez les plantes issues de graines à forte teneur en gossypol. Cette instabilité semble donc être causée par la présence de plusieurs facteurs dont au moins un est plus ou moins liés au caractère recherché. Par ailleurs, le degré de liaison entre l'expression du caractère et un des facteurs liés à l'instabilité est à vérifier. En effet, en plus d'avoir observé des plantes exprimant le caractère recherché, qui produisent plus que les plantes à forte teneur en gossypol, aucune liaison significative n'a été trouvée entre la teneur en gossypol des graines et les paramètres agro-morphologiques étudiés. Par contre, les résultats ont bien fait ressortir, une transmission via l'ovule chez les plantes HRS, des facteurs liés à l'expression du caractère recherché et à l'instabilité observée. Ces constats semblent mettre en évidence une transmission préférentielle en même temps que les allèles de *G. sturtianum*, des facteurs d'instabilité, avec ou sans expression du caractère « *glandless-seed* ». Cette transmission préférentielle se traduirait au niveau génétique par une distorsion de ségrégation.

8 SUIVI DE L'INTROGRESSION DE *G. STURTIANUM* CHEZ L'HYBRIDE HRS AU MOYEN DE MARQUEURS MICRO-SATELLITES

Une partie des résultats du chapitre 8 a fait l'objet d'une publication.

Diouf F.B.H., Benbouza H., Nacoulima L.N., Ndir K.N., Konan O., Mergeai G. (2014). Segregation distortions in interspecific cotton populations issued from the HRS triple species hybrid [*G. hirsutum* x *G. raimondii*]² x *G. sturtianum*]. *Tropicultura*. **32** (2), 73-79

Abstracts:

The segregation ratio of 10 *Gossypium sturtianum* specific SSR markers belonging to linkage groups c2-c14, c3-c17, and c6-c25 was analysed in the BC2S6 progeny of the [*G. hirsutum* x *G. raimondii*]² x *G. sturtianum*] (HRS) hybrid; based on chi-square test. All the marker *loci* tested were associated with skewed allele frequencies ($P < 0.001$) showing a strong SD with a zygotic selection. The possible causes and consequences of this massive segregation distortion are discussed.

Keys words: Segregation Distortion (SD), cotton, interspecific hybrid, SSR, mapping, zygotic selection

8.1 Introduction

Les résultats présentés dans les chapitres précédents mettent en évidence une instabilité génétique marquée des plantes HRS bien qu'elles soient issues de la réalisation d'au moins deux générations de rétrocroisements avec des variétés commerciales de *G. hirsutum*. L'emploi de marqueurs moléculaires de l'ADN provenant des cartes génétiques existantes du génome de *G. hirsutum* est un outil permettant de suivre la présence, dans les générations avancées issues de l'hybride HRS, d'allèles spécifiques de l'espèce sauvage donneuse du caractère « *glangless-seed* » recherché. Les marqueurs devraient permettre de mieux comprendre les mécanismes génétiques qui sous-tendent l'instabilité des plantes et l'expression du caractère recherché. Cet outil est employé pour réaliser :

- un suivi de l'introgession des fragments de *G. sturtianum*;
- une analyse du phénomène de distorsion de ségrégation chez les descendants de l'hybride HRS dont l'existence peut être supposée sur base des résultats des observations morphologiques;
- une analyse du déterminisme génétique de l'inhibition de la synthèse du gossypol dans la graine.

8.2 Matériel et méthodes

8.2.1 Matériel Végétal

Le matériel analysé concerne les descendances BC2S5 (9 individus), BC2S6 (78 individus), BC3S4 (138 individus), ♀BC4S3 (35 individus), ♂BC4S3 (33 individus) de l'hybride HRS repris dans les tableaux 5 et 6 (Chapitre 5) pour lesquelles il est mentionné qu'une analyse des graines au moyen de marqueurs moléculaires a été réalisée. La figure 3 (Chapitre 5) donne la généalogie de l'ensemble des plantes mères dont sont issues les populations analysées au moyen de marqueurs SSR. Sauf dans le cas de la BC2S5, où les graines étudiées provenaient de deux plantes, chaque population d'individus analysée provenait d'une seule plante. Toutes les plantes mères étaient euploïdes et hétérozygotes pour les dix couples d'allèles SSRs au niveau desquels un allèle spécifique de *G. sturtianum* est conservé.

8.2.2 Caractéristiques du site d'expérimentation

Toutes les graines à l'origine des plantes analysées ont été produites dans les serres tropicales de l'Université de Liège Gembloux Agro-Bio Tech / Belgique dont les caractéristiques ont été décrites dans le chapitre 5.

8.2.3 Extraction de l'ADN génomique total

8.2.3.1 Extraction de l'ADN à partir de jeunes feuilles

Le protocole d'extraction utilisé est la méthode CTAB (céthylméthyl d'ammonium de bromure), améliorée par Benbouza *et al.* (2006a). Cette opération comporte trois phases : une extraction de l'ADN des compartiments cellulaires, sa séparation des autres constituants cellulaires et sa précipitation.

Les jeunes feuilles récoltées sur les plantes issues des graines semées ont été broyées dans de l'azote liquide. Le détail du protocole d'extraction est donné dans l'annexe 1.

8.2.3.2 Quantification de l'ADN

L'ADN extrait (6µl, avec 3µl de bleu de bromophénol) est quantifié par électrophorèse en gel d'agarose (0.6 à 1%) en présence Sybr Safe. Le marqueur de poids moléculaire utilisé est le Smart Ladder de 200 à 10 000 pb (PROMEGA).

8.2.4 Analyse de la descendance des hybrides HRS par les marqueurs microsatellites

8.2.4.1 Choix des marqueurs microsatellites

Les séquences des couples d'amorces SSRs, développées au Brookhaven National Laboratory « BNL » et au CIRAD « CIR », ont été obtenues respectivement à partir de la base de données "Cotton DB" et via le CIRAD. Le tableau 20 donne les dix marqueurs SSRs utilisés dans l'analyse génétique ; ils sont localisés sur les groupes de liaison c2-c14, c3-c17 et c6-c25. Ces 10 SSRs ont été ciblés parce que Benbouza *et al.* (2009) ont trouvé qu'ils mettent en évidence des allèles de *G. sturtianum* qui se sont conservés chez les générations de HRS jusqu'à la BC2S5 et la BC3S4. Ces auteurs ont aussi montré la liaison de certains de ces SSRs avec le caractère « *glandles-seed* » qui est recherché.

Tableau 20: Liste des marqueurs utilisés et leur localisation chromosomique

Amorces utilisées	chromosomes
BNL3590	C2
BNL3971	C2
BNL2443b	C3
BNL226b	C3
BNL3989	C3
CIR058	C3
CIR228a	C3
BNL3359	C6
BNL3436	C25
BNL1153	C25

8.2.4.2 Amplification des microsatellites par PCR

La PCR permet d'amplifier des segments d'ADN, préalablement ciblés par des *primers* ou amorces à séquence déterminée. Les étapes sont :

1. la dénaturation de l'ADN à 92 - 95°C : séparation des 2 brins de la molécule.
2. l'hybridation des amorces (à 40-60°C en fonction des séquences des amorces), qui viennent adhérer aux zones qui leur sont complémentaires.
3. l'élongation asymétrique ou amplification par l'enzyme Taq-polymérase à 72°C : elle constitue un brin complémentaire à partir des amorces qui sont venues s'hybrider aux brins d'ADN. Ainsi, en un cycle, on obtient deux brins complémentaires de la molécule d'ADN (par la gauche, et par la droite). Le segment d'ADN est partiellement doublé au cours des deux premiers cycles, totalement ensuite. Le cycle peut se répéter autant de fois que souhaité (généralement 30 à 45 fois).

L'amplification des SSRs a été réalisée suivant le protocole décrit par Liu et al. (2000). Chaque réaction a un volume total de 10 µl, contenant : 20 ng d'ADN, 1 µl 10x PCR Buffer [100 mM Tris-HCL, pH 9 et 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂], 2,5-3,5 mM MgCl₂ (suivant l'amorce utilisée), 0,2 mM de chaque dNTP, 0,15 µM de chaque amorce, (sens-antisens) 0,4 unités de Taq DNA Polymérase. Les différents cycles de températures pour les réactions PCR ont été réalisés sur un Thermocycleur PTC-200. L'amplification des séquences consiste en une période de dénaturation initiale de l'ADN et d'activation de la Taq polymérase à 95°C entre 4 et 5 minutes de 40 cycles d'amplification. Chaque cycle comprend une dénaturation (étape 1) à 93°C pendant 15 s, une hybridation (étape 2) à 55°C pendant 30 s et une

élongation (étape 3) de 1 min à 72°C. Après 40 cycles une élongation finale à 72°C a été appliquée durant 6 min.

8.2.4.3 Dénaturation du produit de l'amplification

La dénaturation des produits de l'amplification après PCR, se fait comme suit ; 10 µl de solution stop (10 mM NaOH, 95% Formamide et 0,05 % de Bleu de Bromophénol) sont rajoutés aux produits d'amplification avant une incubation de 2 min à 92°C.

8.2.5 Electrophorèse et révélation au nitrate d'argent

Les produits amplifiés sont visualisés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide et révélés par une coloration au nitrate d'argent. Cinq (5) µl du produit de l'amplification PCR sont déposés dans chaque puits d'un gel d'acrylamide. L'électrophorèse est effectuée sur des cuves de séquences Hoefer SQTM Sequencer R (Voltage: 1680 V, I: 40mA et W: 80 W), avec un tampon de TBE 1x.

La révélation a été effectuée selon la méthode décrite par Benbouza *et al.* (2006b). La composition des différentes solutions est donnée dans l'annexe 2. Le gel ainsi coloré est par la suite séché pendant plusieurs heures avant d'être lu sous une lumière blanche et photographié.

8.2.6 Traitement des données

8.2.6.1 Analyse statistique : Minitab et Excel

Le logiciel Minitab ver. 17 et Excel (2007) ver 5.0 ont été utilisés pour l'analyse simple marqueur.

8.2.6.2 Analyse de la distorsion de ségrégation

Tous les SSRs testés sont des marqueurs co-dominants. La ségrégation de ces marqueurs a été analysée par un test χ^2 pour déterminer l'existence d'un biais en se basant sur les fréquences attendues selon les lois de Mendel.

D'abord, il est procédé à l'analyse de la ségrégation des fréquences génotypiques : (i) selon un ratio de 1:2:1 pour les plantes issues d'autofécondation, qui ont été étudiés comme des F2 intercross et (ii) selon un rapport de 1:1 pour des hétérozygotes croisés avec des homozygotes (pour les croisements, ce ratio n'est pas affecté en faveur de l'un des parents lorsqu'on est en présence d'une sélection gamétique) (Zhao *et al.* 2006; Wu *et al.* 2007; Zhongxu *et al.* 2009, Castro *et al.* 2011). Lorsque la fréquence génotypique est biaisée, il est ensuite procédé à l'analyse des fréquences alléliques sur les SSRs biaisés, dans le but de connaître l'origine de

la distorsion de ségrégation (Li *et al.* 2007). D'après Lorieux *et al.* (1995 a, b), une DS peut être due soit à une : (i) sélection gamétique ; dans ce cas, la distorsion est la conséquence d'un déroulement anormal de la méiose. Les gamétophytes sont alors moins viables ou moins fertiles (ii) sélection zygotique ; ici, ce sont les individus d'un groupe qui se révèlent être moins viables. La distorsion est dans ce cas généralement due à un remaniement structural chromosomique. Ainsi, le calcul du χ^2 sur la fréquence $p = q$ informe sur une influence gamétique et le calcul du χ^2 sur la fréquence $p^2 : 2pq : q^2$, informe sur une influence zygotique de la distorsion de ségrégation (Zhao *et al.* 2006 ; Li *et al.* 2007). Les facteurs de DS qui agissent lors de la formation des gamètes ne peuvent changer qu'indirectement les ratios génotypiques des zygotes, en altérant les ratios des gamètes. Par contre, les facteurs de DS qui s'expriment après la fécondation affectent directement les ratios génotypiques du zygote (Lorieux *et al.* 1995 a,b ; Song *et al.* 2006, Castro *et al.* 2011).

Le coefficient de distorsion (ou déviation) d est calculé comme suit $d = 1/2 - f(B)$, avec $f(B)$ étant la fréquence des allèles de l'espèce exotique (*G. sturtianum*) (Poncet *et al.* 2002).

8.3 Résultats

8.3.1 Suivi de l'introgession de *G. sturtianum* et analyse de la distorsion de ségrégation au moyen des 10 marqueurs moléculaires

8.3.1.1 Suivi de l'introgession de *G. sturtianum* et analyse de la distorsion de ségrégation des marqueurs SSRs chez les populations BC2S5 et BC2S6

La grande majorité des plantes BC2S5 et BC2S6 analysées ont conservé tous les allèles de *G. sturtianum* présents chez leur parent (Tableau 21 et 22). Les résultats révèlent un fort taux d'hétérozygotie chez ces deux populations. La BC2S5 et la BC2S6 ont respectivement 12 et 6% de leurs individus qui ont perdu l'allèle de *G. sturtianum* sur le chromosome 2, au niveau du locus BNL226b (Tableau 21 et 22). Par contre, tous les autres individus sont hétérozygotes à 100% pour les neuf (9) autres SSRs. A ce nombre très élevé d'hétérozygotes s'ajoute le fait que l'on n'observe aucun individu homozygote *G. sturtianum*. Cette ségrégation est différente de la distribution de fréquence théorique attendue.

La fréquence de la ségrégation génotypique a été analysée selon les fréquences attendues (1:2:1) en utilisant le test de chi carré (Tableau 21 et 22). Les résultats montrent une distorsion de ségrégation significative ($P < 0,001$) pour les dix marqueurs testés. Tous sont biaisés en faveur du génotype hétérozygote, aussi bien pour la population BC2S5, que pour la BC2S6. La seule exception est le marqueur SSR BNL226b sur le chromosome 2 qui n'est pas biaisé au niveau de la population BC2S5.

Les pourcentages présentés dans les tableaux 21 et 22 sont calculés à partir du nombre réel d'individus analysés après avoir enlevé les données manquantes.

Tableau 21: Suivi de l'introgession de *G. sturtianum* et analyse de la distorsion de la ségrégation des marqueurs SSRs transférés dans la population BC2S5

Chromosome	Marqueurs SSR	Distance génétique (cM)	Homozygote <i>G. hirsutum</i> (%)	Hétérozygote (%)	Homozygote <i>G. sturtianum</i> (%)	Khi2	Génotype favorisé
C2	BNL3590	27,8	0	8(100)	0	8*	HS
	BNL3971	84,3	0	9(100)	0	9*	HS
C3	BNL2443b	25,4	0	9(100)	0	9*	HS
	CIR058	39,7	0	9(100)	0	9*	HS
	BNL226b	67,6	1(12)	7(88)	0	4,75	HS
	BNL3989	90,5	0	9(100)	0	9*	HS
	CIR228a	137,3	0	9(100)	0	9*	HS
C6	BNL3359b	0	0	9(100)	0	9*	HS
C25	BNL3436	26,6	0	9(100)	0	9*	HS
	BNL1153	69,3	0	9(100)	0	9*	HS

Niveau de signification *P<0,05 ; **P< 0,01

(%) = Pourcentage

Tableau 23: Analyse de la fréquence allélique des SSRs biaisés dans la population BC2S5

Chromosomes	Marqueurs SSR	Distance génétique (cM)	Fréquence des gènes		X ²		d=1/2-f(B)	Allèle Favorisé
			p	q	p2:2pq:q2	p=q		
C2	BNL3590	27,8	0,50	0,50	8*	0	0	-
	BNL3971	84,3	0,50	0,50	9*	0	0	-
C3	BNL2443b	25,4	0,50	0,50	9*	0	0	-
	CIR058	39,7	0,50	0,50	9*	0	0	-
	BNL3989	90,5	0,50	0,50	9*	0	0	-
	CIR228a	137,3	0,50	0,50	9*	0	0	-
	C6	BNL3359b	0	0,50	0,50	9*	0	0
C25	BNL3436	26,6	0,50	0,50	9*	0	0	-
	BNL1153	69,3	0,50	0,50	9*	0	0	-

Niveau de signification *P<0,05 ; **P< 0,01

(%) = Pourcentage

Tableau 22: Suivi de l'introgession de *G. sturtianum* et analyse de la distorsion de la ségrégation des marqueurs SSRs transférés dans la population BC2S6

Chromosome	Marqueurs SSR	Distance génétique (cM)	Homozygote <i>G. hirsutum</i> (%)	Hétérozygote (%)	Homozygote <i>G. sturtianum</i>	Khi2	Génotype favorisé
C2	BNL3590	27,8	0	76(100)	0	76**	HS
	BNL3971	84,3	0	78(100)	0	78**	HS
C3	BNL2443b	25,4	0	74(100)	0	74**	HS
	CIR058	39,7	0	70(100)	0	70**	HS
	BNL226b	67,6	5(6)	72(94)	0	58,95**	HS
	BNL3989	90,5	0	76(100)	0	76**	HS
	CIR228a	137,3	0	72(100)	0	72**	HS
C6	BNL3359b	0	0	77(100)	0	77**	HS
C25	BNL3436	26,6	0	78(100)	0	78**	HS
	BNL1153	69,3	0	78(100)	0	78**	HS

Niveau de signification *P<0,05 ; **P< 0,01

(%) = Pourcentage

Tableau 24: Analyse de la fréquence allélique des SSRs biaisés dans la population BC2S6

Chromosome	Marqueurs SSR	Distance génétique (cM)	Fréquence des gènes		X ²		d=1/2-f(B)	Allèle Favorisé
			p	q	p2:2pq:q2	p=q		
C2	BNL3590	27,8	0,5	0,5	76**	0	0	-
	BNL3971	84,3	0,50	0,50	78**	0	0	-
C3	BNL2443b	25,4	0,50	0,50	74**	0	0	-
	CIR058	39,7	0,50	0,50	70**	0	0	-
	BNL226b	67,6	0,53	0,47	59,36**	0,65	0,03	H
	BNL3989	90,5	0,50	0,50	76**	0	0	-
	CIR228a	137,3	0,50	0,50	72**	0	0	-
C6	BNL3359b	0	0,50	0,50	77**	0	0	-
C25	BNL3436	26,6	0,50	0,50	78**	0	0	-
	BNL1153	69,3	0,50	0,50	78**	0	0	-

Niveau de signification *P<0,05 ; **P< 0,01

(%) = Pourcentage

8.3.1.2 Fréquence allélique des SSRs biaisés chez les populations BC2S5 et BC2S6

Les résultats du calcul de la fréquence allélique ($p = q$) et de la distribution des différentes fréquences génotypiques ($p^2 : 2pq : q^2$) dans les populations BC2S5 et BC2S6 ont été analysés pour les SSRs biaisés, afin de connaître l'origine (gamétiques ou zygotiques) de la distorsion de ségrégation (Tableau 23 et 24).

Le constat est le même aussi bien pour la population BC2S5 que pour la population BC2S6 : la fréquence génotypique de tous les SSRs est biaisée alors que la fréquence allélique est normale. Ces résultats indiquent que la distorsion de ségrégation se passe principalement au niveau zygotique. Cependant, aucun des allèles parentaux n'est favorisé à l'exception du BNL226b qui est décalé vers l'allèle du parent cultivé chez la BC2S6 (Tableau 23 et 24).

8.3.1.3 Suivi de l'introgession de *G. sturtianum* et analyse de la distorsion de ségrégation des marqueurs SSRs chez les populations BC3S4, ♂BC4S3 et la ♀BC4S3

Chez les descendances BC3S4, ♂BC4S3 et la ♀BC4S3, les résultats montrent que la grande majorité des plantes analysées avaient aussi conservé tous les allèles SSRs spécifiques de *G. sturtianum* présents chez leur parent HRS.

Les tableaux 25, 26 et 27 montrent l'amplification des marqueurs SSRs des allèles conservés de *G. sturtianums* chez les descendances BC3S4, ♂BC4S3 et ♀BC4S3.

Les pourcentages sont calculés à partir du nombre réel d'individus analysés après avoir enlevé les données manquantes.

Descendances BC3S4

Lors de l'autofécondation qui a conduit à la souche BC3S4, le transfert des allèles spécifiques de *G. sturtianum* peut se faire par l'ovule et par le pollen.

Tous les 10 SSRs ont montré que les allèles de *G. sturtianum* sont conservés dans la population BC3S4 analysée (Tableaux 25). Il ressort que la majorité des plantes est hétérozygote avec des taux compris entre 51 et 99%.

Le taux d'hétérozygotie le plus faible (51 %) est observé sur le groupe de liaison c2-c14, au niveau du SSR BNL 3971, et les taux les plus élevés (98 et 99%) sont observés sur les trois (3) SSRs du groupe de liaison c6-c25. On constate aussi que des SSRs ne présentent pas d'homozygotes *G. sturtianum* au niveau des trois (3) groupes de liaison ciblés c2-c14 (BNL3971), c3-c17 (BNL3989, CIR228a) et c6-c25 (BNL1153).

Cependant, pour les SSRs qui présentent des homozygotes *G. sturtianum*, les taux restent faibles dans l'ensemble et varient de 1 à 12%.

Ainsi, avec 1% d'homozygotes *G. sturtianum* observé au niveau des SSRs BNL3590, BNL3359b et BNL3436, les groupes de liaison c2-c14 et c6-c25 montrent les taux les plus faibles. Ils sont suivis du groupe de liaison c3-c17 où les taux d'homozygotes *G. sturtianum* les plus élevés sont observés : 3, 8 et 12% respectivement au niveau des BNL2443b, BNL226b, et CIR058.

Il faut cependant noter que le taux d'homozygotes *G. sturtianum* est beaucoup plus faible par rapport au taux d'homozygotes *G. hirsutum*, qui varie pour sa part de 2% à 49%.

Des trois groupes de liaison analysés avec les 10 SSRs, le c6-c25 se distingue parce qu'on n'y observe pratiquement pas d'homozygotes *G. hirsutum*, à l'exception de 2% de ses individus au niveau du BNL 1153.

Ces résultats mettent ainsi en évidence au niveau de la population BC3S4 une ségrégation qui qui n'est pas conforme à celle qui est attendue. Ainsi, l'analyse des fréquences génotypiques fait avec le test khi2, montre que tous les SSRs sont biaisés en faveur du génotype hétérozygote, dans la population BC3S4 (Tableau 25).

Tableau 25: Suivi de l'introgression de *G. sturtianum* et analyse de la distorsion de la ségrégation des marqueurs SSRs transférés dans la population BC3S4

Chromosome	Marqueurs SSRs	Distance génétique (cM)	Homozygote <i>G. hirsutum</i> (%)	Hétérozygote (%)	Homozygote <i>G. sturtianum</i> (%)	Khi2	Génotype favorisé
C2	BNL3590	27,8	22(16)	108(83)	1(1)	61,89**	HS
	BNL3971	84,3	66(49)	70(51)	0	64,18**	HS
C3	BNL2443b	25,4	11(9)	114(88)	4(3)	76,74**	HS
	CIR058	39,7	23(18)	89(70)	15(12)	21,49**	HS
	BNL226b	67,6	14(11)	105(81)	10(8)	51,11**	HS
	BNL3989	90,5	17(13)	118(87)	0	79,84**	HS
	CIR228a	137,3	14(10)	122(90)	0	88,65**	HS
C6	BNL3359b	0	0	132(99)	2(1)	126,18**	HS
C25	BNL3436	26,6	0	134(99)	1(1)	131,04**	HS
	BNL1153	69,3	3(2)	129(98)	0	120,41**	HS

Niveau de signification *P<0,05 ; **P< 0,01
(%) = Pourcentage

Descendances ♀ BC4S3

Dans ce cas, le transfert des marqueurs SSRs de *G. sturtianum* ne peut se faire que par l'ovule.

Tous les 10 SSRs ont montré que les allèles de *G. sturtianum* sont conservés dans la population ♀BC4S3 analysée (Tableaux 26). Les résultats mettent en évidence deux tendances. Un premier groupe de *loci* en ségrégation qui présente sensiblement autant d'individus homozygotes *G. hirsutum* (entre 40 et 57%) que d'individus hétérozygotes (entre 43 et 60%) au niveau des groupes de liaison c2-c14 et c3-c17, à l'exception du CIR058 et du CIR228. Ensuite un deuxième groupe qui est constitué d'individus à 100% hétérozygotes pour les 2 marqueurs CIR058 et le CIR228 du groupe de liaison c3-c17 et pour l'ensemble des marqueurs localisés sur le c6-c25.

Le test khi2 effectué sur les marqueurs SSRs, montre une ségrégation normale des SSRs localisés sur les groupes de liaison c2-c14 et c3-c17 sauf le CIR058 et le CIR228a qui sont biaisés. En plus de ces deux SSRs, ceux localisés sur le c6-c25 sont aussi biaisés en faveur du génotype hétérozygote (Tableau 26).

Tableau 26: Suivi de l'introgession de *G. sturtianum* et analyse de la distorsion de la ségrégation des marqueurs SSRs transférés dans la population ♀ BC4S3

Chromosomes	Marqueurs SSRs	Distance génétique (cM)	Homozygote <i>G. hirsutum</i> (%)	Hétérozygote (%)	Khi2	Génotype favorisé
C2	BNL3590	27,8	20(57)	15(43)	0,71	-
	BNL3971	84,3	20(57)	15(43)	0,71	-
C3	BNL2443b	25,4	16(46)	19(54)	0,26	-
	CIR058	39,7	0	35(100)	35**	HS
	BNL226b	67,6	14(40)	21(60)	1,4	-
	BNL3989	90,5	18(51)	17(49)	0,03	-
	CIR228a	137,3	0	35(100)	35**	HS
C6	BNL3359b	0	0	35(100)	35**	HS
C25	BNL3436	26,6	0	35(100)	35**	HS
	BNL1153	69,3	0	35(100)	35**	HS

Niveau de signification *P<0,05 ; **P< 0,01
(%) = Pourcentage

Descendance ♂ BC4S3

Dans ce cas, le transfert des marqueurs SSRs de *G. sturtianum* ne peut se faire que par le pollen.

Tous les 10 SSRs ont montré que les allèles de *G. sturtianum* sont conservés dans la population ♂BC4S3 analysées (Tableaux 27). Les résultats mettent en évidence une ségrégation qui ne semble pas conforme avec ce qui était attendu, au niveau de tous les *loci* dans la descendance de ♂BC4S3 (Tableau 27). En effet, l'homozygotie *G. hirsutum* domine au niveau des groupes de liaison c2-c14 et c3-c17 ; les taux sont compris entre 61 et 94% à l'exception du CIR058 qui est à 100% hétérozygote. Par contre, sur le groupe de liaison c6-c25, c'est l'hétérozygotie qui domine avec des taux compris entre 76 et 82%.

Le test khi2 met en évidence une distorsion de ségrégation des fréquences génotypiques, excepté pour le SSR BNL3971 localisé sur le c2 (Tableau 27). Tous les SSRs biaisés, localisés sur les groupes de liaison c2-c14 et c3-c17, favorisent le génotype du cotonnier cultivé ; ils sont tous homozygotes *G. hirsutum*, sauf pour le SSR CIR058 localisé au niveau du groupe de liaison c3-c17. Ce dernier et les trois (3) marqueurs génomiques localisés sur le groupe liaison c6-c25, sont biaisés en faveur du génotype hétérozygote.

Tableau 27: Suivi de l'introgression de *G. sturtianum* et analyse de la distorsion de la ségrégation des marqueurs SSRs transférés dans la population ♂ BC4S3

Chromosomes	Marqueurs SSRs	Distance génétique (cM)	Homozygote <i>G. hirsutum</i> (%)	Hétérozygote (%)	Khi2	Génotype favorisé
C2	BNL3590	27,8	27(82)	6(18)	13,36**	HH
	BNL3971	84,3	20(61)	13(39)	1,48	HH
C3	BNL2443b	25,4	28(88)	4(12)	18**	HH
	CIR058	39,7	0	33(100)	33**	HS
	BNL226b	67,6	31(94)	2(6)	25,48**	HH
	BNL3989	90,5	30(91)	3(9)	22,09**	HH
	CIR228a	137,3	23(70)	10(30)	5,12*	HH
C6	BNL3359b	0	8(24)	25(76)	8,76*	HS
C25	BNL3436	26,6	6(18)	27(82)	13,36**	HS
	BNL1153	69,3	6(18)	27(82)	13,36**	HS

Niveau de signification *P<0,05 ; **P<0,01
(%) = Pourcentage

8.3.1.4 Fréquence allélique des SSRs biaisés chez les populations BC3S4, ♂BC4S3 et la ♀BC4S3

Des distorsions de ségrégation (DS) en faveur des allèles de *G. sturtianum* ou de *G. hirsutum* sont observées dans les populations BC3S4, ♂BC4S3 et ♀BC4S3.

Chez la population BC3S4, les facteurs de DS sont supposés être apportés par les deux parents. Les résultats montrent que les fréquences génotypique et allélique sont biaisées (Tableau 28). Un excès de l'allèle du cotonnier cultivé est observé, excepté au niveau des marqueurs BNL3359b et BNL3436 localisés sur le c6-c25. La distorsion est ici influencée simultanément par une sélection gamétique et zygotique sur le groupe de liaison c2-c14, et uniquement par une sélection zygotique pour les SSRs situés sur les autres groupes de liaison.

Tableau 28: Analyse de la fréquence allélique des SSRs biaisés dans la population BC3S4

Chromosome	Marqueurs SSRs	Distance génétique (cM)	Fréquence des gènes		X ²		d=1/2-f(B)	Allèle Favorisé
			p	q	p2:2pq:q2	p=q		
C2	BNL3590	27,8	0,58	0,42	62,79**	6,73*	0,08	H
	BNL3971	84,3	0,74	0,26	16,33**	64,06**	0,24	H
C3	BNL2443b	25,4	0,53	0,47	77,01**	0,76	0,03	H
	CIR058	39,7	0,53	0,47	21,05**	1,01	0,03	H
	BNL226b	67,6	0,52	0,48	51,11**	0,25	0,02	H
	BNL3989	90,5	0,56	0,44	81,36**	4,28	0,06	H
	CIR228a	137,3	0,55	0,45	89,97**	2,88	0,05	H
C6	BNL3359b	0	0,49	0,51	126,23**	0,06	-0,01	S
C25	BNL3436	26,6	0,496	0,5037	131,06**	0,01	-0,0040	S
	BNL1153	69,3	0,51	0,49	120,53**	0,14	0,01	H

Niveau de signification *P<0,05 ; **P<0,01

Chez les populations ♂BC4S3 et ♀BC4S3, les facteurs de DS sont supposés être apportés respectivement par le parent mâle et le parent femelle. Les résultats montrent des DS en faveur des deux allèles parentaux (*G. sturtianum*, *G. hirsutum*) dans les deux populations ♂BC4S3 et ♀BC4S3.

Lorsque le génotype hétérozygote est favorisé, les fréquences alléliques sont biaisées vers l'allèle de *G. sturtianum*, influencé simultanément par une sélection zygotique et gamétique (Tableau 29 et 30). Par contre, lorsque le génotype *G. hirsutum* est favorisé comme observé uniquement chez la population ♂BC4S3, les résultats montrent que la DS observée est

influencée uniquement par une sélection gamétique, à l'exception du SSR CIR228 qui est influencé par une sélection zygotique (Tableau 29).

Tableau 29: Analyse de la fréquence allélique des SSRs biaisés dans la population ♂BC4S3

Chromosomes	Marqueurs SSRs	Distance génétique (cM)	Fréquence des gènes		X^2		d=1/4-f(B)	Allèle Favorisé
			P	q	P*tot:q*tot	3/4p :1/4q		
C2	BNL3590	27,8	0,91	0,09	3,30	8,91*	0,16	H
C3	BNL2443b	25,4	0,94	0,06	2,13	12**	0,19	H
	CIR058	39,7	0,50	0,50	33**	22**	-0,25	S
	BNL226b	67,6	0,97	0,03	1,03	16,99**	0,22	H
	BNL3989	90,5	0,95	0,05	1,57	14,73**	0,20	H
	CIR228a	137,3	0,85	0,15	5,89*	3,41	0,10	H
C6	BNL3359b	0	0,62	0,38	20,12**	5,84*	-0,13	S
C25	BNL3436	26,6	0,59	0,41	22,85**	8,91*	-0,16	S
	BNL1153	69,3	0,59	0,41	22,85**	8,91*	-0,16	S

Niveau de signification *P<0,05 ; **P< 0,01

Seuls les allèles dont la ségrégation ne correspond pas à la distribution de fréquence théorique attendue sont repris dans ce tableau.

Tableau 30: Analyse de la fréquence allélique des SSRs biaisés dans la population ♀BC4S3

Chromosomes	Marqueurs SSRs	Distance génétique (cM)	Fréquence des gènes		X^2		d=1/4-f(B)	Allèle Favorisé
			p	q	P*tot:q*tot	3/4p:1/4q		
c3	CIR058	39,7	0,50	0,50	35**	23,33**	-0,25	S
	CIR228a	137,3	0,50	0,50	35**	23,33**	-0,25	S
c6	BNL3359b	0	0,50	0,50	35**	23,33**	-0,25	S
c25	BNL3436	26,6	0,50	0,50	35**	23,33**	-0,25	S
	BNL1153	69,3	0,50	0,50	35**	23,33**	-0,25	S

Niveau de signification *P<0,05 ; **P< 0,01

Seuls les allèles dont la ségrégation ne correspond pas à la distribution de fréquence théorique attendue sont repris dans ce tableau

Nous pouvons conclure que la DS est influencée exclusivement par une sélection zygotique chez la population BC3S4, à l'exception du groupe de liaison c2-c14 où l'on observe simultanément un effet zygotique et un effet gamétique. Cette influence est simultanément zygotique et gamétique chez ♀BC4S3, tandis qu'elle est zygotique et/ou gamétique chez la ♂BC4S3.

8.3.2 Direction du biais chez les populations de HRS testées

Les populations BC2S5 et BC2S6 ne permettent pas d'identifier la direction de la distorsion de ségrégation parce que les résultats montrent que ni les allèles de *G. hirsutum*, ni ceux de *G. sturtianum* ne sont favorisés. En conséquence, pour déterminer la direction de la distorsion de ségrégation, nous allons nous focaliser sur les populations BC3S4, ♂BC4S3 et ♀BC4S3. Ainsi, pour ces trois (3) populations testées, les marqueurs biaisés montrent deux directions, une qui favorise le parent cultivé *G. hirsutum* et la seconde qui favorise le parent sauvage *G. sturtianum*.

- Chez la population BC3S4, tous les SSRs biaisés sont en faveur du parent cultivé *G. hirsutum*, à l'exception des SSRs BNL3359b et BNL3436 sur le c6-c25 qui sont biaisés en faveur du parent sauvage *G. sturtianum* (Tableau 29).
- Chez la population ♂BC4S3 les SSRs biaisés localisés sur le c2-c14 et le c3-c17 sont en faveur du cotonnier cultivé à l'exception du SSRs CIR058 (Tableau 30). Ce dernier et les SSRs biaisés du groupe de liaison c6-c25 sont en faveur du parent sauvage *G. sturtianum*.
- Chez la population ♀BC4S3, tous les SSRs biaisés, c'est-à-dire les SSRs CIR058 et CIR228b sur le c3-c17 et tous les SSRs localisés sur le c6-c25, sont en faveur du parent sauvage *G. sturtianum* (Tableau 31).

Les observations montrent que pour les populations qui ont les mêmes types de déviation, les facteurs qui causent la DS peuvent être transmis via le pollen ou l'ovule ou les deux. Il s'agit essentiellement, de tous les SSRs localisés au niveau du c2-c14 (BNL3591 et 3971) et du c6-c25 (BNL3359b, BNL3436 et BNL1153) ainsi que le CIR05 sur le c3-c17. Par contre la direction de la distorsion des autres SSRs au niveau du groupe de liaison c3-c17 est en faveur du parent cultivé excepté les SSRs CIR058 et le CIR228, dont la direction de la distorsion varie selon la population testée. Ainsi, au niveau de ces SSRs la distorsion est en faveur de *G. sturtianum* dans la population ♀BC4S3 et ♂BC4S3 pour le SSR CIR058. Par contre, la distorsion est en faveur du cotonnier cultivé *G. hirsutum* au niveau des populations BC3S4. Le cotonnier cultivé est aussi favorisé au niveau du SSR CIR228 chez la population ♂BC4S3.

8.3.3 Analyse du déterminisme génétique du caractère inhibition de la synthèse du gossypol dans la graine

Ce chapitre a pour objectif d'étudier le déterminisme génétique de l'inhibition de la synthèse du gossypol dans la graine par une analyse de la variance des données génotypiques en fonction de la teneur en gossypol. Elle a été effectuée dans le but d'étudier le lien entre les 10 marqueurs et l'expression de l'inhibition de la synthèse du gossypol dans la graine chez les génotypes étudiés. Il s'agit essentiellement des plantes appartenant aux BC3S4, ♂BC4S3 et ♀BC4S3.

Les tableaux 31 à 33 reprennent les résultats des analyses de la variance en simple marqueur de l'expression de l'inhibition de la synthèse du gossypol dans la graine en fonction des dix *loci* SSRs analysés chez les plantes des populations BC3S4, ♂BC4S3 et ♀BC4S3.

Chez la BC3S4, cinq marqueurs situés respectivement sur les chromosomes c2 et c3 sont significativement liés à l'expression de caractère recherché. Parmi ceux-ci, trois (3) SSRs sont liés de manière très hautement significative ; il s'agit de BNL3590 sur c2, BNL226b et BNL3989 sur c3, alors que le CIR058 et CIR228 situé sur le c3 sont seulement significativement liés à l'expression du caractère (Tableau 31).

Par ailleurs, l'expression de l'inhibition de la synthèse du gossypol dans la graine est uniquement liée au marqueur BNL3590 chez la descendance ♀BC4S3 (Tableau 32). Chez la descendance ♂BC4S3, l'expression de l'inhibition de la synthèse du gossypol dans la graine est non seulement liée à BNL3590 (identifié chez la descendance ♀BC4S3) mais est aussi significativement liée à BNL3989 (Tableau33).

On en conclut que c'est le transfert simultané (en autofécondation) des marqueurs portés par ces deux types de gamètes mâles et femelles qui entraîne une meilleure expression du caractère recherché.

Tableau 31: Analyse du lien entre les 10 SSRs et l'inhibition de la teneur en gossypol uniquement dans la graine chez la descendance HRS BC3S4 (138 individus)

Chromosome	Locus	Niveau de signification	R ² (%)	Niveau de probabilité	F
c02	BNL3590	****	15,47	0	12,99
	BNL3971	-	0	0,498	0,46
c03	BNL2443b	-	0,52	0,267	1,34
	CIR058	*	5,63	0,01	4,76
	BNL226b	****	19,35	0	16,36
	BNL3989	***	7,48	0,001	11,84
	CIR228a	*	3,01	0,024	5,19
c06	BNL3359b	-	0	0,598	0,28
c25	BNL3436	-	0	0,782	0,08
	BNL1153	-	0,89	0,143	2,17

R² : % de la variance phénotypique attribuable à un marqueur

Niveaux de signification : *P<0.1, **P<0.01, ***P<0.001, ****P<0.0001.

Tableau 32: Analyse du lien entre les 10 SSRs et l'inhibition de la teneur en gossypol uniquement dans la graine chez la descendance HRS ♀BC4S3 (35 individus)

Chromosome	Locus	Niveau de signification	R ² (%)	Niveau de probabilité	F
c02	BNL3590	**	23,09	0,002	11,21
	BNL3971	-	0	0,67	0,18
c03	BNL2443b	-	0	0,522	0,42
	CIR058	-	-	-	-
	BNL226b	-	0	0,397	0,74
	BNL3989	-	0	0,541	0,38
	CIR228a	-	-	-	-
c06	BNL3359b	-	-	-	-
c25	BNL3436	-	-	-	-
	BNL1153	-	-	-	-

R² : % de la variance phénotypique attribuable à un marqueur

Niveaux de signification : *P<0.1, **P<0.01, ***P<0.001, ****P<0.0001.

Tableau 33: Analyse du lien entre les 10 SSRs et l'inhibition de la teneur en gossypol uniquement dans la graine chez la descendance HRS ♂BC4S3 (33 individus)

Chromosome	Locus	Niveau de signification	R ² (%)	Niveau de probabilité	F
c02	BNL3590	*	11,17	0,032	5,02
	BNL3971	-	2,39	0,191	1,78
c03	BNL2443b	-	5,44	0,106	2,78
	CIR058	-	-	-	-
	BNL226b	-	2,2	0,199	1,72
	BNL3989	**	21,94	0,004	9,99
	CIR228a	-	0,18	0,312	1,06
c06	BNL3359b	-	0	0,782	0,08
c25	BNL3436	-	0	0,445	0,6
	BNL1153	-	0	0,445	0,6

R² : % de la variance phénotypique attribuable à un marqueur

Niveaux de signification : *P<0.1, **P<0.01, ***P<0.001, ****P<0.0001.

8.4 Discussions

8.4.1 Suivi de l'introgession des allèles de *G. sturtianum* dans les descendance testées de l'hybride HRS

L'amplification des 10 *loci* SSRs identifiés par Benbouza *et al.* (2009) montre que les allèles provenant de *G. sturtianum* sont bien conservés dans les descendance des hybrides HRS qui ont été étudiées. Cependant, le constat majeur des observations est un excès d'hétérozygotes qui se retrouve chez toutes les populations testées. La même observation a été faite par Benbouza *et al.* (2009), qui ont trouvé une dominance anormale des hétérozygotes. Selon ces auteurs travaillant sur les descendance autofécondées de HRS jusqu'à la BC2S5 et sur les backcross jusqu'à le BC3S4, la probabilité pour qu'un tel phénomène soit uniquement dû au hasard est inférieure à $1/10^4$.

Après 6 générations d'autofécondation dans un schéma classique de sélection, sur base des fréquences théoriques attendues à chaque génération, la proportion de plantes hétérozygotes pour un couple d'allèles donné doit être inférieure de 1,56 %. Cette situation n'a été observée pour aucun des 10 SSRs testés, qui sont à l'exception du SSR BNL226b sur le chromosome 2, quasi à 100 % hétérozygotes pour les populations BC2S5 et BC2S6 (Tableau 22 et 23). Pour le SSR BNL226b, il est observé que respectivement 12 et 6 % des individus des descendance BC2S5 et BC2S6 sont homozygotes *G. hirsutum*. De même, la plupart des 138 plantes BC3S4 analysées (Tableau 26) étaient hétérozygotes pour quasi tous les marqueurs SSRs testés. Pour ces plantes, le taux d'hétérozygotie des 10 SSRs est en moyenne de 81 %, variant de 51 % (BNL3971 cartographié sur le groupe de liaison c3-c17) à presque 100 % (pour les marqueurs SSRs BNL1153, BNL3436 et BNL3359b, cartographiés sur le groupe de liaison c6-c25).

Dans un schéma classique de backcross, le taux d'hétérozygotie diminue également au fil des générations, comme dans le cas de la succession d'autofécondations. La fréquence des hétérozygotes doit diminuer de 50 % après chaque génération de backcross. Ainsi, la distribution de fréquence théorique attendue en BC₁, est de « 1/2 homozygote *G. hirsutum* – 1/2 hétérozygote ». Chez le matériel BC4S3 analysé, la probabilité de trouver des allèles de *G. sturtianum* présents à l'état hétérozygote devrait être d'environ 1,5 % ($0,5^{-6}$). Cependant, nos résultats mettent en évidence des taux encore élevés d'individus hétérozygotes dans les populations ♀BC4S3 et ♂BC4S3. Ils concernent essentiellement les SSRs du groupe de liaison c6-c25 et du SSR CIR058 sur le c3-c17, qui sont hétérozygotes à 80 % et 100 %

respectivement dans les populations ♂BC4S3 et ♀BC4S3. Cette situation se retrouve aussi avec le SSR CIR228 qui est à 100 % hétérozygote chez la population ♀BC4S3, alors que son taux d'hétérozygotie est plus faible (30 %) chez la population ♂BC4S3. Par ailleurs, les SSRs BNL3590 et BNL3971 situés sur le groupe de liaison c2-c14 et les SSRs BNL2443b, BNL226b, BNL3989 situés sur le groupe de liaison c3-c17, sont à 50 % hétérozygote chez la population ♀BC4S3. Par contre, ces mêmes SSRs sont seulement à 16,8 % hétérozygotes chez la population ♂BC4S3.

L'analyse des résultats obtenus montre que les fragments de *G. sturtianum* sont systématiquement transmis à la descendance de toutes les populations testées au niveau du groupe liaison c6-c25 et au niveau du SSR CIR058 localisé sur le groupe de liaison c3-c17. Par contre, sur les deux (2) autres groupes de liaison c2-c14 et c3-c17, la transmission des allèles de *G. sturtianum* est variable selon que cela se fait via l'ovule, le pollen ou les deux. Mais, lorsque le transfert se fait simultanément via l'ovule et le pollen (en autofécondation BC3S4), les résultats indiquent que le transfert des allèles de *G. sturtianum* est très important d'une part (i) à cause de la dominance des individus hétérozygote ; d'autre part (ii) à cause du faible taux d'individus homozygotes *G. sturtianum* (1 à 12 %) observé.

Cependant, chez les plantes HRS, le transfert des allèles de *G. sturtianum* est plus important lorsqu'il se fait via l'ovule plutôt que le pollen. Ce constat peut s'expliquer par le fait que le transfert via l'ovule offre plus de possibilités aux allèles de *G. sturtianum* à cause des effets possibles de toute l'information génétique véhiculée par le cytoplasme au cours de la reproduction sexuée. Selon Endo, (1990), les chloroplastes et les mitochondries provenant du parent femelle peuvent parfois contenir des gènes susceptibles de causer des anomalies.

Ces résultats concernant le transfert des fragments de chromosomes dans les descendance sélectionnées de HRS met donc en évidence l'existence de mécanismes qui modifient la ségrégation attendue pour les couples d'allèles des différents gènes analysés en cas d'autofécondation et de rétrocroisement. Les forts taux d'hétérozygotie observés traduisent une forte distorsion de ségrégation confirmée par le test de Khi2. En effet, tous les dix (10) SSRs testés étaient biaisés, et ceci dans presque toutes les populations étudiées (Tableau 22, 23 et 26). Ces résultats viennent confirmer l'hypothèse d'une distorsion de ségrégation chez les populations HRS, formulées à partir des résultats de la sélection des graines (Chapitre 5) et de la caractérisation agro-morphologique (Chapitre 7).

8.4.2 La distorsion de ségrégation chez les différentes populations testées

La DS peut être définie comme une déviation significative des proportions des individus d'une classe génotypique donnée au sein d'une population ségréante (Xu *et al.* 1997 ; Castro *et al.* 2011).

L'analyse des fréquences génotypiques chez les populations issues d'autofécondations, montre une ségrégation normale chez 1/10 des SSRs testés dans la population BC2S5, tandis que l'ensemble des SSRs sont biaisés à 100% chez les populations BC2S6 et BC3S4. La ségrégation normale au niveau du *locus* BNL226b situé sur le c3-c17, observée chez la population BC2S5 est probablement due au faible nombre (9) d'individus testé. En effet, Lu *et al.* (2002) ont trouvé une relation positive entre le nombre de méioses et la fréquence de détection des DS. Une fois les parents choisis, une descendance en ségrégation de plusieurs dizaines d'individus sera nécessaire pour obtenir un échantillon d'événements méiotiques suffisant pour estimer le plus précisément possible les taux de recombinaison. Ainsi, à cause de ce faible nombre d'individus, cette population BC2S5 ne sera pas utilisée pour la suite des analyses.

Chez les populations issues de backcross (Tableau 27 et 28) on constate une ségrégation normale de 1/10 des SSRs lorsque la souche issue de l'hybride HRS est utilisée comme parent mâle (♂BC4S3). Par contre 5/10 des SSRs (Tableau 28) montrent une ségrégation normale lorsque la souche issue de l'hybride HRS est utilisée comme parent femelle (♀BC4S3). Ces observations sont en accord avec les résultats déjà obtenus qui montrent que la DS peut survenir aussi bien au niveau des gamètes femelles, que des gamètes mâles et qu'en présence d'un facteur de distorsion de ségrégation, les gamétophytes mâles sont généralement plus sensibles (Endo, 1990 ; Xu *et al.* 1997 ; Lu *et al.* 2002 ; Song *et al.* 2006 ; Castro *et al.* 2011). En effet, pour ces marqueurs biaisés, l'effet sélectif des facteurs transmis par le pollen semble être dominant. Les facteurs de distorsion portés par l'ovule ne touchent pas l'ensemble des groupes de liaison et sont inhibés chez les populations autofécondées lorsqu'il y a association des gamètes mâles et femelles. Cette observation est cohérente avec des résultats obtenus par Nakagahra, (1972) dans une étude concernant les mécanismes de la distorsion de ségrégation chez le riz cultivé, qui associe généralement les gamètes mâles aux DS observées. Cela est particulièrement vrai dans notre étude, parce qu'une réduction du nombre de marqueurs biaisés est observée chez les populations issues de backcross et plus encore, lorsque les facteurs de DS sont portés par les gamètes femelles dans la population ♀BC4S3 (Tableau 26).

Ceci met en évidence l'importance de l'effet de gamètes mâles dans l'induction des DS dans le programme de sélection de l'hybride HRS.

La comparaison des DS des populations issues d'autofécondation et de backcross sont en accord avec les résultats déjà obtenus qui montrent que les populations issues de backcross ont habituellement les pourcentages de distorsion les plus faibles (Lorieux *et al.* 1995 a, b ; Song *et al.* 2006, Zhang *et al.* 2010, Liu *et al.* 2010). Dans les populations testées, les DS sont donc plus importantes chez les populations BC2S6 et BC3S4 qui sont issues d'autofécondations, suivies de celles des populations ♂BC4S3 et enfin de la ♀BC4S3 (Tableaux 29 et 30).

D'après Wang *et al.* (2004) l'aptitude à la DS est généralement liée à l'environnement et à une pression de sélection exercée sur plusieurs générations d'autofécondation. Dans notre cas une pression de sélection axée sur les graines exprimant une inhibition de la synthèse du gossypol et la nature interspécifique des plantes HRS seraient essentiellement la cause de la fixation d'allèles qui peuvent entraîner la DS.

8.4.3 Causes de la DS chez les plantes HRS

8.4.3.1 Charge génétique chez les descendances de l'hybride HRS

Le transfert de gènes intéressants à partir d'espèces sauvages vers les espèces cultivées est souvent accompagné de caractères indésirables, dus à des gènes rédhibitoires présents sur les segments de chromosome transférés (Endo, 1990; Marais *et al.* 2010). C'est certainement le cas de l'espèce australienne *G. sturtianum* qui appartient au génome le plus difficile à utiliser dans un programme d'amélioration du cotonnier par hybridation interspécifique (Vroh Bi *et al.* 1998, Becerra *et al.* 2007). Son introgression chez la principale espèce de cotonnier cultivé se traduit par la formation d'une charge génétique chez les plantes HRS. La charge génétique se définit comme la baisse de l'aptitude moyenne d'une population, due à la présence de gènes délétères, par rapport au niveau des individus présentant l'aptitude maximum. L'aptitude moyenne d'une population est mesurée par le nombre moyen de descendants laissés à la génération suivante pour chaque individu. Les résultats que nous avons obtenus montrent que la relation génétique des parents qui ont contribué à la création de l'hybride HRS se traduit par une charge génétique qui le prédispose à une DS. Une telle association produit une structure génomique avec une pléthore de recombinaisons hétérogènes et de réarrangements

chromosomiques favorables au maintien des allèles de l'espèce sauvage à l'état hétérozygote (Bradshaw et Stettler, 1994 ; Klekowski, 1988).

Beaucoup de recherches indiquent que les populations issues de croisements interspécifiques sont sujettes à la DS (Heijbroek *et al.* 1988, Tonguç *et al.* 2003, Song *et al.* 2006, Liu *et al.*, 2010). Chez certaines populations dérivées de croisements interspécifiques, on observe également qu'il est, d'une part, difficile d'obtenir des descendances stables, et d'autre part, que les caractères transférés peuvent être perdus au cours des générations de rétrocroisement (Plieske *et al.* 1998). Depuis la création de l'hybride HRS, des anomalies ont toujours été observées, à travers des graines vides, malformées, l'absence de germination des graines, la mort des jeunes plantules, un déséquilibre morphologique et un faible pourcentage de graines présentant le caractère recherché (Vroh Bi *et al.* 1999, Benbouza, 2004). Toutes ces observations mettent en évidence l'existence d'un déséquilibre très important chez l'hybride HRS due à sa charge génétique.

8.4.3.2 La pression de la sélection sur les plantes HRS

L'instabilité observée sur toutes les générations étudiées, met en évidence une forte sélection basée sur la viabilité. D'après Song *et al.* (2006), ce type de sélection dite zygotique, qui est plus fréquente chez les hybrides interspécifiques, serait plus important que la sélection gamétique. En effet, la pression de la sélection avec une succession d'autofécondations, diminuerait la viabilité des homozygotes et favorise la DS (par la présence anormale d'hétérozygote). Cette observation est en accord avec nos résultats qui mettent en évidence dans toutes les populations testées : (i) une forte mortalité ; et (ii) une sélection zygotique pour tous les SSRs à l'exception des SSRs localisés sur le c2 et d'une partie des SSRs du c3 au niveau de la population ♂BC4S3, qui sont uniquement influencés par une sélection gamétique (Tableau 30).

Tenant compte des résultats obtenus, nous pouvons émettre l'hypothèse que la multiplication des générations d'autofécondation et la pression de sélection basée sur une expression du caractère inhibition de la synthèse du gossypol dans la graine s'est accompagnée de la fixation de facteurs qui (i) modifient la ségrégation, et (ii) qui empêchent la production de plantes homozygotes pour les allèles de *G. sturtianum* introgressés chez les plantes HRS. D'après Bradshaw et Stettler, (1994), ces facteurs d'instabilités observés, peuvent plus précisément avoir une origine génique (gènes gamétocide, gènes de létalité) ou être la conséquence de la différence structurelle qui existe entre des chromosomes homéologues. D'après Endo, (1990),

les anomalies peuvent juste être l'effet de la présence de chromosomes étrangers. Cette situation semble se présenter chez les plantes HRS étudiées. En effet, la dominance du génotype hétérozygote, la forte sélection zygotique trouvée et le problème de viabilité constatés, peuvent être indicateur d'une forte transmission de chromosomes de *G. sturtianum*. Ces derniers seraient préférentiellement transmis en même temps que le caractère sélectionné.

8.4.4 Mécanismes de la DS chez HRS

L'analyse des fréquences alléliques (Tableau 23, 24, 28, 29 et 30) des plantes HRS montre que la DS observée pour tous les SSRs biaisés est causée par une sélection zygotique et/ou une sélection gamétique. Le tableau 34 reprend les mécanismes de DS observés pour chaque groupe de liaison et par génération étudiée.

Tableau 34 : Synthèse des différents mécanismes de DS observés, par génération et par groupe de liaison pour l'ensemble des générations étudiées

Génération	Groupe de liaison	Mécanisme de DS
BC2S5	c2-c14	Zygotique
BC2S6	c3-c17	
	c6-c25	
BC3S4	c2-c14	Zygotique et gamétique
	c3-c17	Zygotique
	c6-c25	
♀BC4S3	c2-c14 et c3-c17	Ségrégation normale
	c3-c17	Gamétique et zygotique
	c6-c25	
♂BC4S3	c2-c14	Ségrégation normale, gamétique
	c3-c17	Gamétique et/ou zygotique
	c6-c25	Gamétique et zygotique

Les résultats obtenus renseignent sur la multitude des mécanismes en place, qui entraînent une DS chez les plantes hybrides HRS. La même observation a été faite par Lashermes *et al.* (2001) qui en ont conclu que la sélection zygotique n'exclut pas la sélection gamétique. Ils sont aussi en accord avec les résultats de Li *et al.* (2007) et Jiang *et al.* (2008) rapportent respectivement, en étudiant une population intra-spécifique de coton et une population F2 de riz une DS influencée simultanément par une sélection gamétique et zygotique. Ces deux types de sélection peuvent dans ce cas être contrôlés par des *loci* de distorsion de ségrégation (LDS) qui agissent respectivement avant (gamétique) et après la fécondation (zygotique). Les LDS sont porteurs de gènes gamétocides qui se transmettent préférentiellement à la descendance, entraînant une DS (Nakagahra, 1972 ; Endo, 1990 ; Rooney et Stelly, 1991). Selon Rooney et Stelly., (1991), la transmission préférentielle est le résultat des interactions

génétiques et cytologiques entre le génome du cotonnier cultivé et celui du cotonnier sauvage. Becerra *et al.* (2007), ont supposé la possible présence de chromosomes gamétocides chez l'espèce *G. australe* lors d'une analyse de la fréquence de transmission des chromosomes étrangers chez le cotonnier cultivé. *G. sturtianum* étant une espèce australienne comme *G. australe* et les deux présentant le même mécanisme d'inhibition de la synthèse du gossypol dans la graine (Zhu et Daofan, 2001), ces mêmes gènes ou chromosomes gamétocides ou d'autres ayant les mêmes effets pourraient exister dans la descendance de l'hybride HRS. D'ailleurs, d'autres études sur l'amélioration du cotonnier en utilisant *G. sturtianum* et *G. australe*, ont aussi rapporté des cas de transmission préférentielle de chromosomes de ces derniers (Ahoton *et al.* 2004, Sarr et Mergeai, 2009). Dans le cas de la présence de « gènes gamétocides » chez *G. sturtianum*, ces derniers ne laisseraient se former que les gamètes qui les portent, entraînant ainsi une persistance de l'état hétérozygote, ce qui empêche en même temps la formation d'homozygote *G. sturtianum*.

Dans le cas de chromosomes gamétocides, Lyttle (1991) rapporte que chez beaucoup d'espèces végétales et animales, l'hétérozygotie structurelle peut favoriser l'apparition de chromosomes parasites. La distorsion est alors une conséquence directe de la structure intrinsèque du chromosome plutôt que le résultat de l'évolution d'un *locus* liés à un gène gamétocide. Le mécanisme se passerait comme suit : le chromosome sauvage est préférentiellement transmis à toute la descendance et joue un rôle de chromosome « ultra égoïste » comme décrit par Crow (1988) et Lyttle (1991). Plusieurs études sur l'amélioration du cotonnier *G. hirsutum* utilisant l'espèce sauvage *G. sturtianum* ont déjà rapporté des cas de transmission préférentielle ou de perte du chromosome sauvage (Rooney et Stelly., 1991, Vroh Bi *et al.* 1999, Becerra *et al.* 2007). Ainsi, chez l'hybride HRS Vroh Bi *et al.* (1999) ont trouvé après sa création que quelques chromosomes de *G. sturtianum* étaient systématiquement transmis à la descendance issue de backcross. Donc nous pouvons supposer que ces chromosomes considérés comme « ultra égoïste » se seraient maintenus dans la descendance de l'hybride HRS jusqu'aux populations BC2S5, BC2S6, BC3S4, ♂BC4S3 et la ♀BC4S3, qui sont ici étudiées. Cette hypothèse est soutenue par le taux élevé d'hétérozygotie trouvé par Benbouza *et al.* (2009) dans les recherches antérieures concernant la descendance de l'hybride HRS qui s'ajoutent à nos propres résultats.

D'après Xu *et al.* (1997) et Lu *et al.* (2002), les chromosomes ciblés par notre étude (c2, c3, c6, c25), constituent des régions prédisposées à la DS. En effet, ils ont déjà été identifiés chez

le cotonnier comme des des régions de distorsion de ségrégation (RDS) (Han *et al.* 2004, Song *et al.* 2006, Yu *et al.* 2007, He *et al.* 2008, Yu *et al.* 2011). De nombreux auteurs ont constaté que les marqueurs biaisés dans la même direction sont regroupés dans RDS qui sont généralement liées à des LDS (Xu *et al.* 1997, Lu *et al.* 2002, Song *et al.* 2006, Castro *et al.* 2011). Mais d'autres gènes inconnus sont aussi susceptibles de causer la distorsion de ségrégation dans la même région chromosomique (Lu *et al.* 2002, Castro *et al.* 2011).

Sachant que les gènes gamétocides, ont un effet sélectif sur la direction du biais, ils influencent les générations testées. Se basant sur les résultats de Xu *et al.* (1997), Lu *et al.* (2002) et Song *et al.* (2006), au moins deux facteurs semblent en être la cause : (i) un facteur favorisant les allèles de *G. hirsutum*, transmis uniquement via le pollen sur le groupe de liaison c2-c14 et (ii) un facteur favorisant les allèles de *G. sturtianum*, transmis via l'ovule ou le pollen sur le c6-c25 et pour CIR058 sur le groupe de liaison c3-c17.

Cependant, les raisons qui entraînent une sélection zygotique, gamétique et les deux simultanément au niveau des différentes populations HRS testées n'est pas claire. En effet, le type de sélection peut changer pour le même groupe de liaison selon les populations, même si la direction de la distorsion est la même. Cela laisse supposer la présence d'autres facteurs en plus des gènes gamétocides. Cette hypothèse conforte l'hypothèse de l'effet probable de gros fragments de chromosomes ou de chromosomes entiers de *G. sturtianum* supposé par Vroh bi *et al.* (1999). Ces chromosomes de *G. sturtianum* interviendraient en favorisant leurs transmission préférentielle, avec comme conséquence, un excès d'hétérozygotes.

En résumé, sachant que les marqueurs sont neutres, il existerait des gènes gamétocides au niveau des LDS et/ou des chromosomes de *G. sturtianum*, qui provoqueraient la distorsion observée chez les plantes HRS.

8.4.4.1-Transmission préférentielle des allèles de G. hirsutum au niveau du groupe de liaison c2-c14

Au niveau du groupe de liaison c2-c14 seuls deux marqueurs SSRs (BNL3971 et BNL3590) sont concernés. Lorsqu'il y a distorsion de ségrégation, les résultats montrent que c'est le parent cultivé *G. hirsutum* qui est favorisé. Les mécanismes de distorsion sur le groupe de liaison c2-c14 sont gouvernés par des facteurs qui agissent avant et après la fécondation (gamétiques et zygotiques) et doivent être portés aussi bien par l'ovule que le pollen (Tableau 34). En effet, lorsque ces facteurs sont séparés ils ne sont pas suffisamment forts pour

entraîner une grande distorsion. Les résultats montrent qu'il n'y a pas de distorsion lorsque le facteur de DS est apporté par l'ovule et seul un SSR sur deux est biaisé quand le transfert se fait via le pollen. Ces résultats montrent que les facteurs portés par les microgamétophytes ont plus d'effets sur la distorsion. Mais, l'association des facteurs apportés par les micros et les macros gamétophytes chez les plantes BC3S4 (autofécondation), démultiplie leurs effets. Une synergie des facteurs apportés par le pollen et l'ovule, conduit à une distorsion génotypique et allélique, comme déjà trouvé chez le coton et le riz respectivement par Li *et al.* (2007) et Jiang *et al.* (2008).

8.4.4.2 -Transmission préférentielle des allèles de *G. sturtianum* au niveau du groupe de liaison c6-c25 et du SSR CIR058 au niveau du groupe de liaison c3-c17

Au niveau du groupe de liaison c6-c25, trois marqueurs SSRs (BNL3359b, BNL3436 et BNL1153) sont concernés, alors qu'un (1) SSR (CIR058) est concerné pour le groupe liaison c3-c17. La distorsion est causée par une sélection zygotique et gamétique simultanée chez les populations ♂BC4S3 et ♀BC4S3 (Tableau 29 et 30), alors qu'une sélection uniquement zygotique est en cause chez la population BC3S4 (Tableau 28). A ce niveau, malgré que les mécanismes soient différentes, il y a une DS en faveur de l'allèle de *G. sturtianum*, chez les populations testées. Cependant, les SSRs CIR058 et BNL1153 dans la population BC3S4 (Tableau 29) font exception, ils favorisent l'allèle du cotonnier cultivé. En outre, tous ces mécanismes se passent dans un contexte de distorsion en faveur du génotype hétérozygote. Il ressort que : (i) le même facteur de DS est apporté aussi bien par le pollen que l'ovule; (ii) l'association des facteurs de distorsion apportés par les gamètes mâles et femelles inhibe l'effet gamétique et ne favorise pas systématiquement le transfert de l'allèle de *G. sturtianum*.

La plupart des recherches convergent vers le fait que les distorsions de ségrégation sont plus fréquentes chez les descendance interspécifiques. L'hétérozygotie structurelle y joue un rôle important (Song *et al.* 2006 ; Luro *et al.* 1995). En effet, comme déjà énoncé, d'importants problèmes d'introgession avec des espèces sauvages sont causés par l'effet sélectif de larges fragments de chromosomes et/ou par la présence d'un ou de plusieurs chromosomes entiers de l'espèce sauvage.

Ainsi, on peut supposer sur base des résultats obtenus sur les descendance autofécondées et rétrocroisées que le groupe de liaison c6-c25 pourrait constituer un de ces chromosomes « ultra égoïste » qui favoriseraient l'instabilité du matériel. Cependant, ces chromosomes peuvent parfois être perdus au cours de la sélection comme le montrent les résultats observés

avec la BC3S4 à ce niveau. Cette hypothèse est conforme avec les observations d'Endo, (1990), qui a trouvé chez le blé que les chromosomes gamétocides peuvent être éliminés à conditions d'être en présence de gènes spécifiques qui sont dotés de gamètes résistants à l'effet gamétocides.

8.4.4.3 Les mécanismes de la DS au niveau du groupe de liaison c3-c17

Les conflits entre les génomes des parents utilisés pour créer l'hybride HRS qui alimentent la charge génétique semblent plus s'exprimer au niveau de ce groupe de liaison. En effet, sur ce dernier, plusieurs mécanismes de DS surviennent selon la population testée (Tableau 34). Le biais observé est en faveur de l'allèle de *G. hirsutum* au niveau des populations de la BC3S4 et la ♂BC4S3 (Tableau 29 et 30). Cependant, les mécanismes entraînant la DS au niveau de ces deux (2) populations sont différents. D'une part, nous avons trouvé un excès d'hétérozygotes influencé par une sélection zygotique chez la BC3S4, d'autre part, nous avons trouvé un excès d'homozygote *G. hirsutum*, influencé par une sélection gamétique au niveau de la ♂BC4S3. Par contre, au niveau de la ♀BC4S3 uniquement deux (2) SSRs (CIR058 et CIR228a) à 100% hétérozygote sont biaisés. Ils subissent un effet simultané d'une sélection zygotique et gamétique. Ces résultats montrent une grande instabilité au niveau du groupe de liaison c3-c17, influencée par plusieurs facteurs qui entraînent des résultats différents. Ainsi, la sélection gamétique observée chez la ♂BC4S3 semble être inhibée par la sélection zygotique que l'on observe à la génération BC3S4, et l'influence zygotique trouvée chez la ♀BC4S3 ne joue pas le même rôle que celle observée chez la BC3S4 (Tableau 34). Nous pouvons en conclure que le c3 semble être un lieu de conflit génétique, un « hot point » qui est dû au patrimoine génétique intrinsèque de l'hybride HRS, et qu'il est possible qu'une partie de l'instabilité observée vienne de cette zone. Les liaisons entre *loci* incompatibles à ce niveau peuvent être responsables de la DS observée dans le matériel que nous avons analysé.

8.4.5 Conséquences de la DS chez les plantes HRS

8.4.5.1 Létalité zygotique chez HRS et DS

L'excès d'hétérozygotes, les fortes pertes et les malformations des graines et des plantes HRS observées (Chapitre 6 et 7), mettent en évidence l'existence d'un déséquilibre très important chez l'hybride HRS. Ce déséquilibre pourrait être provoqué par une létalité zygotique due à la possible présence de facteur(s) de létalité, sur les fragments étrangers conservés, qui

s'expriment à l'état homozygote mais aussi à la différence structurelle liée aux fragments de chromosomes de *G. sturtianum* encore présents.

Probablement due aux mécanismes se produisant durant la méiose après la fécondation, et/ou à une liaison avec des gènes létaux, la létalité zygotique observée est très importante dans les descendance testées de l'hybride HRS. Ainsi l'analyse de la germination des graines et de la survie des plantes effectuée au niveau du chapitre 7 montre de manière croissante que la population ♂BC4S3 a présenté une perte moins importante de graines et de plantes. Elle est suivie à ce niveau par la ♀BC4S3 et puis par la BC3S4. Ces résultats nous montrent que les facteurs de létalité sont véhiculés aussi bien par les gamètes mâles que femelles. Cependant, la létalité est plus importante lorsque le facteur est apporté par les gamètes femelles.

La létalité apportée par l'ovule (♀BC4S3) provoque des pertes s'élevant respectivement à 24% de graines mis en évidence par leurs scarifications et la perte de 33% et 67% des plantes survivantes durant la germination et après le semis des graines ayant germées. Par contre la létalité est moins importante lorsqu'elle est apportée par le pollen (♂BC4S3) avec 8% de graines perdues mis en évidence par leurs scarifications, et la perte de 42% et 58% des plantes survivantes respectivement durant la germination et le semis des graines ayant germé. En outre, les résultats obtenus avec la population BC3S4 montrent respectivement que 43% de graines sont perdues lors de la mise en germination et que 71 % des plantules sont perdues niveau des graines viables ayant germé. Ces observations mettent en évidence le caractère additif des effets des facteurs de létalité. En effet, la combinaison des facteurs de létalité provenant des gamètes mâles et femelles en autofécondation, conduit à une augmentation des taux de perte, ce qui semble montrer que cette combinaison est donc plus destructrice pour les plantes HRS.

Généralement, la létalité est attribuée aux gamètes mâles, mais nos résultats montrent que les gamètes femelles sont plus impliqués dans la létalité zygotique chez la plantes issues de l'hybride HRS. En fait, il est bien connu que l'avortement des gamétophytes femelles peut arriver à différentes étapes, mais il se produit généralement lors de la méiose; la graine continue alors à se développer, mais elle est petite, plate ou vide (Siregar et Yunanto, 2008). Les mêmes résultats ont été trouvés dans notre programme de sélection, où la létalité provoquée par les gamètes femelles (BC3S4, ♀BC4S3) est beaucoup plus importante. Cette observation est en phase avec les résultats de Fishman et Willis, (2005) qui ont démontré par analyse cytogénétique que la méiose au niveau des individus femelles peut être le siège de

concurrence chromosomique et d'évolution d'éléments égoïstes. Ainsi, chez les êtres vivants, la méiose au niveau des individus femelles est essentiellement asymétrique: trois des quatre produits de la méiose dégénèrent, et seul un va évoluer pour donner un gamète (Fishman et Willis, 2005). Par conséquent, il est facile pour un élément chromosomique égoïste d'avoir un avantage inhérent de transmission dans la descendance (Fishman et Willis, 2005).

Par ailleurs, un autre mécanisme de la sélection allélique se produit durant l'embryogenèse. Après la fécondation, la maturation d'une graine viable dépend de la survie de l'embryon. Ainsi, la vigueur du génotype de l'embryon est essentielle au développement de l'ovule. C'est ce qu'ont mis en évidence Siregar and et Yunanto, (2008) dans le cadre d'un programme portant sur l'étude des causes possibles de la DS dans la descendance du *Pinus merkusii* Jungh. et De Vries (pin de Sumatra) en pollinisation libre. Selon ces auteurs, la proportion de graines vides est importante chez *P. merkusii*, mais le mécanisme de sélection ne se passe pas au stade haploïde. Ces résultats sont en accord avec l'important taux de graines mal- formées et vides trouvées au niveau des populations BC3S4 et la ♀BC4S3, et de la forte sélection zygotique observée à ce stade.

Un autre mécanisme, pourrait être la sélection en défaveur des allèles introgressés qui sont liés à un allèle létal ou semi-létal, qui affecte la production des gamètes femelles. En effet, d'après Siregar et Yunanto, (2008), lorsque des allèles sont liés à un gène létal, leur analyse peut mettre en évidence une distorsion de la ségrégation apparente, si et seulement si cette analyse est effectuée après l'avortement du zygote.

En outre, Bradshaw et Stettler, (1994), supposent que l'ovule peut être capable de supporter un embryon qui ne pourra pas évoluer pour donner une plante. Ils considèrent que le phénotype létal peut ne pas s'exprimer avant la maturation de l'embryon ou au moment de la germination.

Ces hypothèses sont très intéressantes, particulièrement pour la létalité zygotique observée chez les descendants de l'hybride HRS qui pourrait être due à une possible présence de facteurs de létalité sur les fragments conservés de *G. sturtianum* qui s'expriment à l'état homozygote. Ceci n'est pas impossible puisque Kakani *et al.* (1999) ont déjà montré l'existence de *loci* qui conditionnent la létalité, la stérilité partielle mâle et/ou femelle et le développement du pollen, au niveau du groupe de liaison c12-c26 chez le cotonnier.

Une autre cause de la DS moins étudiée est la sélection zygotique incluant la translocation des chromosomes étrangers (Taylor et, Igarsson, 2003, Song *et al.* 2006, Liu *et al.* 2010). Cette cause est conforme avec la présence de fragments de chromosomes et/ou de chromosomes entiers mis en évidence par nos résultats.

8.4.5.2 Conséquences de la DS sur l'analyse de l'expression du caractère au niveau des populations HRS testées

L'analyse du déterminisme génétique de l'expression du caractère « *glandless-seed and glandeed-plant* » chez les populations de l'hybride HRS testées met en évidence une liaison mineure avec les SSRs CIR058 et CIR228a, et une liaison majeure avec trois loci (BNL3590, BNL 226b et BNL3989). Cependant, le dénominateur commun observé sur toutes les trois (3) populations testées est la DS en faveur des allèles de *G. sturtianum* sur le groupe liaison c6-c25 et au niveau du SSR CIR058 localisé sur le groupe de liaison c3-c17. Ce constat laisse supposer que ces allèles de *G. sturtianum* préférentiellement transmis quelle que soit la population n'influencent pas l'expression du caractère « *glandless-seed* » chez les générations de HRS testées. En conséquence, la liaison mineure du caractère « *glandless-seed* » avec le locus SSR CIR058 trouvé avec l'analyse de la variance pourrait être la conséquence de la DS.

Par ailleurs, selon les populations testées, les trois *loci* majeurs identifiés n'expliquent au minimum que 7% et seulement 23% au maximum de la variance phénotypique. Ce résultat nous permet d'énoncer l'hypothèse selon laquelle, d'autres facteurs, ou des gènes autres que ceux identifiés comme étant liés à ces marqueurs doivent donc intervenir dans le déterminisme génétique du caractère recherché. Ces résultats sont en conformité avec ceux de Benbouza, (2004) qui a trouvé que les QTLs détectés sont sans effet majeurs et expliquent entre 8,1% et 13% de la variance phénotypique observée. Cette conclusion ouvre un champ d'étude vu que le caractère semble être polygénique. Il pourrait alors exister des QTLs à effet mineur ou d'autres non encore identifiés dans la zone chromosomique couverte par les marqueurs, ou sur d'autres chromosomes.

Mais, étant donné l'importance de la cartographie des caractères quantitatifs (QTL) en amélioration des cultures, l'influence des distorsions de ségrégation sur l'analyse des QTL doit être négligeable pour une bonne interprétation des cartes. Donc le fait que tous les 10 SSRs soient biaisés remet en cause la valeur des QTL qui seraient identifiés comme responsables du caractère recherché. Si la fréquence de recombinaison ou l'ordre des marqueurs est déterminé de manière incorrecte, les hypothèses de base de l'analyse des QTL

seront biaisées et les résultats ne seront pas précis. Ainsi en présence de DS, plusieurs auteurs ont fait état de fausses liaisons lorsqu'il y a distorsion de ségrégation (Lorieux *et al.* 1995 a, b ; Kalo *et al.* 2000, Liu *et al.* 2010). Il faut aussi ajouter que d'après Cloutier *et al.* (1997), les fortes distorsions orientées vers l'allèle du même parent favorisent la formation de fausses liaisons supplémentaires, ce qui permet d'expliquer certains de nos résultats.

8.5 Conclusion

Le suivi de l'introgession avec les 10 SSRs utilisés a montré que les allèles de *G. sturtianum* ont bien été conservés dans les différentes générations d'hybrides HRS testés. Cependant, il met aussi en évidence une forte DS en faveur du génotype hétérozygote. Cette DS permet d'expliquer l'instabilité observée chez les plantes HRS au niveau phénotypique. En outre, les résultats montrent que les facteurs de DS sont indépendants du caractère inhibition de la synthèse du gossypol dans la graine de coton qui est recherché.

La DS observée serait gouvernée par plusieurs mécanismes qui sont complexes. Ces derniers sont favorisés par la charge génétique et la pression de la sélection basée sur l'expression du caractère « *glandless-seed* » exercée au niveau des descendants de l'hybride HRS. Ainsi, chaque groupe de liaison est le siège d'un ou de plusieurs mécanismes, dont les plus importants sont : (1) la transmission préférentielle de l'allèle de *G. hirsutum* au niveau du chromosome 2, probablement influencée par un gène gamétocide; (2) la transmission préférentielle de l'allèle de *G. sturtianum* sur le c6-c25 et pour le *loci* CIR058 du groupe de liaison c3-c17, probablement influencée par un fragment et/ou un chromosome entier de *G. sturtianum* ; (3) la possible existence d'un facteur de létalité principalement véhiculé par l'ovule. Le passage systématique de tous les allèles de *G. sturtianum* avec un maintien de ceux-ci à l'état hétérozygote en BC2S6, permet d'avancer l'hypothèse de la présence encore importante des allèles de *G. sturtianum*, à travers des gros fragments de chromosomes ou de chromosomes entiers de celui-ci.

Il ressort que la DS dans notre matériel est principalement influencée par les facteurs apportés par les gamétophytes mâles, alors que l'instabilité (la létalité) est principalement influencée par des facteurs apportés par les gamétophytes femelles. Tout ceci serait gouverné par une forte sélection zygotique dirigée par des entités de *G. sturtianum* et/ou une sélection gamétique sous l'effet de gènes gamétocides.

Par ailleurs, les SSRs identifiés comme étant liés au caractère « *glandless-seed* » n'expliquent qu'une partie de la variabilité phénotypique.

La meilleure manière d'expliquer tous les facteurs et mécanismes qui entraînent les dysfonctionnements observés dans les descendance de HRS est d'analyser son étendue sur tout son génome. A cet effet, il serait nécessaire de faire un screening pour saturer le génome afin de mieux apprécier la présence de *G. sturtianum* chez l'hybride HRS.

9 IDENTIFICATION DE NOUVEAUX MARQUEURS SSRs SPÉCIFIQUES DE *G. STURTIANUM* DANS LA DESCENDANCE DE L'HYBRIDE HRS

9.1 Introduction

Les résultats obtenus jusqu'à présent montrent qu'il est évident que les 10 SSRs étudiés ne permettent pas d'expliquer toute la variabilité phénotypique observée. Le suivi de l'introgression de marqueurs SSRs et la tentative de cartographie de ceux-ci a permis de mettre en évidence l'existence d'importantes distorsions de ségrégation dans les descendance étudiées susceptibles de se traduire par la présence de longs fragments d'ADN, voire de chromosomes entiers de *G. sturtianum*.

Pour vérifier cette hypothèse, un nouveau screening des 13 groupes de liaison du cotonnier a été effectué, en vue de révéler d'éventuels nouveaux allèles de *G. sturtianum* au niveau des chromosomes déjà identifiés et sur les autres chromosomes qui sont supposés ne pas en porter.

Cent et un (101) marqueurs microsatellites ont été utilisés pour cribler les 13 groupes de liaison du cotonnier, au niveau des populations BC3S4, ♂BC4S3 et ♀BC4S3, BC2S6 et BC2S7.

9.2 Matériel et méthode

9.2.1 Matériel Végétal

A part les graines BC2S7 qui ont été produites au Sénégal, toutes les graines à l'origine des plantes analysées ont été produites dans les serres tropicales de l'Université de Liège Gembloux Agro-Bio Tech / Belgique. Les conditions de production des deux sites sont décrites au niveau du chapitre 4.

Trente (30) individus ont été testés (Tableau 35). Il s'agit de 27 individus appartenant aux descendance étudiées de l'hybride HRS dans le cadre de notre thèse, toutes les générations confondues, et des trois parents constitutifs de ce dernier (*G. hirsutum*, *G. raimondii* et *G. sturtianum*).

Tableau 35: Répartition par génération des 27 individus HRS utilisés pour l'identification de nouveaux marqueurs SSRs

Génération	BC2S6	BC2S7	BC3S4	♀BC4S3	♂BC4S3
Nombre de graines analysées	9	2	6	6	4

9.2.2 Méthode

Le screening des 101 SSRs a commencé par une extraction de l'ADN génomique total, suivie d'une amplification des SSRs par PCR et d'une révélation au nitrate d'argent. Le détail des méthodologies utilisées est expliqué au niveau du chapitre 8. Le tableau 36 donne la liste des 101 SSRs utilisés pour révéler des séquences génétiques spécifiques de *G. sturtianum* non encore identifiées et leur localisation chromosomique.

Tableau 36: Liste des 101 amorces utilisées pour révéler l'introgession de nouveaux marqueurs SSRs spécifiques de *G. sturtianum* dans les descendances les plus avancées de l'hybride HRS

Marqueurs SSR testés	Position chromosomique	Marqueurs SSR testés	Position chromosomique
CIR009	C1	NAU1164	C8
CIR055	C1	JESPRO66	C8
CIR089	C1	BNL2590	C9
CIR241	C1	BNL3779	C9
BNL1350	C1	NAU3365	C9
BNL3888	C1	NAU0864	C9
BNL1897	C2	MUSS083	C9
NAU1246	C2	MUSS547	C9
NAU5384	C2	CIR353	C9
UNIG 25AO2	C2	BNL2847	C9
PAR 851	C2	CIR291e	C10
NAU3875	C2	CIR400	C10
JESPR179	C2	BNL3563	C10
MUSS294	C2	BNL3895	C10
MUSS599	C2	NAU1169	C10
CIR332	C3	CIR104	C10
BNL3463	C3	CIR372	C10
MUBS1101	C3	CIR003	C11
BNL1059	C3	CIR051	C11
NAU0884	C3	CIR196	C11
JESPR107	C3	CIR385	C11
CIR263	C3	CIR399	C11
BNL2572	C4	CIR416	C11
NAU2291	C4	BNL625	C11
NAU0869	C4	NAU0980	C11
CIR218	C4	JESPR135	C11
BNL530	C4	MUBS1000	C11
CIR027 b	C4	MUBS1001	C11
CIR249	C4	BNL2805	C11
BNL1878	C5	CIR304	C11
BNL2448b	C5	CIR042	C12
BNL2662	C5	CIR148	C12
BNL3029	C5	CIR362	C12
NAU1151	C5	BNL598	C12
NAU2001	C5	BNL1227b	C12
NAU0861	C5	BNL1673	C12
NAU2029	C5	NAU1278	C12
CIR301	C5	NAU4089	C12
CIR328	C5	NAU0915	C12
CIR033	C6	MUSS026	C12
CIR203	C6	BNL3261	C12
BNL2884	C6	BNL1679	C12
CIR405	C6	MUBS1117	C12
BNL2569	C6	CIR406	C13
CIR028	C7	NAU1023	C13
CIR262	C7	NAU1215	C13
CIR320	C7	CIR054	C13
CIR393	C7	CIR057	C13
CIR412	C7	CIR380	C13
BNL1604	C7	BNL3623	C13
CIR244	C8		

Source: cotton marker database (CMD)

Les SSRs en rouge représentent les nouveaux, qui ont montré une amplification d'allèles de *G. sturtianum*

9.3 Résultats

9.3.1 Identification de nouveaux SSRs

Parmi les 101 SSRs testés, appartenant aux 13 groupes de liaison de *G. hirsutum*, 19 soit 18,81%, génèrent des allèles spécifiques de *G. sturtianum*. Ils figurent en rouge dans le tableau 36. Parmi ceux-ci, quatorze (14) sont présents chez les génotypes testés. Ils se retrouvent dans 2 des 3 groupes de liaison déjà identifiés comme ayant conservé des allèles spécifiques de *G. sturtianum* ainsi que sur quatre autres chromosomes. Au total, 24 allèles spécifiques de *G. sturtianum* sont portés par 7 groupes de liaison : aux groupes c2-c14, c3-17 et c6-c25 déjà identifiés par Benbouza (2004), s'ajoutent à présent les groupes c4-c22, c5-c19, c11-c21 et c12-c26.

La figure 26 donne les chromosomes sur lesquels, il est observé une introgression d'allèles de *G. sturtianum*. Pour chacun de ces chromosomes la position des nouveaux SSRs que nous avons testés est localisée, en les distinguant en quatre catégories : (i) les 10 SSRs déjà identifiés, qui montrent les allèles de *G. sturtianum* qui sont conservés dans le matériel végétal étudié, (ii) les quatorze (14) nouveaux SSRs identifiés qui montrent des allèles de *G. sturtianum* dans le matériel végétal étudié, (iii) les SSRs polymorphes qui ne montrent pas d'introgression de *G. sturtianum* et (iv) les SSRs qui n'étaient pas polymorphes. Les 10 SSRs spécifiques de *G. sturtianum* identifiés par Benbouza (2004) se retrouvent également sur cette carte. Les nouvelles données obtenues vont dans le sens de l'introgression de chromosomes quasi entiers de *G. sturtianum* pour les groupes de liaison c2-c14, c3-c17, c6-c25. Pour ceux-ci en effet, presque tous les marqueurs testés mettent en évidence : soit l'introgression d'un segment de chromosome de *G. sturtianum* (pour les marqueurs polymorphes), soit la présence d'un fragment de chromosome qui peut provenir de l'espèce donneuse ou de *G. hirsutum* (pour les marqueurs non polymorphes). Dans ce dernier cas, la présence quasi systématique d'allèles spécifiques de *G. sturtianum* à leur proximité plaide plutôt en faveur de leur appartenance à l'espèce donneuse. A ce niveau, la présence ponctuelle de SSRs spécifiques de *G. hirsutum* pourrait s'expliquer par l'occurrence de recombinaisons localisées.

L'introgression d'allèles spécifiques de *G. sturtianum* est nettement plus ponctuelle au niveau des groupes de liaison c5, c11 et c12 ; ce qui plaide plutôt en faveur de l'existence de recombinaisons ponctuelles entre les chromosomes des espèces parentales. Le chromosome c4 présente trois SSRs spécifiques de *G. sturtianum* sur les 5 marqueurs polymorphes testés.

Le tableau 37 donne le génotype des 27 individus HRS testés pour les 24 marqueurs SSRs pour lesquels au moins un allèle spécifique de *G. sturtianum* peut être présent. Selon la génération analysée, des profils d'introgression de *G. sturtianum* très variables sont observés chez les individus testés.

9.3.1.1 Les populations BC2S6 et BC2S7

Les résultats montrent que la majorité des marqueurs SSRs testés sur les populations BC2S6 et BC2S7 sont hétérozygotes. Les populations BC2S6 et BC2S7 semblent être homogènes. En effet, les individus testés ont montré le même profil quelle que soit leur teneur en gossypol, au niveau de dix (10) SSRs sur les 14 identifiés. Parmi ceux-ci, un (1) localisé sur le c2 (MUSS599) est homozygote *G. sturtianum*, cinq (5) localisés sur le c2 (MUSS294, NAU3875), le c3 (NAU0884 et JESPER107) et la c4 (CIR294) sont hétérozygotes et quatre (4) localisés sur le c4 (CIR218 et BNL530) et le c5 (CIR301 et CIR328) sont homozygotes *G. hirsutum* (Tableau 37).

Au niveau des quatre autres SSRs, des recombinaisons sont observées sur les SSRs, localisés sur le c2 (JESPR179) et le c3 (BNL1059). Par contre, une perte d'allèles de *G. sturtianum* est constatée sur le c11 (BNL2805) et le c12 (BNL3261) respectivement pour les générations BC2S6 et la BC2S7.

9.3.1.2 Les populations BC3S4, ♂BC4S3 et ♀BC4S3

Le profil génétique des populations BC3S4, ♂BC4S3 et ♀BC4S3 met en évidence des populations en ségrégation, avec une diminution de la présence des allèles de *G. sturtianum*. La réduction des allèles de *G. sturtianum* est plus marquée chez ♂BC4S3, lorsque le cotonnier cultivé est utilisé comme parent femelle. Dans ce cas, tous les individus sont à 100% homozygotes *G. hirsutum* pour au moins sept (7) des 14 (quatorze) nouveaux marqueurs identifiés. Ces derniers sont localisés sur le c2 (JESPR 179), le c3 (BNL1059), le c4 (CIR 218, BNL 530), le c5 (CIR 301, CIR 328) et le c12 (BNL 3261).

Néanmoins, la majorité des marqueurs SSRs testés sur les populations BC3S4 et ♀BC4S3, sont hétérozygotes. Chez ces populations, respectivement 10 et 7 sur les 14 SSRs identifiés, ont des taux d'hétérozygotie compris entre 50% et 100%, et respectivement 5 et 10 SSRs sont homozygotes *G. hirsutum* avec des taux allant de 50 à 100%. Mais, chez la génération ♂BC4S3 seulement 3 sur les 14 SSRs ont des taux d'hétérozygoties compris respectivement entre 50% et 100%.

Une analyse de toutes les générations confondues montre que le SSR BNL3261 sur le c12, qui est quasi 100% homozygote *G. sturtianum* chez la BC2S6 et 100% hétérozygote chez la BC2S7, ne donne pas d'allèle spécifique de *G. sturtianum* au niveau des générations BC3S4, ♂BC4S3 et ♀BC4S3. Cependant, le nombre d'individus testés est trop petit pour tirer une conclusion.

Tableau 37: Conservation des SSRs spécifiques *G. sturtianum* chez les 27 individus testés appartenant aux générations avancées de la descendance de HRS

Génération	SSRs	MUSS599	MUSS294	BNL3590	JESPR179	NAU3875	BNL3971	BNL2443b	CIR058	BNL1059	NAU0884	BNL226b	BNL3989	CIR228a	JESPR107	CIR218	BNL530	CIR249	CIR301	CIR328	BNL2805	BNL3261	BNL3359	BNL3436	BNL1153	
	Chromosome	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C3	C3	C3	C3	C3	C3	C3	C3	C4	C4	C4	C5	C5	C11	C12	C6	C25	C25	
	Distance (cM) Teneur en gossypol (%)	6,5	11	27,8	51,1	63,2	84,3	25,4	39,7	41	58.0	67,6	90,5	137,3	194.5	35.8	74.0	125.7	253.1	337.8	100.0	173.6	0	26.6	69,3	
BC3S4	0.07	HS	HS	HS	HS	HS	HH	HS	HS	HS	HS	HS	HH	HS	HS	HS	HH	HRS	HS	HH	HS	HH	HS	HS	HS	
	1.13	HS	SS	HH	0	HS	HS	HS	HS	HS	HS	HS	HS	HS	HS	HS	HS	HH	HH?	HH	HS	HH	HS	HS	HS	
	1.09	HH	HH	HH	HH	HS	HS	HH	HR	HH	HH	HS	HS	HS	HS	HH	HH	HH	HH	HH	HS	HH	HS	HS	HS	
	0.13	HS	HH	HS	HH	HS	HS	HS	SS	HH	HS	HS	HS	HS	HS	HH	HH	HH	HRS	HH	HH	HS	HH	HS	HS	HS
	0.04	SS	SS	HH	SS	HS	HS	HS	SS	HS	HS	HS	HS	HS	HS	HS	HS	HS	HRS	HS	HS	HS	HH	HS	HS	HS
	0.96	HS	HS	HS	HS	HS	HS	HS	HS	HS	HS	HS	HS	HS	HS	HS	HS	HS	HRS	HS	HS	HS	HH	HS	HS	HS
♂ BC4S3	1.46	HH	HH	HH	HH	HH	HS	HH	HS	HH	HH	HH	HH	HS	HS	HH	HH	HR	HH	HH	HS	HH	HS	HS	HS	
	0.63	HS	HS	HS	HH	HS	HH	HS	HS	HH	HS	HH	HS	HS	HS	HH	HH	HRS	HH	HH	HS	HH	HS	HS	HS	
	0.72	HH	HH	HS	HH	HH	HS	HH	HS	HH	HS	HH	HH	HS	HS	HH	HH	HH	HH	HH	HH	HH	HS	HS	HS	
	1.03	HH	HH	HH	HH	HH	HS	HH	HH	HH	HS	HS	HH	HH	HH	HH	HH	HH	HH	HH	HS	HH	HS	HS	HS	
♀ BC4S3	0.05	HH	HH	HS	HH	HH	HH	HH	HS	HH	HS	HS	HH	HS	HS	HS	HS	HR	HS	HS+NA	HS	HH	HS	HS	HS	
	0.10	HS	HS	HS	HH	HS	HH	HH	HS	HS	HS	HS	HH	HS	HS	HS	HS	HS	HS	HS+NA	HS	HH	HS	HS	HS	
	0.96	HH	HH	HH	HH	HH	HH	HH	HS	HH	HH	HH	HH	HS	HS	HS	HH	HH	HR	HH	HH	HS	HH	HS	HS	
	0.97	HH	HH	HH	HH	HH	HH	HH	HS	HS	HH	HH	HH	HS	HS	HS	HS	HS	HR	HS	HS	HS	HH	HS	HS	
	0.16	0	HH	0	0	HS	HS	0	HH	HH	HS	HS	0	SS	HS	HH	HH	0	HH	0	HS	HH	0	HS	0	
	0.27	HH	HH	HS	HH	HH	HH	HH	HH	HS	HS	HH	HH	HS	HS	HS	HH	HS	HS	HS	HS+NA	HSR	HH	HS	HS	HS
BC2S6	0.03	SS	HS	HS	SS	HS	HS	HS	SR	HS	HS	HS	HS	HS	HS	HS	HH	HH	HRS	HH	HH	HSR	SS	HS	HS	
	0.20	SS	HS	HS	SS	HS	HS	HS	HS	HS	HS	HS	HS	HS	HS	HS	HH	HH	HRS	HH	HH	HSR	NA	HS	HS	
	0.52	SS	HS	HS	SS	HS	SS	HS	HS	HS	HS	HS	HS	HS	HS	HS	HH	HH	HRS	HH	HH	HR	SS	HS	HS	
	0.6	SS	HS	HS	SS	HS	SS	HS	HS	HS	HS	HS	HS	HS	HS	HS	HH	HH	HRS	HH	HH	HR	SS	HS	HS	
	0.11	SS	HS	HS	HH	HS	HS	HS	HS	HH	HS	HS	HS	HS	HS	HS	HH	HH	HRS	HH	HH	HSR	SS	HS	HS	
	0.13	SS	HS	HS	SS	HS	HS	HS	HS	HS	HS	HS	HS	HS	HS	HS	HH	HH	HRS	HH	HH	HSR	SS	HS	HS	
	0.87	SS	HS	HS	SS	HS	HS	HS	HS	HS	HS	HS	HS	HS	HS	HS	HH	HH	HRS	HH	HH	HR	SS	HS	HS	
	0.64	SS	HS	HS	SS	HS	HS	HS	HS	HS	HS	HS	HS	HS	HS	HS	HH	HH	HRS	HH	HH	HR	SS	HS	HS	
	0.15	SS	HS	HS	SS	HS	HS	HS	HS	HS	HS	HS	HS	HS	HS	HS	HH	HH	HRS	HH	HH	HS	SS	HS	HS	
BC2S7	0.34	SS	HS	0	SS	HS	SS	HS	SS	HH	HS	HS	HS	HS	HS	HS	HH	HH	HRS	HH	HH+NA	HSR	HS	HS	HS	
	0.02	SS	HS	HH	SS	HS	SS	HS	SS	HS	HS	HS	HS	HS	HS	HS	HH	HH	HS	HH	HH+NA	HSR	HS	HS	HS	

HS= Hétérozygote *G. hirsutum* – *G. sturtianum* ; HH= homozygote *G. hirsutum*; SS= homozygote *G. sturtianum*; HRS=hétérozygote *G. hirsutum* - *G. sturtianum* – *G. raimondii*; NA= nouveau allèle ; 0 = pas d'amplification ; SSRs en rouge= les 10 SSRs utilisés.

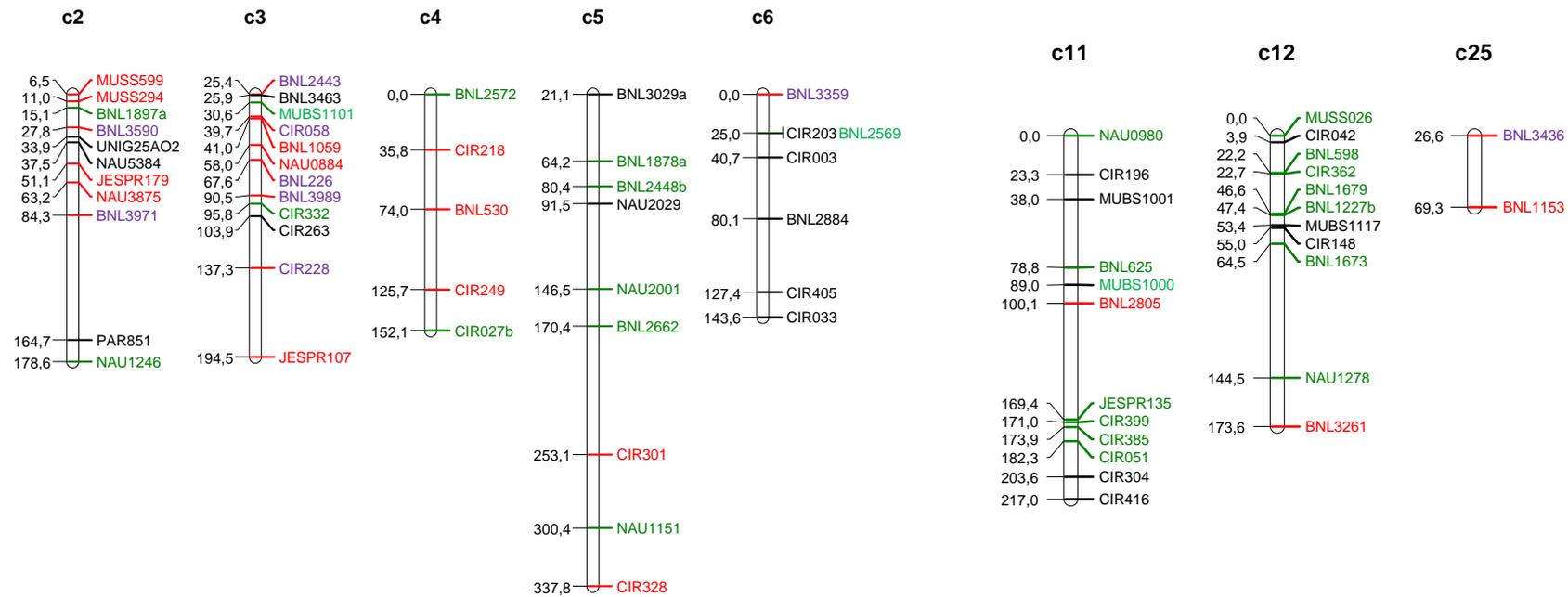


Figure 26: Cartographie des nouveaux SSRs testés et de ceux identifiés par Benbouza (2004) chez les 7 groupes de liaison qui présentent une introgression de SSRs spécifiques de *G. sturtianum*

Violet = Les 10 SSRs introgressés déjà identifiés

Rouge = les 14 nouveaux SSRs qui montrent des allèles introgressés de *G. sturtianum*

Vert = Les SSRs polymorphes qui ne montrent pas d'introgression d'allèles de *G. sturtianum*

Noir = Les SSRs non polymorphes

9.4 Discussion

Le screening réalisé avec les 101 SSRs sur les 13 groupes de liaison du cotonnier a permis de mettre en évidence la présence chez les générations avancées issues de l'hybride HRS de 14 nouveaux allèles spécifiques *G. sturtianum* en plus des dix qu'avait trouvé Benbouza (2004).

La moitié des 14 nouveaux allèles SSRs *sturtianum* identifiés se trouvent au niveau des chromosomes c2 et c3, ce qui confirme la présence massive de matériel génétique de l'espèce donneuse au niveau de ces groupes de liaison. Les autres nouveaux allèles SSRs *G. sturtianum* sont dispersés au niveau des chromosomes c4, c5, c11 et c12. Benbouza *et al.* (2009) avaient déjà cartographié une série d'allèles spécifiques de *G. sturtianum* au niveau de ces chromosomes, mais seul ceux des trois groupes de liaison c2-c14, c3-c17 et c6-c25 étaient conservés jusqu'à la BC2S5 et la BC3S4.

Il est important de signaler que le marqueur BNL3261 spécifique de *G. sturtianum* sur le c12 est présent dans les populations BC2S6 et BC2S7, mais est absent au niveau des générations BC3S4, ♀BC4S3 et ♂BC4S3. Cela montre que la série d'autofécondation a effectivement contribué au maintien de fragments de *G. sturtianum* qui peuvent être éliminés lorsqu'on procède à un backcross. Le c12 porte le locus GL_2 qui joue un rôle prédominant dans le contrôle de la teneur en gossypol des amandes des graines. L'introggression d'un allèle provenant de *G. sturtianum* au niveau de celui-ci pourrait expliquer la diminution de la présence de glandes à gossypol observées chez certains descendants de HRS comme dans le cas des allèles GL_2^b et GL_2^c mis en évidence respectivement par Zhu *et al.* (2001) et Kohel et Lee (1984). Le locus GL_2^c se situe selon Dong *et al.* (2007) à proximité des SSRs NAU2251b, NAU3860b, STV033 et CIR362. L'allèle du SSR BNL3261 spécifique de *G. sturtianum* que nous avons identifié chez les générations BC2S6 et BC2S7 se situe à plus de 150 CM de ceux-ci, ce qui signifie qu'à moins d'un bouleversement majeur de l'ordre des gènes sur le chromosome 12, il n'est pas possible que le fragment d'ADN de *G. sturtianum* correspondant à ce marqueur inclue le locus GL_2 . Ces résultats ne permettent cependant pas d'affirmer qu'une introggression d'un autre fragment d'ADN de l'espèce australienne n'a pas pu avoir lieu à proximité du locus GL_2 . Il serait donc, judicieux lors de prochains travaux de screenings au moyen de marqueurs moléculaires de cibler les autres SSRs dans cette région du chromosome 12 pour déterminer si elle n'a pas été l'objet d'une introggression par un fragment d'ADN de *G. sturtianum* porteur d'un allèle spécifique du gène GL_2^c . Ceci afin de

vérifier l'hypothèse du contrôle du caractère « *glandless-seed* » par cet allèle australien chez les descendants de HRS qui présentent ce caractère.

Ces nouveaux SSRs identifiés vont nous permettre d'assigner un nombre plus élevé de marqueurs à *G. sturtianum* chez les descendance de HRS et qui pourront être utilisés dans l'identification des régions qui interviennent dans le contrôle du caractère recherché.

Par ailleurs, le tableau 37 montre que la teneur en gossypol des graines dont sont issus les individus testés, toutes générations confondues, variait de 0,02% à 1,46%, et aucun profil génétique particulier des nouveaux SSRs identifiés ne semble être associé à l'expression du caractère recherché.

9.5 Conclusion

Une plus grande proportion de matériel génétique de *G. sturtianum* au niveau du matériel végétal analysé est observée par rapport à ce que l'on pouvait supposer sur base des résultats obtenus par Benbouza (2004). La réalisation de screenings complémentaires permettrait peut-être d'en identifier encore plus.

Les 14 nouveaux SSRs identifiés pourront être utilisés à l'avenir dans des analyses visant à associer l'expression du caractère recherché à ces marqueurs. Le nombre d'individus analysés ici par génération était beaucoup trop faible pour tirer des conclusions valables de la réalisation d'une analyse en simple marqueur.

Sur base des nouveaux résultats obtenus concernant la concentration de marqueurs spécifiques de *G. sturtianum* au niveau des groupes de liaison c2 et c3, il serait intéressant de vérifier avec des outils relevant de la cytogénétique moléculaire si l'hypothèse de la présence de chromosomes entiers de *G. sturtianum* ou d'importants fragments de chromosomes de cette espèce se confirme.

10 ANALYSE AU MOYEN DE MÉTHODES CYTOGÉNÉTIQUES CLASSIQUE ET MOLÉCULAIRE D'UNE PARTIE DE LA DESCENDANCE DE L'HYBRIDE HRS

10.1 Introduction

Les résultats présentés dans les chapitres précédents, ont mis en évidence de nouveaux SSRs qui confirment la présence encore importante de matériel génétique provenant de *G. sturtianum*. En outre, ils ont aussi montré la possible intervention de chromosomes entiers et/ou de grands fragments de chromosomes de *G. sturtianum* dans la DS.

Dans le but de vérifier ces résultats et d'apprécier les possibilités d'échanges de matériel génétique chez les descendants de l'hybride HRS ainsi que leur stabilité génétique, nous avons réalisé des analyses relevant de la cytogénétique classique et de la cytogénétique moléculaire sur une partie de notre matériel d'étude.

10.2 Matériel et méthodes

10.2.1 Matériel

La réalisation des analyses cytogénétiques est particulièrement fastidieuse du fait de la complexité des techniques à mettre en œuvre et de la nécessité d'appliquer celles-ci sur des plaques métaphasiques qui se trouvent exactement au stade adéquat. Un grand nombre de coupes est alors nécessaire pour observer celles qui conviennent. Pour ces raisons, nous n'avons pu analyser qu'un faible nombre d'individus par génération. De plus, tous les individus testés n'ont pas nécessairement fait l'objet des mêmes analyses cytogénétiques classiques ou moléculaire. Le tableau 38 reprend l'ensemble des générations qui ont été étudiées et la teneur en gossypol des graines dont sont issues les plantes analysées pour chacune de celles-ci.

Tableau 38: Liste des plantes étudiées et teneur en gossypol des graines dont elles sont issues

Génération	Numéro des plantes HRS analysées	pourcentage gossypol de la graine d'origine de la plante analysée
BC3S4	862	0.04
	829	0.08
	814	0.14
♀BC4S3	20	0,16
	11	1,14
♀BC4S4/20	43	0,06
	57	1,08
	58	0,88
	67	1,29
	87	0,78
	96	0,48
♂BC4S3	4	0,94
	5	0,83
	6	0,98
♂BC4S4/6	6	0,97
BC2S7	34	0,02
	44	0,25
	29	0,35
	22	0,35
	69	0,15
	47	0,6

10.2.2 Analyse de la fertilité pollinique

La fertilité pollinique des plantes est évaluée après comptage au microscope de 1000 grains de pollen dans une goutte d'acéto-carmin à 1,5% (1,5% de carmin dans 45% d'acide acétique). Les grains de pollen d'une fleur complètement épanouie sont colorés pendant 30 minutes dans la solution de carmin. La fertilité pollinique en (%) correspond au pourcentage de grains colorés en prenant en compte leur forme et leur taille.

10.2.3 Observation des appariements chromosomiques

Les observations du nombre de chromosomes et des appariements à la méiose ont été effectuées sur des cellules mères de pollen (CMP). Les jeunes boutons floraux sont prélevés (environ 10 par plante si possible) au moment où il y a le plus d'ensoleillement, pour maximiser les chances de tomber sur un bouton en métaphase I ou anaphase I. Par la suite, ils sont débarrassés de leurs périanthes, puis trempés pendant 48 à 72h à 4°C, dans une solution

appelée ; Carnoy (6 volumes d'éthanol absolu/ 3 volumes de chloroforme/ 1 volume d'acide acétique glacial) dans lequel on a ajouté une pincée de fer, pour fixer la mitose. Puis, après deux rinçages avec une solution d'éthanol à 70%, les boutons floraux sont conservés dans cette dernière à 4°C, jusqu'à utilisation.

La coloration se fait par écrasement sur une lame des CMP dans une goutte d'acéto-carmin (1,5%). Avec une loupe binoculaire on observe le stade de division mitotique. Si on tombe sur des CMP en métaphase, la lame, débarrassée de ses débris, est recouverte d'une lamelle. La préparation est chauffée quelques secondes en évitant l'ébullition. Les plaques chromosomiques sont étalées par une pression uniforme sur la préparation qui est préalablement disposée entre deux couches de papiers absorbants pour éponger en même temps l'excès de colorant. La préparation est observée immédiatement au fort grossissement avec un microscope ou conservée à très basse température (-20°C ou -80°C) jusqu'à utilisation.

10.2.4 Étalement et observation des chromosomes des cellules de pointes de racine

Les étalements chromosomiques peuvent être obtenus à partir de n'importe quel tissu constitué de cellules indifférenciées présentant un bon index mitotique : méristèmes racinaires, carpelles, méristèmes apicaux, boutons floraux ou anthères. Dans notre cas, nous avons utilisé les méristèmes racinaires.

10.2.4.1 *Prélèvement et traitement des pointes de racine*

Les racines (0,5 à 1 cm de long) sont prélevées sur des plantes en pot ou à partir de graines germées. Si la plante est adulte, il est nécessaire de la repoter une semaine avant utilisation pour favoriser la formation de nouvelles racines. L'obtention de pointes de racine à partir de graines de cotonnier s'obtient de la manière suivante : après élimination de leur duvet cellulosique à l'acide sulfurique à 94% et scarification de leur tégument, les graines sont mises à germer sur papier filtre humide, en boîte de Pétri à 30°C. Les pointes de racines sont prélevées au bout de 24h. Cependant, on peut attendre de 48 à 72h pour les prélever si nécessaire.

Les racines prélevées sont directement trempées dans une solution à 0,04% de 0,8-hydroxyquinoline pendant 4 h à température ambiante et à l'obscurité pour bloquer les cellules en métaphase par l'inhibition des fuseaux chromatiques. Elles sont ensuite fixées pendant 48 heures à 4°C dans une solution de Carnoy I (3 volumes d'éthanol / 1 volume

d'acide acétique : 3 :1) préparée quelques minutes avant utilisation. Les racines sont par la suite conservées dans de l'éthanol 70% ou dans le Carnoy I (3: 1) à 4°C jusqu'à leur utilisation.

10.2.4.2 *Digestion et production de protoplastes*

Cette étape est très importante car les parois des cellules non digérées ne peuvent être traversées par les sondes d'ADN. Les racines sont d'abord rincées 2 fois 10 min dans de l'eau distillée, puis hydrolysées pour dégrader la matrice extra cellulaire dans du 0,25 N HCl pendant 10 min. Ensuite elles sont encore rincées 1 fois 10 min dans de l'eau distillée, trempées dans le tampon citrate (trisodium citrate-dihydrate) 10 min pour favoriser l'activité des enzymes à l'étape suivante. Ensuite, une extrémité distale de pointe de racine est sectionnée et digérée dans 15 à 20µl d'une solution enzymatique (0,25g de cellulase Onozuka R-10 ; 0,05g de pectolyase Y-23 ; 5ml de tampon citrate), pendant précisément 1h à 37°C. Enfin, on prélève délicatement les explants avec une pipette Pasteur et on les rince dans de l'eau distillée pendant 10 min.

10.2.4.3 *Étalement des chromosomes*

L'étalement s'effectue sur une lame préalablement traitée au Carnoy I (3:1). Avec une pipette Pasteur, l'explant est prélevé et placé sur la lame. On élimine ensuite l'excès d'eau à l'aide de la pipette pasteur et de lamelles de papier buvard puis, on dépose sur l'explant 1 à 2 gouttes de la solution de Carnoy I (3:1) fraîchement préparée et on étale sur la lame les protoplastes à l'aide d'une pince fine puis on laisse sécher la lame.

Les préparations chromosomiques peuvent être conservées à -20°C ou -80°C jusqu'à leur utilisation pour l'hybridation *in situ*.

10.2.5 Hybridation in situ génomique (GISH)

L'hybridation *in situ* génomique se déroule en plusieurs étapes : le marquage des sondes génomiques, l'hybridation proprement dite, la détection et la contre coloration.

10.2.5.1 *Marquage des sondes génomiques*

L'ADN total est marqué avec la méthode utilisant la digoxigenin-11-dUTP et la biotin-14-dATP selon le protocole de Roche (2004). On a besoin de 150 – 250ng d'ADN pour le marquage d'une lame. Les sondes utilisées dans notre travail ont été marquées comme suit :

- pour le génome (AD) h : l'ADN génomique de *G. hirsutum* a été marqué à la biotine (Biot) plus du DNTPs, et incubée à 16°C 1h30.

- pour le génome C1 : l'ADN génomique de *G. sturtianum* a été marqué à la digoxigénine (Dig), et incubé à 15°C pendant 1 h.

La longueur des fragments qui doit être comprise entre 200 et 500 pb est contrôlée sur un gel d'agarose à 0,8 ou à 1% avec un marqueur de poids moléculaire appelé smart Ladder. Dès que la longueur des fragments se situe dans l'intervalle indiquée, la réaction est alors arrêtée avec un tampon d'arrêt (0,5M EDTA) et la solution est incubée à 60°C pendant 10 min. Les sondes marquées sont par la suite, précipitées dans 1/10 de leur volume d'acétate de sodium 3M et 2 fois leur volume de solution d'éthanol absolu (100%) froid (à -20°C). Les sondes ainsi précipitées sont mises en suspension dans une solution de TE (Tris – EDTA).

10.2.5.2 Hybridation in situ

- Préparation des lames

L'aire d'hybridation est d'abord délimitée sur la lame, soit après observation à la lumière blanche ou au DAPI (4'.6-diamidino-2-phenylindole) 2 µg/ml (2 µl DAPI+ 98 µl de vectashield). Il s'agit d'un colorant spécifique de l'ADN qui permet de colorer tous les chromosomes en bleu.

Les lames sont séchées au moins 1 h ou une nuit à 37°C, après avoir été préalablement nettoyées pendant 30 min dans du Carnoy I (3:1) puis deux fois 5 min dans de l'éthanol à 96% pour enlever le colorant.

- Traitement à la RNase

Les lames sont d'abord traitées avec 150 µl de solution de RNase à 1 µg/ml dans du 2SSC (Standard Saline Citrate), pour éviter les bruits de fond dû à l'hybridation de la sonde avec les ARN cytoplasmiques et nucléaires. Puis, elles sont déposées dans un environnement hermétique, humide et protégé de la lumière (grande boîte tapissée de papier buvard imbibé de 2SSC) à 37°C durant 45 min.

- Dénaturation

La dénaturation s'effectue avec de la Formamide désionisé à 70% dans du 2SSC à 70°C durant 2 min30 secondes précisément sous la hotte. Les lames sont ensuite plongées 3 min dans un bain de 2SSC froid, puis successivement 5 min dans une série de bains d'éthanol à

70%, 95%, 100% à froid (-20°C), pour la déshydratation. Les lames sont alors séchées verticalement à la température ambiante.

- Hybridation

Un volume de 30 µl de tampon d'hybridation est déposé au niveau de la zone délimitée sur une lame. Cette dernière est alors recouverte d'une lamelle souple puis placée dans l'atmosphère humide utilisée préalablement à 37°C durant 16 h ou toute une nuit. Le tampon d'hybridation est constitué de 15 µl de formamide désionisé, 6 µl de dextran sulfate, 3 µl de 20SSC, 1 µl de sodium dodecyl sulfate (SDS 20%), 150 à 250 ng de sondes marquée (Dig et Biot), complété avec de l'eau distillée à 30 µl. Cette solution est ensuite dénaturée avec de l'eau bouillante pendant 10min et placée immédiatement dans la glace.

10.2.5.3 Lavages

Les lavages ont pour objectif de dissocier les hybridations non-spécifiques et imparfaites. La lame séparée de la lamelle souple est trempée successivement 3 fois 10min dans du 2SSC, 0,5SSC, 0,1SSC à 42°C et enfin 10min dans du 2SSC à la température ambiante.

10.2.5.4 La détection

Avant de commencer la détection, il faut d'abord bloquer les sites où les marqueurs ne doivent pas s'hybrider. On dépose alors 200 µl d'une solution de 5% serum albumine bovine (BSA)-4SSC/Tween sur la lame. Recouverte d'une lamelle souple, la lame est placée dans la chambre d'incubation humidifiée au 2SSC 10 min à 37°C.

La détection se fait en trois étapes et dans l'obscurité car on utilise des fluorochromes qui se dégradent à la lumière. Pour chaque étape, on dépose 50 µl de solution de détection (D) (Tableau 39) sur la lame qu'on recouvre ensuite avec une lamelle souple. La lame est placée dans la chambre d'incubation humidifiée avec 2SSC 45 min à 37°C. La lame est retirée après chaque incubation et rincée 2 fois 5 min à 37°C dans une solution de TNT (100 mM Tris HCL (pH 7,5), 150 mM NaCl, 0,05% de tween 20).

Tableau 39: Composition de la solution de détection pour chaque étape

Etape1 (D1)	49,75 µl de TNB (100 mM Tris HCL (pH 7,5), 150 mM NaCl, 0,5% Blocking Reagent) + 0,25 µl de Texas Red-avidine = 50 µl
Etape2 (D2)	42,5 µl de TNB +2,5 µl de Biotinilated anti-avidine+ 5 µl d'Anti-dig FITC = 50 µl
Etape3 (D3)	49,6 µl de TNB 0,25 µl de Texas Red-avidine + 0,15 µl de FITC conjugated rabbit anti sheep =50 µl

Après la détection, les lames sont plongées dans du 2SSC 3 min à la température ambiante (TA), puis déshydratées par des passages de 3 min dans les bains d'éthanol à 70%, 95%, 100% à la TA, et séchées verticalement à l'abri de la lumière.

10.2.5.5 *La contre-coloration*

La contre-coloration de l'ADN se fait avec 20 à 50 µl de DAPI en fonction de la zone ciblée. Il faut couvrir la lame d'une lamelle en verre, et enlever l'excès de solution avec du papier absorbant. La préparation (lame et lamelle) est scellée avec du vernis à ongle incolore. Elle peut être observée immédiatement ou conservée à l'abri de la lumière à 4°C jusqu'à utilisation.

10.2.5.6 *Observation au microscope :*

Les résultats obtenus sont enregistrés par un système de microscope (Nikon Eclipse E800) muni d'une caméra (JVC KY-F 58E) couplée à un ordinateur. Les chromosomes sont visualisés en microscopie à fluorescence à l'aide de filtres qui permettent de sélectionner les longueurs d'ondes d'émission et d'excitation des fluorochromes. Les images des bonnes plaques métaphasiques sont enregistrées avec les trois filtres : DAPI (bleu) ; FITC (vert) ; Texas Red (rouge).

Les photos des bonnes plaques métaphasiques prises dans les mêmes positions avec les différents filtres sont superposées à l'aide de logiciels de manipulation d'images pour bien visualiser le caryotype de l'espèce étudiée. Dans notre cas nous utilisons Adobe photoshop 7 et Photostudio 2000.

10.3 Résultats

10.3.1 Mise en évidence de l'hétérozygotie structurelle chez l'hybride HRS

10.3.1.1 *Comptage des chromosomes au DAPI*

Un étalement chromosomique à partir des racines issues de graines germées de différents descendants de l'hybrides HRS a été effectué. L'analyse de la mitose sur les plaques métaphasiques colorées au DAPI (bleu) a montré que les dix sept (17) individus testés, quelle que soit la génération à laquelle ils appartiennent, ont 52 chromosomes, comme chez le cotonnier cultivé (Tableau 30). La présence de fragments de chromosome de *G. sturtianum* ne semble donc pas se traduire par la production de lignées d'addition ou de soustraction chez les descendants de l'hybride HRS.

10.3.1.2 *Hybridation in situ*

A la suite du comptage des chromosomes des descendants de l'hybride HRS, ces derniers ont été hybridés avec l'ADN génomique (AD)₁ de *G. hirsutum* var. STAM F marqué à la biotine et révélé au Texas-Red (rouge) et avec l'ADN génomique C₁ de *G. sturtianum* marqué à la digoxigénine et révélé au FITC (vert). L'ensemble a subi une contre-coloration au DAPI. La superposition des images des deux couleurs (vert-rouge) a donné les résultats présentés au niveau des figures 27 à 34.

L'analyse des caryotypes obtenus après leur coloration confirme la présence encore importante du matériel de *G. sturtianum* en vert (Figures 28, 30, 32, 34). Elle a en effet mis en évidence la présence de quatre (4) chromosomes entiers et de deux (2) fragments de chromosomes de *G. sturtianum* chez trois (3) individus analysés de la population BC3S4 (Figure 28). Les six (6) individus testés de la population BC2S7 ont aussi montré la présence de 3 ou 4 chromosomes entiers de *G. sturtianum* et de 2 fragments de chromosome de cette espèce. Chez ces individus, les quatre (4) chromosomes entiers concernent deux (2) individus alors que les trois (3) chromosomes entiers concernent les quatre (4) autres individus. Tous les individus issus d'autofécondation analysés proviennent de graines dont la teneur en gossypol est variable et comprise entre 0,04 et 0,14% pour les plantes BC3S4 et entre 0,02 et 0,6% pour les plantes BC2S7.

Le nombre de chromosomes entiers de *G. sturtianum* et de fragments de chromosomes de cette espèce est moins élevé chez les populations ♀BC4S3 et ♂BC4S3 par rapport aux matériels BC3S4 et BC2S7.

Chez la seule plante ♀BC4S3 sur laquelle nous avons eu une bonne plaque métaphasique, le nombre de chromosomes de *G. sturtianum* a diminué de moitié. Au niveau de cette plante, il est observé la présence de deux (2) chromosomes entiers et d'un (1) fragment de chromosome de *G. sturtianum*. L'analyse de trois (3) individus ♀BC4S4, issus de l'autofécondation de la plante ♀BC4S3, a mis en évidence un ou deux chromosomes entiers et de fragments de *G. sturtianum*. Parmi les trois individus, deux (2) individus ont deux (2) chromosomes entiers et (+/-) deux (2) fragments de chromosomes, alors que le troisième individu a un (1) chromosome entier et un fragment de *G. sturtianum* (Tableau 40). La plante ♀BC4S3 analysée provient d'une graine dont la teneur en gossypol était de 0,16% alors que les plantes de sa descendance ♀BC4S4 sont issues de graines dont la teneur en gossypol varie entre 0,06 et 0,78% (Tableau 40).

Chez les trois (3) plantes ♂BC4S3 analysées, on n’observe pas de chromosome entier de *G. sturtianum*, mais elles ont toutes un (1) fragment de chromosome de cette espèce. Le même résultat a été observé sur un (1) individu de sa descendance ♂BC4S4 issue d’autofécondation. Tous les individus analysés sont issus de graines dont les teneurs en gossypol sont élevées (> 0,83%).

Ces constats suggèrent que tous les chromosomes entiers de *G. sturtianum* et au moins un des fragments de chromosomes de *G. sturtianum* qui persistent dans la descendance de HRS seraient transmis par l’ovule. C’est aussi via l’ovule dans la descendance ♀BC4S3 que l’on observe un transfert du caractère inhibition de la synthèse du gossypol. Sur base de ces résultats, nous nous sommes concentrés sur la descendance de la souche ♀BC4S3/20 pour la suite des analyses. En effet, cette plante provient d’une graine qui présentait une relativement faible teneur en gossypol (0,16%), tout en ne contenant que deux chromosomes entiers et un (1) fragment de chromosome de *G. sturtianum*.

Tableau 40: Résultats des analyses GISH

Génération	Numéro des plantes analysées	Pourcentage gossypol de la graine d’origine	Nombre total de chromosomes	Nombre de chromosomes entiers de <i>G. sturtianum</i>	Nombre de fragments de chromosomes de <i>G. sturtianum</i>
BC3S4	862	0,04	52	4	2
	829	0,08	52	4	2
	814	0,13	52	4	2
♀BC4S3	20	0,16	52	2	1
♀BC4S4	43	0,06	52	2	2
	87	0,78	52	2	1 ou 2*
	96	0,48	52	1	1
♂BC4S3	4	0,94	52	0	1
	5	0,83	52	0	1
	6	0,98	52	0	1
♂BC4S4	6	0,97	52	0	1
BC2S7	34	0,02	52	4	2
	44	0,25	52	4	2
	29	0,35	52	3	2
	22	0,35	52	3	2
	69	0,15	52	3	2
	47	0,6	52	3	2

* image pas nette

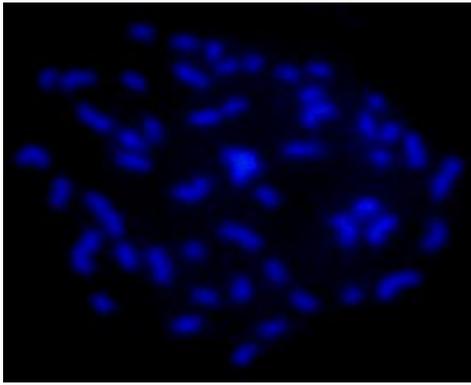


Figure 27: plaque métaphasique au DAPI de BC3S2/814 (%G=0,13)

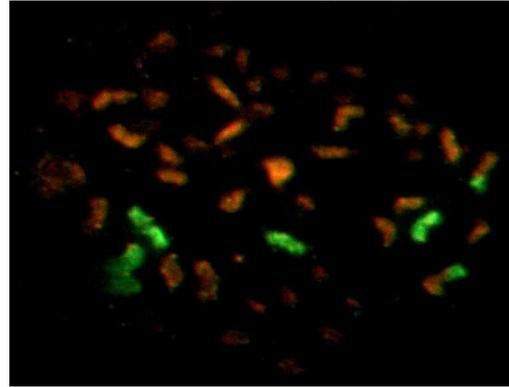


Figure 28: plaque métaphasique après hybridation de BC3S2/814 (%G=0,13)

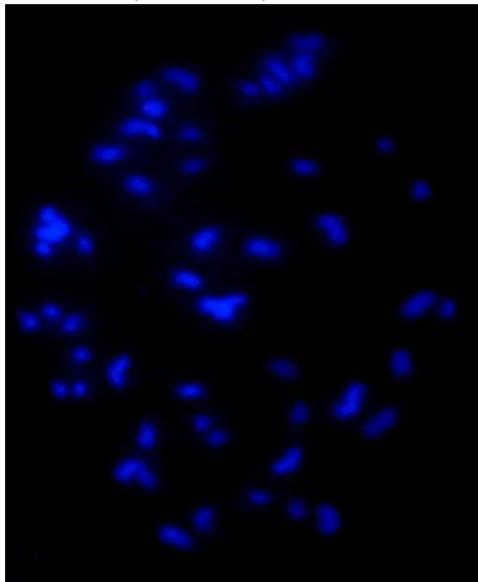


Figure 29: plaque métaphasique au DAPI de ♀BC4/20 (%G=0,16)

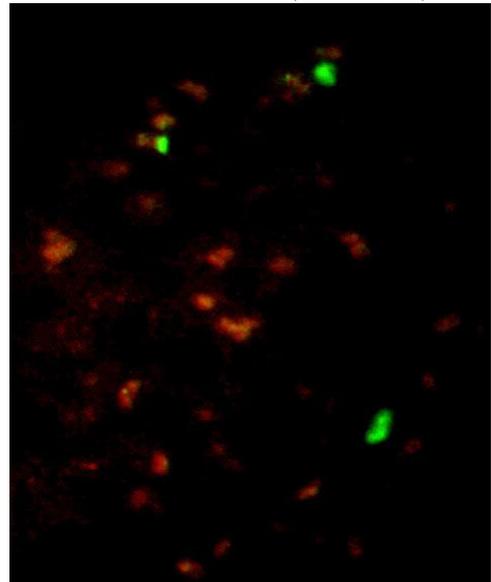


Figure 30: plaque métaphasique après hybridation de ♀BC4/20 (%G=0,16)

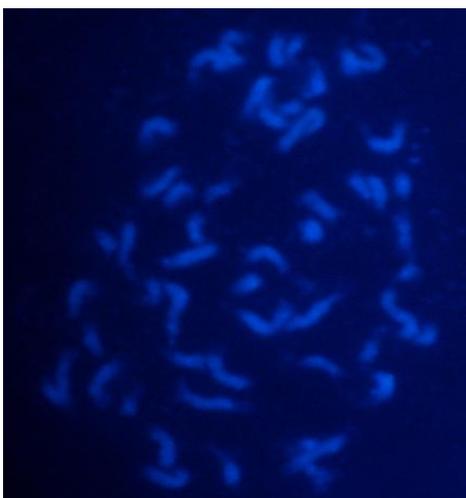


Figure 31: plaque métaphasique au DAPI de ♀BC4S1/43 (%G= 0,06)

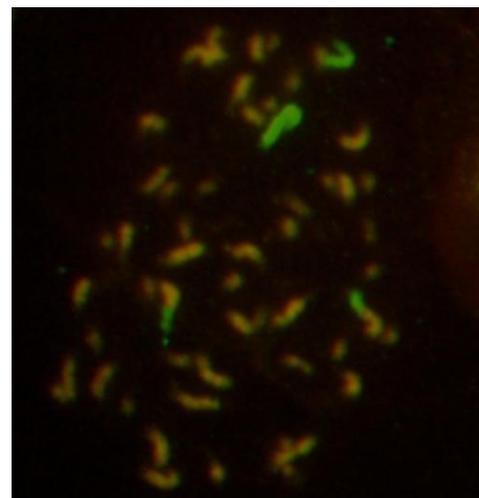


Figure 32: plaque métaphasique après hybridation de ♀BC4S1/43 (%G= 0,06)

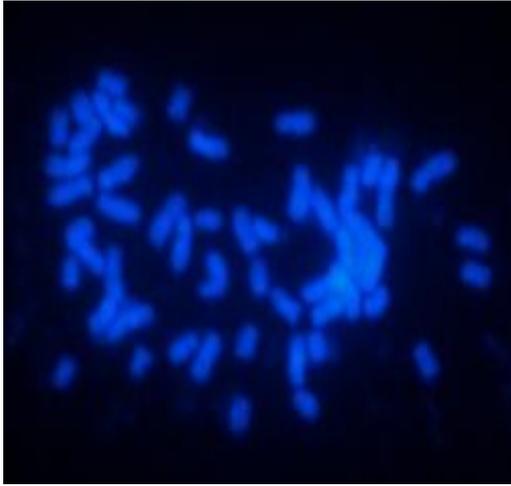


Figure 33: plaque métaphasique au DAPI de ♂BC4/6 (%G= 0,98)

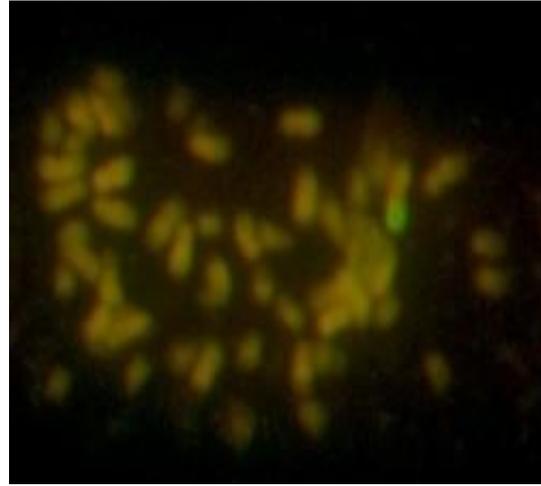


Figure 34: plaque métaphasique après hybridation de ♂BC4/6 (%G= 0,98)

10.3.2 Association des chromosomes en méiose

Nous n'avons pu obtenir des résultats que sur une seule plante, parce que le prélèvement de boutons floraux nécessite des normes de luminosité seulement disponibles en été en Belgique. La luminosité joue un rôle important dans la réalisation des cycles méiotiques. Un excès de lumière accélère le processus de divisions méiotiques alors qu'un déficit de lumière ralentit énormément le cycle. Pour contourner ces contraintes, le prélèvement des boutons s'est effectué à des moments variables (moments de bon ensoleillement). La dimension des boutons floraux peut ainsi varier selon les saisons, les génotypes et leur emplacement sur la plante. Afin de maximiser les chances d'obtention de bonnes plaques chromosomiques pour leur comptage (plaque en métaphase I), il est nécessaire de prélever un grand nombre de boutons floraux de tailles différentes. Ces prélèvements vont évidemment perturber la physiologie et les mécanismes de floraison de la plante.

Les différentes contraintes énumérées ci-dessus, font qu'il ne nous a pas été possible de déterminer la formule caryologique de l'ensemble des génotypes étudiés par manque de boutons au bon stade ou absence de boutons au moment des tests.

Les appariements ont été observés à partir de cellules mères de pollen (CMP). Il en ressort que la plante ♀BC4S3/11 (1,14%G) présente un nombre important de bivalents. En effet, sur quarante deux (42) plaques chromosomiques observées, nous n'avons obtenu que deux (2) plaques qui ont montré chacune deux (2) univalents et trois (3) plaques qui ont montré chacune la présence d'un quadrivalent. La figure 35 montre deux plaques métaphasiques sur lesquelles les chromosomes sont bien appariés en 26 bivalents.

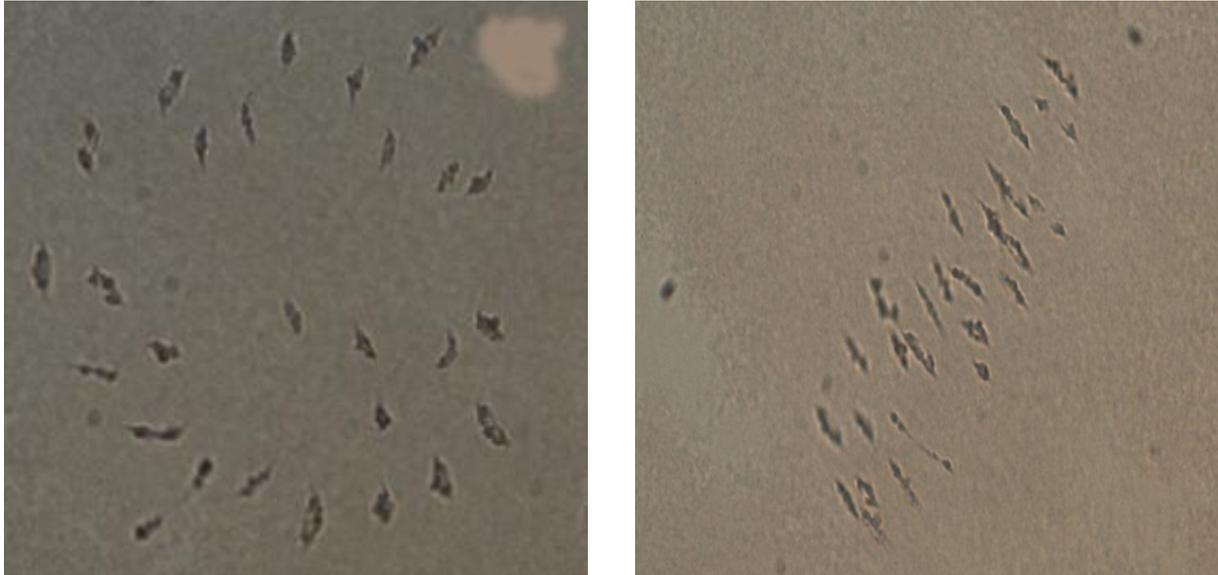


Figure 35: Configuration chromosomique à la métaphase I de la méiose de la plante ♀BC4S3/11 (%G= 1,14), grossissement 100

La formule caryologique chez cette plante est $0,09I + 25,81II + 0,07IV$. Les résultats nous permettent d'avoir une idée du comportement d'une partie de la descendance de l'hybride HRS à ce niveau de la sélection. En effet, la dominance des bivalents met en évidence un appariement normal et renseigne donc sur une certaine stabilité du génotype. La présence d'uni- et de quadrivalents est cependant l'indice de la persistance d'un déséquilibre génétique à son niveau. Sur base des résultats des analyses GISH obtenus pour d'autres souches des générations ♀BC4S3 et ♀BC4S4 (Tableau 40), nous émettons cependant l'hypothèse que le caryotype de celle-ci devrait contenir un (1) ou deux (2) chromosomes entiers et un (1) ou deux (2) très grands fragments de chromosomes de *G. sturtianum*. Le haut niveau d'appariement observé plaide en faveur de la présence de deux (2) chromosomes entiers homologues de *G. sturtianum*. Si ce n'est pas le cas, il doit exister un niveau d'homologie élevé entre le ou les chromosomes de *G. sturtianum* que doit porter cette plante et leurs homéologues chez *G. hirsutum*.

Chez les plantes HRS, les univalents peuvent facilement être identifiés car les chromosomes de *G. sturtianum* du génome C sont de plus grande taille. En ce qui concerne les bivalents, deux types ont été observés : les bivalents fermés (24 en moyenne par plaque métaphasique) dus généralement aux appariements homogénétiques et les bivalents ouverts (2 en moyenne par plaque métaphasique) qui concernent généralement les appariements hétérogénétiques. Les bivalents ouverts comportent un seul chiasma et les bivalents fermés en comportent au moins deux.

10.3.3 Analyse des tétrades

Une évolution normale de la méiose dans les CMP se traduit à la fin de la première division de la méiose par la division du microsporocyte en deux cellules sœurs contigües (diades) qui se divisent ensuite chacune en deux cellules pendant la deuxième division de la méiose pour donner 4 cellules sœurs contigües (tétrades). Ces quatre microspores évoluent en grain de pollen durant la spermatogenèse chez les plantes génétiquement équilibrées (Figure 36). La présence de tétrades anormales chez la souche ♀BC4S4/20-S1/58 (Figure 37), traduit l'existence de déséquilibres génétiques chez les plantes issues de l'hybride HRS à ce niveau de la sélection. Chez cette plante de la descendance autofécondée du génotype ♀BC4S3/20, 99% des tétrades observées sont normales, et seulement 1% de tétrades sont anormales avec la présence de cellules polynucléées contenant jusqu'à 6 noyaux (Figure 37).

Malheureusement nous n'avons pas pu faire une analyse GISH sur cette souche ♀BC4S4/20/58. Cependant, en suivant le même raisonnement que celui avancé au paragraphe précédent, nous pouvons supposer que cette souche devait contenir au moins 1 chromosome entier et 1 fragment de chromosome de *G. sturtianum*. Ce qui signifierait que la présence de matériel chromosomique étranger en aussi grande quantité dans le génome de cette plante ne se traduit pas par un pourcentage très élevé de tétrades anormales.



Figure 36: Aspect normal des tétrades observées chez les individus testés de l'hybride HRS et chez le cotonnier cultivé var STAM F



Figure 37: Aspect anormal des tétrades observées chez la plante ♀BC4S4/20-S1/58 (%G= 0,88)
La flèche indique une tétrade anormale avec 6 noyaux

10.3.4 Fertilité pollinique

La fertilité pollinique a été évaluée à partir de mille (1000) grains de pollen arrivés à maturité chez les espèces parentales de l'hybride HRS, chez la plante ♀BC4S3/20 et chez 5 plantes produites par autofécondation de cette dernière (Tableau 41). La fertilité pollinique des espèces parentales *G. hirsutum*, *G. raimondii*, *G. sturtianum* prise comme témoins est respectivement de 99,57%, 97,98% et 96,55%.

Chez les descendants analysés de l'hybride HRS, la fertilité pollinique a été analysée, on observe qu'elle varie de 50,91% à 96,41% (Tableau 32). La fertilité varie non seulement d'une plante à une autre, mais aussi d'une fleur à une autre sur la même plante, raison pour laquelle deux fleurs par plante ont été analysées, sauf pour la plante ♀BC4S4/20 /57.

Les figures 38 et 39 montrent des grains de pollen de taille uniforme et bien colorés chez la plante ♀BC4S4/20/87 et le cotonnier cultivé, alors que la figure 40 montre des grains non fertiles chez la plante ♀BC4S4/20/58.

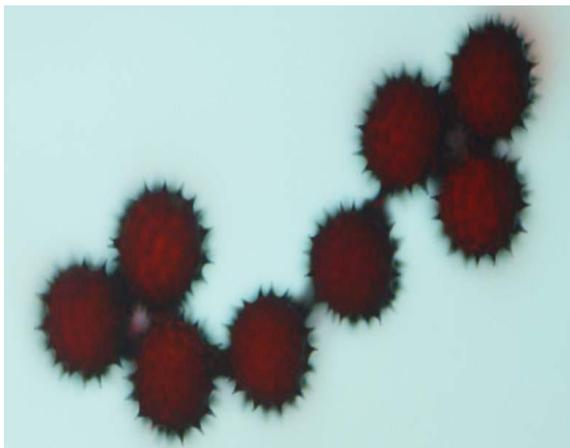


Figure 38: Fertilité pollinique= 93,98 %
♀BC4/20/87

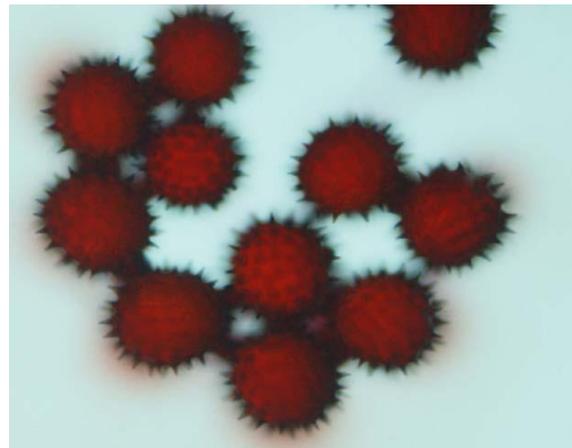


Figure 39: Fertilité pollinique chez le
cotonnier cultivé

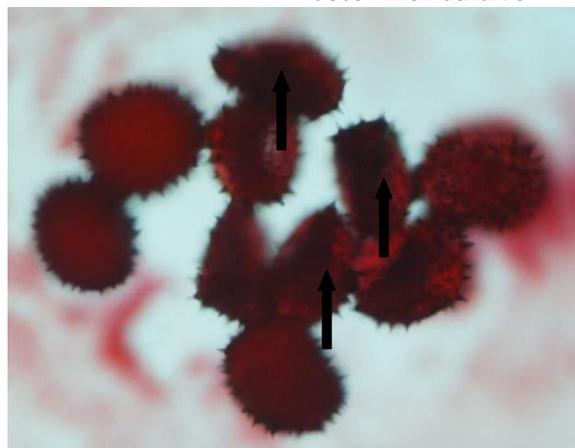


Figure 40: Fertilité pollinique= 66,42% ♀BC4S4/20/58
Les flèches représentent les grains de pollen non fertiles

Tableau 41 : Fertilité pollinique, nombre de chromosomes de *G. sturtianum* et teneur en gossypol des espèces parentales de l'hybride HRS de la plante ♀BC4/20 et de cinq plantes issues de l'autofécondation de celle-ci

Génotype	Plante	Teneur en gossypol (%)	Nombre de chromosomes de <i>G. sturtianum</i>	Fertilité Pollinique (%)
<i>G. hirsutum</i> (var STAM F)		> 1,5	0	99,57
<i>G. raimondii</i>		> 1,5	0	97,98
<i>G. sturtianum</i>		0	52	96,55
♀BC4S3	20	0,16	2 + 1 fragment	62,10
	20 bis	0,16		62,25
♀BC4S4/20	43	0,06	2 + 2 fragments	62,83
	43 bis	0,06		77,60
	57	1,08	N.D	77,37
	58	0,88	N.D	77,09
	58 bis	0,88		66,42
	67	1,29	N.D	64,63
	67 bis	1,29		50,91
	87	0,78	2 + 1 ou 2 fragment(s)	93,98
	87 bis	0,78		96,41

L'ajout de la mention « bis » après un nombre désigne la deuxième fleur analysée pour une plante donnée
N.D = Non disponible

10.4 Discussion

Les résultats obtenus au moyen des analyses cytogénétiques confirment l'hypothèse de la présence encore importante de matériel génétique du parent donneur (*G. sturtianum*) dans le génome des plantes étudiées. Cette hétérozygotie structurelle est une explication de l'importance des distorsions de ségrégation observées dans notre matériel (Chapitre 8). Lyttle, (1991) rapporte en effet que chez beaucoup d'espèces végétales et animales, l'hétérozygotie structurelle est la cause directe de la distorsion de ségrégation. Il est également possible que cette hétérozygotie structurelle ait un impact sur l'expression du caractère recherché chez les descendants de l'hybride HRS

10.4.1 Hétérozygotie structurelle et distorsion de ségrégation

L'hétérozygotie structurelle est une variation structurelle du génome (Lorieux, 1993). Selon Luro *et al.* (1995), la contre-sélection d'un chromosome entier pourrait provenir des conséquences d'une hétérozygotie structurelle et d'une sélection gamétique qui sont favorables à un ou plusieurs allèles d'un des parents. En effet, ils ont trouvé une hétérozygotie structurelle et une sélection gamétique en faveur des allèles du mandarinier, chez un hybride

issu du croisement entre un pamplemoussier et un hybride intergénérique, provenant d'un croisement entre un mandarinier et un citronnier. Ce résultat est conforme avec nos observations concernant la contre-sélection de chromosomes de *G. sturtianum*, et une DS grandement influencée par une sélection zygotique, (cf chapitre 8), chez les plantes issues de l'hybride HRS testées.

On peut résumer comme suit les résultats obtenus concernant la présence de chromosomes entiers et de fragments de chromosomes de *G. sturtianum* dans notre matériel : quatre ou trois chromosomes entiers et deux fragments de chromosome sont observés respectivement chez les populations BC3S4 et BC2S7, deux ou un chromosomes entiers et un ou deux fragments de chromosomes sont présents respectivement chez les populations ♀BC4S3 et ♀BC4S4 et, enfin, un seul fragment de chromosome est observé chez les plantes des générations ♂BC4S3 et ♂BC4S4. Si on remonte depuis la création de l'hybride HRS, Vroh Bi *et al.* (1998) ont trouvé que quelques marqueurs RAPD spécifiques de *G. sturtianum* sont systématiquement présents au niveau de tous les individus BC1 analysés. En effet sur 75 marqueurs, testés sur 27 plantes BC1, 30 ont pu être utilisés. Ces derniers auteurs ont détecté la présence de 49 bandes spécifiques de *G. sturtianum* dont 22 étaient présents chez l'hybride HRS d'origine et 17 sur les plantes BC1 (Mergeai *et al.* 1998). Ces bandes seraient localisées dans les chromosomes du génome C qui sont préférentiellement transmis à la BC1. Par la suite, Vroh Bi *et al.* (1999) ont trouvé 70 marqueurs AFLP spécifiques de *G. sturtianum* dont environ 10% se retrouvent dans les descendances BC1, BC2 et BC3. Même si la plupart des marqueurs utilisés par Vroh Bi *et al.* (1999) ne se sont pas maintenus à la BC2, ses résultats et les nôtres confirment une transmission préférentielle de chromosomes de *G. sturtianum* depuis la création de l'hybride HRS. La transmission préférentielle de chromosomes entiers de *G. sturtianum* et *G. austral* a déjà été signalée par plusieurs auteurs (Rooney et Stelly, 1991 ; Ahoton *et al.* 2002 ; Sarr et Mergeai, 2009, Becerra *et al.* 2007). La présence de ces chromosomes de *G. sturtianum* entraîne une hétérozygotie structurelle qui elle-même serait à la base de la DS depuis le début du programme. Par ailleurs, les critères de sélection des graines, basés sur l'expression du caractère recherché et sur la capacité de ces graines à donner des plantes fertiles, ont déjà été identifiés comme favorisant la transmission préférentielle. Les chromosomes sauvages préférentiellement transmis dites «ultra égoïste», se retrouvent dans toute la descendance, en hybridation interspécifique. Ils ont déjà été décrits par Crow (1988) et Lyttle (1991) comme expliqué dans le chapitre 8. La GISH montre que cette transmission préférentielle est quasi systématique avec la succession des

autofécondations effectuées à partir de la BC2. Par contre, la réalisation de rétrocroisements successifs peut briser la tendance. En effet, la réduction du nombre de chromosomes de *G. sturtianum* en BC4S3 et chez certains individus BC2S7, nous permet de supposer que tous les chromosomes entiers et les fragments de *G. sturtianum* ne seraient pas « ultra égoïstes ». Cette diminution des chromosomes correspond à l'élimination des chromosomes de *G. sturtianum* au fil des générations de rétrocroisement, ce qui avait déjà été déjà observée par Vroh bi (1999) au niveau des générations BC1, BC2, et BC3 issues de HRS.

Une analyse des résultats observés au niveau des populations ♂BC4S3 et ♀BC4S3 facilite la compréhension des mécanismes en jeu.

Le fait qu'on ait observé qu'un seul fragment de chromosome de *G. sturtianum* chez les trois individus ♂BC4S3 et chez l'individu ♂BC4S4 analysés alors qu'il y a de 1 à 4 chromosomes entiers et 1 ou 2 fragments de chromosomes de *G. sturtianum* dans les populations BC3S4, ♀BC4S3 et ♀BC4S4, signifie que la transmission préférentielle des fragments de chromosomes et des chromosomes entiers de *G. sturtianum* se réalise via l'ovule. Ce constat pourrait aussi expliquer que l'instabilité phénotypique des plantes HRS (cf Chapitre 6) observée depuis le début soit beaucoup plus importante chez les populations BC3S4 et ♀BC4S3. Il est bien connu que les gamètes femelles tolèrent beaucoup mieux que le pollen les additions de chromosomes multiples et l'introgession de grands fragments de chromosomes sauvages dans leurs noyaux (Endo, 1990 ; Konan *et al.* 2007). En ce qui concerne la BC3S4, d'après les observations d'Endo, (1990), la présence de 4 chromosomes entiers et de deux fragments de chromosome de *G. sturtianum*, est due au fait que le sporophyte qui contient un chromosome étranger offre un milieu qui favorise la survie des gamètes mâles porteurs de chromosomes entiers ou de fragments de *G. sturtianum*. En outre, plus la présence de matériel génétique d'une espèce sauvage est importante chez un hybride interspécifique, plus les individus concernés sont déséquilibrés (Cauderon, 1981). Cette dernière considération est cohérente avec nos observations concernant le meilleur équilibre morphologique des individus ♂BC4S3 qui ne porteraient, selon les résultats de nos analyses GISH, qu'un fragment de chromosome de *G. sturtianum* et pas de chromosomes entiers de cette espèce. Par ailleurs, il est également possible que le grand fragment de chromosome de *G. sturtianum* observé chez ces plantes soit transféré préférentiellement via le gamétophyte mâle. En effet, un fragment de chromosome de *G. sturtianum* est systématiquement trouvé chez les trois (3) plantes ♂BC4S3 testées et dans la descendance autofécondée de l'une d'elle

(Tableau 41). Cette transmission préférentielle via le pollen pourrait à nouveau être liée à la présence d'une hétérozygotie structurelle qui selon Luro *et al.* (1994) peut étendre l'effet d'un *locus* soumis à sélection à de grands fragments chromosomiques, voire à un chromosome dans son ensemble. Donc la transmission de chromosomes ou fragments de chromosomes de l'espèce sauvage peut se faire via le pollen et l'ovule. En effet, la technique de GISH utilisé ne révèle que de grands fragments de chromosomes étrangers, qui peuvent induire une distorsion de ségrégation. La GISH est un outil qui donne des informations très importantes sur la présence de chromosomes étrangers, mais qui comprend des limites que les SSRs peuvent aider à surmonter. Dans la technique employée, les tous petits fragments introgressés ne peuvent pas être colorés. La GISH ne permet pas non plus de fournir des informations sur la cassure d'un bras de chromosome, à moins que le segment cassé soit suffisamment grand (> à 10kb chez les plantes), pour que la différence de taille se remarque (Konan, 2007, Chen *et al.* 2014). Dans ce cas, une cartographie dense, en plus de la GISH, pourrait donner une information complète sur le génome des populations HRS.

Il ressort que la présence des chromosomes de *G. sturtianum* est suffisamment importante pour être la principale cause des distorsions de ségrégation et de l'instabilité agromorphologique observées chez toutes les populations testées issues de l'hybride HRS. Le fragment de *G. sturtianum* identifié au niveau de la génération ♂BC4S3 est suffisamment grand pour induire la DS observé. Ce constat est conforme aux résultats trouvés au niveau du chapitre 8, qui mettent principalement en évidence l'existence d'une sélection zygotique, parce que celle-ci est généralement causée par une différence structurale des chromosomes. Il est à noter que sélection zygotique est généralement accompagnée d'une sélection gamétique.

10.4.2 Relations entre l'hétérozygotie structurelle et les mécanismes de DS identifiés avec les 10 SSRs

La combinaison des résultats obtenus avec les 10 SSRs et la GISH offre une vision très claire de l'impact des chromosomes de *G. sturtianum* sur la ségrégation au niveau des trois (3) groupes de liaison mis en évidence par ces marqueurs. Le tableau 42 est une synthèse des résultats concernant la DS, obtenus à partir des 10 SSRs et de la GISH.

Rappelons qu'au niveau des SSRs, une DS influencée par une sélection zygotique se passe après la fécondation ; ici, ce sont les individus d'un groupe qui se révèlent être moins viables. La distorsion est dans ce cas généralement due à un remaniement chromosomique structural comme la translocation. Par contre, une DS influencée par une sélection gamétique se passe

au niveau haploïde, c'est la conséquence d'un déroulement anormal de la méiose. Les gamétophytes sont alors moins viables ou moins fertiles (Lorieux *et al.* 1995 a, b, Diouf et Mergeai 2013).

Tableau 42: Synthèse des différents mécanismes de DS observés, avec les 10 SSRs et le nombre de chromosomes de *G. sturtianum* révélé par la GISH

Génération	Nombre de chromosomes de <i>G. sturtianum</i>	Groupe de liaison	Mécanisme de DS avec les 10 SSRs
BC2S5	N.D	c2-c14	Zygotique
BC2S6	N.D	c3-c17	
		c6-c25	
BC2S7	4 ou 3 + 2 fragments	-	-
BC3S4	4 + 2 fragments	c2-c14	Zygotique+gamétique
		c3-c17	Zygotique
		c6-c25	
♀BC4S3	2 + 1 ou 2 fragments	c2-c14 et c3-c17	Ségrégation normale
		c3-c17	Gamétique+zygotique
		c6-c25	
♂BC4S3	1 fragment	c2-c14	Gamétique
		c3-c17	Gamétique et/ou zygotique
		c6-c25	Gamétique+zygotique

ND : Non disponible

Concernant le groupe de liaison c6-c25 et le SSR CIR058 localisé sur le groupe de liaison c3-c17, les SSRs ont révélé que la transmission préférentielle en faveur des allèles de *G. sturtianum* trouvée chez les populations ♂BC4S3 et ♀BC4S3 suit un même mécanisme. Il s'agit d'une sélection zygotique et gamétique simultanée. Ces marqueurs pourraient se situer sur le grand fragment de chromosome de *G. sturtianum* qui serait transmis à la descendance à la fois par l'ovule et par le pollen, ce qui en fait un matériel génétique « ultra égoïste » par excellence. Cependant, selon les résultats obtenus avec les SSRs, la DS observée chez la BC3S4 serait uniquement causée par une sélection zygotique au niveau du groupe de liaison c6-c25 et du SSR CIR058 qui est localisé sur le groupe de liaison c3-c17. La particularité de la BC3S4 est que la DS est sous l'effet des quatre (4) chromosomes entiers et des (2) deux grands fragments de chromosomes de *G. sturtianum*, que la GISH a mis en évidence. Ainsi, la sélection zygotique trouvée serait causée par ces chromosomes de *G. sturtianum*. Le nombre de chromosomes de *G. sturtianum* est plus élevé chez la BC3S4, par rapport aux générations ♂BC4S3 et ♀BC4S3 (Tableau 30 et 31). L'effet de ces chromosomes étrangers serait tellement grand, qu'il masquerait l'action des gènes gamétocides, responsables de la sélection gamétique observée chez les descendants issus de backcross, puisque la sélection zygotique

n'empêche pas la sélection gamétique (Lashermes *et al.* 2001). Par ailleurs, bien que la DS soit sous l'influence des chromosomes de *G. sturtianum*, elle favorise les allèles de *G. hirsutum* pour certains SSRs (CIR058 et BNL1153) chez la population BC3S4. Un tel comportement pourrait être causé par le fait que l'hétérozygotie structurelle est un facteur qui peut provoquer de manière aléatoire sur le chromosome une DS des marqueurs spécifiques qui leurs sont associés (Diouf et Mergeai, 2013).

La DS sur le CIR228a situé sur le c3-c17 (Chapitre 8) est influencée par une sélection zygotique en faveur de l'allèle de *G. hirsutum*, au niveau des générations BC3S4 et ♂BC4S3. Par contre, au niveau du ♀BC4S3, la DS est sous l'influence gamétique et zygotique simultanée en faveur de l'allèle de *G. sturtianum*. Ces constats montrent qu'au niveau du CIR228a, la DS est aussi sous l'effet du fragment de *G. sturtianum* mis en évidence chez la ♂BC4S3. L'influence zygotique par rapport aux allèles de *G. sturtianum* et *G. hirsutum* selon les générations testées, montre qu'il subit aussi l'effet aléatoire de l'hétérozygotie structurelle.

Cependant, au niveau du chapitre 8 nous avons montré que les autres SSRs (BNL2443b, BNL226b, BNL3989) situés sur le groupe de liaison c3-c17 et ceux localisés sur le groupe de liaison c2-c14 (BNL3590 et BNL3971) seraient sous l'influence de gènes gamétocides chez la ♂BC4S3 et d'une sélection zygotique chez la BC3S4. Comme pour les autres groupes de liaison, l'effet zygotique chez la BC3S4 n'exclut pas l'effet gamétique, d'autant plus que les trois groupes de liaisons ciblés par notre étude ont déjà été identifiés comme étant des Régions de Distorsion de Ségrégation (RDS) (Chapitre 7). Ceci est parfaitement en accord avec les différents mécanismes de distorsions de ségrégation observées au niveau des populations testées.

10.4.3 Hétérozygotie structurelle et stabilité génétique des descendants de l'hybride HRS

La confirmation de l'hétérozygotie structurelle par la GISH, associée aux résultats de la cytogénétique classique facilite la compréhension de la relation entre le génome (AD) du cotonnier cultivé et du génome (C) de *G. sturtianum*, au niveau des plantes HRS étudiées. Les résultats d'observations de méristèmes racinaires traités, colorés au DAPI et de l'observation des appariements chromosomiques sur des CMP colorées avec de l'acéto-carmin ont permis de compter 52 chromosomes qui semblent bien appariés. Sur base des analyses GISH réalisées chez la plante ♀BC4S3/20 qui est issu du même parent que la plante ♀BC4S3/11, cette dernière porterait 2 chromosomes entiers et 1 grand fragment de chromosome de *G. sturtianum*. Chez cette plante ♀BC4S3/11, on observe en effet 25,81 bivalents en moyenne dont très peu sont ouverts (1 ou 2 par plaque contre aucun chez le cotonnier cultivé). De plus, elle se caractérise par un faible nombre d'univalents et de tétravalents avec respectivement une moyenne de 0,09I et 0,07IV. D'après Vroh bi *et al.* (1998), la première plante HRS (HRS d'origine) présentait une formule caryologique de 14,42I + 17,03II+ 0,93III + 0,15IV + 0,07VI. Comparé aux résultats de Vroh bi *et al.* (1998), nous observons une importante réduction des univalents, des tétravalents et une absence des autres multivalents. Cette réduction des univalents et des multivalents a déjà été observée chez les descendants de l'hybride HRS d'origine ; d'abord par Vroh bi *et al.* (1998), qui ont travaillé sur des BC1 et des BC2, puis par Sanogo *et al.* (2000) qui ont travaillé sur des BC3*².

L'augmentation du nombre de générations de rétrocroisements a donc permis, comme on pouvait s'y attendre à l'aboutissement d'une structure génétiquement stable et équilibrée.

D'après Sanogo *et al.* (2000), la réduction des univalents en BC3*, signifie que le nombre de chromosomes impliqués dans les appariements (bivalents et multivalents) augmente. Cependant, une diminution des multivalents, de même que le faible nombre de bivalents ouverts est signe d'une diminution des échanges de matériel génétique d'après Menzel et Brown, (1953) et Vroh bi, (1999). Par ailleurs, il est connu chez le cotonnier que la progression de la proportion d'individus euploïdes et l'augmentation de la fréquence des plantes avec 26 bivalents en métaphase I, sont deux tendances, observées dans les

² L'hybride HRS BC3* étudié par Sanogo *et al.* (2000) est directement issu du backcross de la BC2 et cette voie de sélection a été abandonnée.

générations de backcross avancées de tous les hybrides interspécifiques (Dighe *et al.* 2005 ; Konan *et al.* 2007).

Les univalents représentent le reliquat de chromosomes qui n'ont pas trouvé d'homologues et qui sont non inclus dans des structures susceptibles d'entraîner des échanges entre les différents génomes utilisés dans le croisement de HRS. Cependant, chez ce dernier, selon Kammacher (1956), les univalents pourraient provenir de l'accumulation des modifications chromosomiques durant la différenciation du génome de *Gossypium*. Par ailleurs, les univalents pourraient aussi être des chromosomes de *G. sturtianum* qui ne trouvent pas d'homéologues, comme observé par Konan *et al.* (2007) dans la cadre de la création de l'hybride trispécifique de cotonnier [(*G. hirsutum* x *G. thurberi*)² x *G. longicalyx*] (HTL). Concernant les tétravalents observés, ceux-ci pourraient être causés par les échanges segmentaires qui se seraient produits durant l'évolution du genre *Gossypium* (Kammacher 1966, Maréchal 1974, Vroh Bi *et al.* 1998, Konan *et al.* 2007).

Par ailleurs, la plante ♀BC4S4/20/58 montre que seulement 1% des tétrades observées sont anormales ce qui implique, des défauts d'appariements à ce stade de la sélection, mais très limités. Les 99% de tétrades normales chez cette plante et l'observation d'un nombre élevé d'appariements normaux chez les plantes ♀BC4S3 et leur descendance autofécondée, reflètent des méioses régulières. Pour rappel, l'hybride HRS d'origine, comportait 1,2% de triades et 12,4% de tétrades anormales, et la BC3* comportait encore de 0 à 19,3% de tétrades anormales (Vroh bi *et al.* 1998 ; Sanogo *et al.* 2000). Nos observations en BC4 reflètent une amélioration substantielle des appariements en méiose. La fertilité pollinique chez les descendants de la plante ♀BC4S3/20 est variable, avec un minimum de 50,91% et un maximum de 96,41% entre les plantes (Tableau 41). Cette variabilité de la fertilité pollinique a été aussi constatée par Sanogo *et al.* (2000), avec des valeurs variant entre 45,3 et 96,2% chez la BC3*. Chez la plante HRS d'origine, la fertilité pollinique moyenne n'était que de 9% (Vroh bi *et al.* 1998). Cette amélioration de la fertilité pollinique est conforme avec la réduction des univalents, des structures multivalentes et l'augmentation de la fréquence des bivalents en BC3* et en BC4. Généralement, la présence d'univalents et de multivalents peut provoquer des distorsions de ségrégation durant la première division méiotique et générer des gamètes déséquilibrés, avec un nombre de chromosomes hétérogène conduisant à la stérilité (Kammacher, 1956). Selon, Konan *et al.* (2007), les multivalents sont plus souvent responsables de la stérilité que les univalents. En effet, ces derniers auteurs ont trouvé chez

HTL, comme Kammacher (1956) chez l'hybride trispécifique [(*G. hirsutum* x *G. arboreum*)² x *G. raimondii*] (AhA2DhD1), que les hybrides sont stériles, malgré leur faible nombre d'univalents. Cependant, d'après Kammacher, (1966) la présence des tétravalents n'affecte pas la fécondité des ovules, mais elle divise la fertilité pollinique par deux.

La fertilité pollinique des plantes ♀BC4S4 analysées dépasse 50%, ce qui est en accord avec le faible nombre de multivalents trouvé. De plus, elle est comparable à la fertilité pollinique de la plante ♀BC4S3/20 (62%) dont les plantes ♀BC4S4 analysées sont issues (Tableau 41). Ce constat montre que la stérilité des plantes HRS (Cf chapitre 6) n'est pas liée aux tétravalents. Il conforte l'effet néfaste, des chromosomes de *G. sturtianum* encore présents sur l'instabilité des plantes HRS.

Le nombre très élevé de bivalents, le pourcentage élevé de tétrades normales et l'amélioration de la fertilité pollinique observés chez le matériel analysé montre un bon équilibre génétique de ce dernier. Mais, en réalité, le matériel étudié est très instable et présente une forte DS principalement causée par une hétérozygotie structurelle. Cette situation de stabilité apparente indique que les chromosomes de *G. sturtianum* encore présents et ceux de *G. hirsutum* cohabitent dans le génome des plantes étudiées sans réellement interagir.

D'après Endrizzi (1962), les appariements réguliers chez le cotonnier dépendent du degré de condensation du chromosome. Ainsi, les chromosomes homéologues de tailles différentes s'apparient rarement (Endrizzi, 1962, Vroh bi *et al.* 1998a). Par conséquent, les fragments de chromosomes de *G. sturtianum* présents dans le matériel que nous étudions ne peut provenir que d'un transfert par translocation. Doussinault *et al.* (2001) définissent la translocation comme tout transfert de segment chromosomique ne faisant pas appel à la recombinaison. D'une façon générale, c'est un processus au hasard qui aboutit le plus souvent à des génotypes déséquilibrés sur le plan génétique. De plus, l'absence de trivalents et le faible nombre de tétravalents chez la plante ♀BC4S3/11 analysée, signifie que le transfert de gènes du génome de C vers celui de *G. hirsutum* doit être très faible au niveau de celle-ci. Ainsi nos résultats sont en accord avec ceux de Vroh bi *et al.* (1999), qui avait trouvé que la forte hétérozygotie trouvée est cohérente avec une introgression par translocation.

La très forte liaison mesurée entre l'allèle *G. sturtianum* du SSR CIR058 localisé sur le groupe de liaison c3-c17 et ceux du groupe de liaison c6-c25 (Chapitre 8) pourrait s'expliquer par l'occurrence d'une translocation qui aurait réuni ces deux fragments de chromosome. Cette hypothèse est cohérente avec l'observation du transfert systématique par le pollen d'un

grand fragment de chromosome de *G. sturtianum*. Mais, il ne faut pas écarter la possibilité qu'il puisse y avoir une transmission systématique, de petits fragments de *G. sturtianum*, non visibles avec la GISH.

10.4.4 Hétérozygotie structurelle et expression du caractère « *glandless-seed* »

La présence de plusieurs chromosomes entiers et de grands fragments de chromosomes de *G. sturtianum* ne se traduit pas nécessairement par une faible teneur en gossypol de la graine. Cependant, un niveau minimal d'hétérozygotie structurelle semble être une condition nécessaire pour obtenir des graines à faible teneur en gossypol. En effet, le génome de toutes les graines analysées qui présentaient une très faible teneur en gossypol contenait au moins un chromosome entier et un grand fragment de chromosome de *G. sturtianum*.

10.5 Conclusion

L'utilisation de la GISH a confirmé l'existence d'une très importante hétérozygotie structurelle qui peut être considérée comme la cause principale de la distorsion de ségrégation et des déséquilibres morphologiques observés chez les générations HRS testées. La réalisation d'analyses relevant de la cytogénétique classique en complément de la GISH laisse supposer qu'il n'y a quasiment pas d'interactions entre les chromosomes entiers et les grands fragments de chromosomes de *G. sturtianum* encore présents et ceux de *G. hirsutum* dans les plantes analysées. Cette situation donne ainsi une impression de stabilité du génome de ce matériel végétal alors qu'il est le siège d'importantes distorsions de ségrégation qui empêchent l'obtention de formes de cotonnier exprimant le caractère recherché.

11 CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Le cotonnier est la deuxième plante protéagineuse et la cinquième oléagineuse. L'utilisation à des fins alimentaires de l'huile et des tourteaux qui sont extraits des amandes des graines du cotonnier est empêchée par la présence de petites glandes lysigènes contenant des polyterpènes, désignés par le terme générique « gossypol ». Le gossypol qui est aussi présent dans tous les organes aériens de la plante agit comme moyen de défense naturel contre certains insectes. Mais il est hautement toxique pour les animaux monogastriques, l'homme en particulier. L'élimination de ce poison de la graine exige le recours à des procédés qui dénaturent la qualité du contenu protéique des tourteaux et diminuent sa valeur alimentaire. Par ailleurs, des espèces diploïdes sauvages australiennes du genre *Gossypium* présentent un mécanisme d'inhibition de la synthèse du gossypol uniquement dans l'amande de la graine. Compte tenu du grand intérêt de ce caractère pour une meilleure valorisation des sous-produits issus de la graine du cotonnier, son introgression chez la principale espèce cultivée a été tentée par plusieurs équipes de chercheurs dans le monde. A Gembloux Agro-Bio Tech, cela a abouti à la création de l'hybride trispécifique HRS [$(G. hirsutum \times G. raimondii)^2 \times G. sturtianum$], en utilisant le cotonnier cultivé *G. hirsutum*, le cotonnier sauvage australien *G. sturtianum* Willis donneur du caractère «*glandless-seed and glanded-plant*», et *Gossypium raimondii* Ulb comme espèce pont, (Mergeai *et al.*, 1995, Vroh Bi *et al.*, 1998). Cependant au fil de la sélection des générations obtenues par rétrocroisement et autofécondation, il n'a pas été possible de fixer le caractère inhibition de la synthèse du gossypol uniquement dans la graine. Notre travail vise principalement à essayer de comprendre pourquoi la fixation du caractère recherché est si difficile et à identifier des solutions qui permettraient d'y arriver. Pour atteindre cet objectif, nous avons réalisé une caractérisation agro-morphologique, cytogénétique et moléculaire de populations de graines et de plantes produites à partir du matériel disponible au moment du démarrage de la thèse.

L'ensemble des plantes impliquées dans le programme d'amélioration sont issues d'une souche BC2 produite à partir de l'hybride HRS créée par Vroh bi *et al.*, (1999). A partir de cette plante, quatre voies ont été suivies pour obtenir le matériel végétal étudié.

Une première voie est constituée de sept générations successives d'autofécondation à partir de la BC2. Nous avons étudié l'expression de l'inhibition de la teneur en gossypol des graines au niveau de toutes ces générations. Les analyses morphologique, moléculaire et cytogénétique ont concerné les générations BC2S5, BC2S6 et BC2S7.

Une deuxième voie se compose d'une génération issue d'un rétrocroisement de la souche BC2S2 suivie de trois générations obtenues par autofécondation. Nous avons étudié les générations BC3S4 et BC3S5 produites par autofécondation d'une souche BC3S3 qui exprimait le caractère recherché au plus haut niveau.

La troisième voie se compose d'une génération de plantes ♀BC4S3 obtenues par rétrocroisement avec une variété de *G. hirsutum* de la souche BC3S3 élite utilisée comme parent femelle (♀) et de plantes ♀BC4S4 obtenues par autofécondation de souches ♀BC4S3 sélectionnées sur base de l'expression du caractère recherché au niveau des graines dont elles sont issues.

La quatrième voie se compose d'une génération de plantes ♂BC4S3 obtenues par rétrocroisement avec une variété de *G. hirsutum* de la souche BC3S3 élite utilisée comme parent mâle (♂) et de plantes ♂BC4S4 obtenues par autofécondation de souches ♂BC4S3 sélectionnées sur base de l'expression du caractère recherché au niveau des graines dont elles sont issues.

Au terme des travaux réalisés, les faits suivants ont été mis en évidence :

Les générations de HRS (BC2S6, BC3S4, ♀BC4S3 et ♂BC4S3) étudiées sont toutes très déséquilibrées.

La caractérisation agro-morphologique réalisée sur des plantes des générations BC2S6, BC3S4, ♀BC4S3 et ♂BC4S3 a permis d'évaluer la conformité de celles-ci par rapport au cotonnier cultivé. Ce travail a révélé l'existence d'importants problèmes de viabilité des graines et des plantules, de fertilité des plantes produites et des différences morphologiques marquées dès les premiers stades de développement des plantes entre les formes hybrides et les variétés commerciales de cotonnier utilisées comme témoins. Ces différences sont particulièrement fortes pour les plantes des générations BC2S6, BC3S4 et ♀BC4S3. Chez celles-ci, entre 24 et 48 % des graines sont malformées ou vides et seulement 26 à 64 % des graines bien conformées donnent naissance à des plantes adultes dont 3 à 21 % sont totalement stériles. Les problèmes de viabilité des graines et des plantules ainsi que de fertilité des plantes produites sont nettement plus faibles chez le matériel ♂BC4S3. Chez celui-ci, seulement 8 % des graines sont mal conformées et aucune des plantes produites n'est stérile. Ces plantes sont également nettement plus fertiles que les autres générations BC2S6, BC3S4

et ♀BC4S3 étudiées. Ces dernières produisent en moyenne trois fois moins de graines par plante que les témoins *G. hirsutum* cultivés en même temps qu'elles, alors que les plantes ♂BC4S3 ne produisent en moyenne qu'un quart de graines en moins que le témoin commercial.

Quel que soit la génération à laquelle elles appartiennent, les plantes HRS analysées, présentent un cycle plus long que le cotonnier cultivé utilisé comme témoin. Au niveau morphologique, les plantes HRS ont : (1) un nombre très élevé de branches monopodiales et sympodiales, (2) des feuilles entières et/ou multilobées qui sont légèrement rabougries, (3) un stigmate situé largement au-dessus des anthères, (4) des fleurs plus petites qui ne s'épanouissent pas complètement, (5) de même que de petites capsules globulaires laissant apparaître une masse compacte de coton-graine qu'elles contiennent après leur déhiscence. Les capsules du matériel ♂BC4S3 sont plus grosses (12 graines par capsule en moyenne) que celles des autres générations étudiées (8 graines par capsule en moyenne). Mais elles sont nettement plus petites que celles de la variété témoin de *G. hirsutum* cultivée en même temps qu'elles, qui contiennent en moyenne 22 graines par capsule.

La multiplication des générations d'autofécondation n'a donc pas permis d'éliminer la ou les causes des problèmes de viabilité des graines et des plantules et de fertilité des plantes ni les déséquilibres morphologiques observés chez celles-ci. Ce constat est également globalement valable en cas d'utilisation de la souche hybride introgressée BC3S3 comme parent femelle en croisement avec une variété commerciale de *G. hirsutum*. L'emploi de cette même souche introgressée comme parent mâle se traduit par contre par une diminution sensible des problèmes de viabilité des graines et des plantules ainsi que par une amélioration de la fertilité des plantes. Ces tendances s'accompagnent malheureusement d'une augmentation de la teneur en gossypol des graines produites.

Les données obtenues mettent également en évidence que la mauvaise viabilité des graines et les problèmes de fertilité des plantes ne sont pas nécessairement liés à une bonne expression du caractère recherché. Ce constat, laisse supposer que d'autres facteurs que celui (ou ceux) contrôlant l'inhibition de la synthèse du gossypol uniquement dans la graine sont en cause.

Ces observations mettent en évidence l'existence de déséquilibres génétiques plus intenses chez les générations avancées obtenues par autofécondation de souches introgressées ou lorsque cette dernière est utilisée comme parent femelle en croisement avec une variété

commerciale de *G. hirsutum* par rapport aux plantes produites en utilisant ces souches comme parent mâle dans des croisements avec *G. hirsutum*.

Il faut également noter que le passage par autofécondation de la génération ♂BC4S3 à la ♂BC4S4 s'accompagne d'une forte augmentation du pourcentage de graines perdues qui pourrait être due à l'expression à l'état homozygote de gènes de létalité transmis au matériel ♂BC4S3 par le pollen du parent BC3S3.

Les déséquilibres agro-morphologiques et la forte distorsion de ségrégation observés chez les générations de HRS étudiées sont principalement causés par l'hétérozygotie structurelle, mais des gènes gamétocides y jouent aussi un rôle

Dans le but d'identifier les facteurs responsables des déséquilibres génétiques des plantes HRS étudiées, un suivi de l'introgression de *G. sturtianum* au moyen de marqueurs microsatellites et d'outils cytogénétiques a été effectué. Dix (10) marqueurs SSRs spécifiques de *G. sturtianum* cartographiés par Benbouza *et al.* (2009), au niveau des groupes de liaison c2-c14, c3-c17 et c6-c25, ont été utilisés pour suivre l'introgression du caractère recherché chez les générations BC2S5, BC2S6, BC3S4, ♀BC4S3 et ♂BC4S3. Les analyses mettent en évidence que les allèles de *G. sturtianum* sont conservés chez toutes les générations testées ; par contre, leurs ségrégations sont fortement biaisées. La distorsion de ségrégation concerne tous les couples d'allèles analysés, chez toutes les générations étudiées. Une DS de 100% des SSRs testés est observée chez les populations BC2S5, BC2S6 et BC3S4. Par contre, chez les populations issues de backcross, la DS concerne 90% des SSRs testés dans la génération ♂BC4S3 et 50% des SSRs testés dans la génération ♀BC4S3.

L'analyse des fréquences alléliques des SSRs biaisés pour toutes les générations étudiées, montre un ou plusieurs mécanismes de DS pour chaque groupe de liaison. Ces mécanismes peuvent agir avant et/ou après la fécondation, ils sont alors respectivement appelés gamétique et/ou zygotique. Les résultats globaux mettent en évidence que la sélection zygotique est plus importante chez toutes les générations étudiées et au niveau de tous les groupes de liaison. En effet, elle est principalement présente chez les générations issues d'autofécondation. Chez les générations issues de backcross, la sélection zygotique est présente au niveau du groupe de liaison c6-c25, de même que pour les *loci* CIR058 et CIR228 localisés sur le groupe de liaison c3-c17. Par contre, au niveau du groupe de liaison c2-c14 et du groupe de liaison c3-c17 à

l'exception des *loci* CIR058 et CIR228 : (i) la DS est principalement influencée par une sélection gamétique lorsque l'hybride HRS est utilisé comme parent mâle, (ii) alors qu'il n'y a pas de DS lorsque l'hybride HRS est utilisé comme parent femelle. La neutralité des marqueurs confirme que les deux types de mécanisme identifiés, peuvent être contrôlés par des gènes «gamétocides». Cette hypothèse est conforme aux résultats déjà trouvés sur les groupes de liaison (c2-c14, c3-c17 et c6-c25) ciblés par notre étude ; ces groupes constituent des RDS, et sont donc prédisposés à la DS causée par les gènes gamétocides (Han et al., 2004, Song et al., 2006, Yu et al., 2007, He et al., 2008, Yu *et al.* 2007). Les résultats obtenus avec l'analyse GISH confirme qu'en présence d'une sélection zygotique, la distorsion est généralement due à un remaniement structural chromosomique comme la translocation. L'utilisation de la GISH a mis en évidence l'existence d'une très importante hétérozygotie structurelle au niveau des plantes de l'ensemble des générations étudiées (BC2S7, BC3S4, (♀BC4S3, ♀BC4S4, ♂BC4S3 et ♂BC4S4). L'hétérozygotie structurelle chez les générations étudiées se caractérise par la présence de 1 à 4 chromosomes entiers et 1 à 2 grand(s) fragment(s) de chromosome de *G. sturtianum*, sauf au niveau de la génération ♂BC4S3 qui comporte uniquement un fragment de chromosome de *G. sturtianum*. Cette présence massive de matériel génétique de l'espèce sauvage australienne dans les générations avancées issues de HRS est en accord avec la forte sélection zygotique observée avec les SSRs. Elle explique une grande partie des déséquilibres morphologiques et les problèmes de fertilité observés lors de la caractérisation agro-morphologique des plantes appartenant aux générations étudiées. Elle confirme également l'existence de mécanismes de distorsion de ségrégation majeurs qui ont permis la transmission privilégiée de ces chromosomes et grands fragments de chromosome de l'espèce donneuse chez ces générations avancées.

La combinaison des résultats des analyses morphologiques, des analyses au moyen de marqueurs SSRs et avec la GISH met en évidence plusieurs résultats.

Au niveau du groupe de liaison c6-c25 : on observe une transmission préférentielle des allèles de *G. sturtianum*, probablement influencée par un fragment de chromosome de *G. sturtianum* qui semble être issu d'une translocation. Ce fragment jouerait le rôle d'éléments «ultra-égoïstes» et favoriserait sa transmission dans toutes les descendance à cause de l'hétérozygotie structurelle qu'il induit. En effet, le fragment de chromosome de *G. sturtianum* qui représente plus de la moitié de l'ADN de *G. hirsutum* constitutif du chromosome mixte, d'après les résultats de la GISH, est systématiquement transmis via le

pollen et/ou l'ovule (en backcross mais aussi en autofécondation). Ce constat pourrait correspondre au transfert systématique via le pollen et l'ovule, des allèles SSRs *G. sturtianum* du groupe de liaison c6-c25, mais être aussi dû à la forte sélection zygotique observée à ce niveau.

Au niveau du groupe de liaison c2-c14 et c3-c17 : on constate une transmission préférentielle des allèles de *G. hirsutum* chez toutes les générations testées. Elle est principalement influencée par les gènes gamétocides chez la génération ♂BC4S3, hormis au niveau des *loci* CIR058 et CIR228 localisés sur le c3-c17. Ces *loci* sont toujours influencés par une sélection zygotique quelle que soit la génération. Les *loci* CIR058 et CIR228 localisés sur le c3-c17 sont porteurs d'allèles « ultra-égoïstes » de *G. sturtianum*, qui entraînent leur DS. L'influence zygotique observée sur ces deux (2) *loci* à ce niveau laisse supposer que les fragments de *G. sturtianum* en présence, sont assez grands. Cette hypothèse est en accord avec le fait que les deux chromosomes entiers de *G. sturtianum* transmis systématiquement à leur descendance par autofécondation, et très fréquemment en cas de croisement comme parent femelle n'entraînent pas une DS chez la génération ♀BC4S3. La présence d'allèles spécifiques de *G. sturtianum* au niveau des groupes de liaison c2-c14 et c3-c17 laisse également supposer qu'il y a eu des recombinaisons entre ces chromosomes et leur homéologues de *G. hirsutum*.

Les facteurs qui sont liés aux pertes en graines sont principalement transmis via l'ovule (BC3S4 et ♀BC4S3) : ce qui est en accord avec l'importante présence de chromosomes entiers de *G. sturtianum*. En effet, les graines ♂BC4S3 avec juste un fragment de chromosome de *G. sturtianum*, présentent nettement moins de problèmes de mauvaise conformation et de faible viabilité, que ce qui est observé au niveau des graines produites par les autres générations analysées. La possible existence d'un facteur de létalité apporté par les gamétophytes femelles n'est cependant pas à écarter.

La DS dans notre matériel est principalement influencée par les facteurs apportés par les gamétophytes mâles, alors que la létalité des embryons et des jeunes plantules est principalement influencée par des facteurs apportés par les gamétophytes femelles.

Cette situation serait gouverné par une forte sélection zygotique dirigée par des entités de *G. sturtianum* et/ou une sélection gamétique sous l'effet de gènes gamétocides. Cependant, la DS dans sa globalité découle de l'hybridation interspécifique qui a créé une charge génétique, accentuée par une pression de la sélection basée sur les graines à faible teneur en gossypol, chez les générations HRS. Ces deux causes majeures sont en accord avec les deux principaux facteurs identifiés à savoir gamétique et structurel.

Des méioses régulières et une amélioration de la fertilité polliniques en ♀BC4S3 et ♀BC4S4, confirment que le déséquilibre des plantes HRS est causé par les chromosomes de *G. sturtianum* encore présents. En outre, ceux-ci semblent ne pas échanger ou interagissent très faiblement avec les chromosomes de *G. hirsutum* présents dans le génome des plantes HRS étudiées.

Le maintien massif d'ADN de l'espèce australienne et les mécanismes de distorsion de ségrégation qui rendent possible leurs transmissions préférentielles, n'empêchent cependant pas l'observation d'une certaine forme d'équilibre génétique au niveau des souches analysées. Ainsi, toutes les plantes analysées sont euploïdes, elles comptent bien 52 chromosomes. Le comptage des appariements chromosomiques en métaphase 1 de la méiose chez la plante ♀BC4S3/11 donne une formule caryologique quasi normale (0,09I + 25,81II + 0,07IV). Ce résultat laisse supposer qu'il existe une bonne homologie entre les chromosomes présents, alors qu'au moins un d'entre eux appartient à *G. sturtianum* et qu'au moins un autre est constitué pour plus de la moitié d'ADN de cette espèce. La présence d'un seul quadrivalent est cependant l'indice d'une faible possibilité d'échanges de matériel génétique entre des chromosomes non homologues. L'évaluation du pourcentage de tétraspoires anormales lors de l'élaboration des grains de pollen chez la plante ♀BC4S4/20/58, donne également une impression de stabilité génétique du génome de ce matériel végétal. En effet, 99 % de ses tétrades sont normales. Ces résultats montrent que les méioses sont régulières chez les plantes analysées. Cette situation indique qu'il n'y a pas ou très peu d'échange entre les chromosomes de *G. sturtianum* présentes dans le génome des plantes HRS étudiées et les chromosomes de *G. hirsutum*. Ceci prouve par ailleurs, que les fragments de chromosomes de

G. sturtianum présents chez les plantes HRS analysées, proviennent d'un transfert par translocation. Cependant le nombre d'individus analysé étant très faible, ce résultat devra être confirmé par une analyse sur un plus grand effectif.

L'estimation de la fertilité pollinique chez une demi-douzaine de souches ♀BC4S3 et ♀BC4S4 aboutit par contre, à des résultats plus contrastés. En effet, les pourcentages de grains de pollen viables varient entre 51 et 96 % selon les plantes analysées. Mais, à ce niveau de la sélection, ces résultats traduisent une amélioration de la fertilité pollinique qui était de 9%, au niveau de la plante HRS d'origine analysée par Vroh bi *et al.* (1998). Cette amélioration de la fertilité pollinique et la stabilité des méioses montrent que l'effet gamétique est plus faible que l'effet zygotique, elles confirment ainsi que la DS est surtout causée par les chromosomes de *G. sturtianum* encore présents dans le génome de HRS.

Les facteurs de DS sont indépendants du caractère inhibition de la synthèse du gossypol dans la graine chez les plantes HRS.

L'observation de graines à forte et faible teneur en gossypol qui : (i) sont bien ou mal-formées, (ii) ont un même profil génétique hétérozygote, et (iii) ont plusieurs chromosomes de *G. sturtianum*, montrent que les facteurs du déséquilibre sont indépendants du caractère inhibition de la synthèse du gossypol dans la graine de coton chez les plantes HRS analysées.

Deux hypothèses sont avancées pour expliquer le déterminisme génétique du caractère « glandless-seed » : (i) d'une part l'analyse simple marqueur montre ce caractère serait polygénique, d'autre part (ii) comme le caractère glandulaire est gouverné par deux gènes dominants GL_2 et GL_3 , l'expression du caractère pourrait se résumer à l'inhibition de ces derniers

(i) la première hypothèse, implique l'intervention de gènes situés sur plusieurs chromosomes. La teneur moyenne en gossypol des populations de graines produites à partir de notre schéma de sélection de HRS est globalement plus faible que celle des variétés commerciales de *G. hirsutum*. Ceci plaide en faveur d'une situation de dosage allélique, c'est-à-dire d'un effet additif de gènes mineurs qui contrôle l'expression du caractère. Cependant, avec la voie 4 de notre schéma de sélection (Figure 3), c'est-à-dire lorsqu'on rétrocroise une plante HRS BC3S3 avec *G. hirsutum* qui est utilisé comme parent femelle (♂BC4S3), il n'est pas possible

d'obtenir des graines à très faible teneur en gossypol. On constate cependant que 1% des graines produites de cette manière, a en moyenne, une teneur en gossypol qui est significativement plus faible que celle des variétés commerciales de *G. hirsutum*. De plus, la descendance ♂BC4S4, obtenue par autofécondation de la ♂BC4S3 présente une certaine proportion de graines (6%) avec des teneurs en gossypol relativement faible. Ce résultat est obtenu malgré que la teneur en gossypol moyenne de toutes les graines (1,71%) ♂BC4S4, soit significativement plus élevée que celle des graines ♂BC4S3 (0,96).

Par ailleurs, dans la descendance du pentaploïde [*G. hirsutum* x *G. sturtianum*], les seules graines « *glandless* » produites ont donné naissance à des plantes qui montraient des additions multiples de chromosomes de *G. sturtianum* (Altman *et al.* 1987). Aucune des lignées monosomiques d'addition de *G. australe* dans *G. hirsutum* et de *G. sturtianum* dans *G. hirsutum* ne produit de graines « *glandless* » (Koto 1989; Rooney et Stelly 1991; Ahoton *et al.* 2003, Sarr et Mergeai, 2009 ; Chen *et al.* 2014). Ce constat pourrait s'expliquer par un contrôle du caractère par au moins deux gènes situés sur des chromosomes différents. Dans ce cas, seules des lignées d'addition multiples devraient pouvoir produire des graines « *glandless* ».

Nos résultats indiquent que le contrôle du caractère est basé sur des interactions complexes entre plusieurs gènes. Cette conclusion est tirée à partir des résultats de l'analyse simple marqueur réalisée au moyen des 10 SSRs dans le matériel BC3S4, ♀BC4S3, ♂BC4S3. L'analyse a mis en évidence trois *loci* majeurs (BNL 3590 situé sur c2-c14 ; BNL226b et BNL3989 situés sur c3-c17) et deux *loci* mineurs (CIR058 et CIR228) situés sur le groupe de liaison c3-c17, qui sont significativement impliqués dans l'expression de l'inhibition de la teneur en gossypol dans la graine. Cependant, l'étude de la variation de la teneur moyenne en gossypol en fonction du génotype des trois *loci* majeurs associés a montré que les *loci* identifiés n'expliquent au maximum que 23% de l'expression du caractère recherché. D'autres gènes non identifiés doivent donc intervenir dans le déterminisme génétique du caractère recherché. Cette hypothèse est en accord avec l'identification de quatorze (14) nouveaux marqueurs SSRs spécifiques de *G. sturtianum* au niveau des groupes de liaison c4-c22, c5-c19, c11-c21 et c12-c26. Cependant, il est nécessaire de tester ces nouveaux marqueurs identifiés sur une plus grande population de HRS et surtout, vérifier leurs liens avec l'expression du caractère « *glandless-seed* », pour pouvoir les utiliser dans le programme de sélection.

Ces résultats tendent à montrer que l'on se trouve en présence d'un caractère de type quantitatif qui est contrôlé par plus d'un gène, qui sont localisés sur plusieurs groupes de liaisons. Ces derniers portent des allèles majeurs et mineurs associés au contrôle du caractère « *glandless-seed* », qui ne s'exprime qu'en interaction avec d'autres. Cependant ces résultats ayant été obtenus à partir de données génétiques biaisées, ils doivent être utilisés avec beaucoup de prudence, parce que la DS mise en évidence peut en effet occasionner de fausses liaisons. La cartographie des caractères quantitatifs (QTL) étant importante pour permettre leur utilisation en amélioration des cultures, la DS doit être négligeable, de même que pour une bonne interprétation des cartes. Enfin conséquence, il serait nécessaire de refaire l'analyse avec une population en ségrégation normale qui exprime le caractère recherché pour confirmer ou infirmer l'implication réelle de ces *loci* identifiés.

(ii) la deuxième hypothèse se base sur le contrôle du caractère glandulaire au niveau de la graine par deux gènes dominants GL₂ et GL₃ (McMicheal, 1960 ; Lee, 1981 et 1982). Kohel et Lee (1984) ont montré que ces gènes dominant sont localisés au niveau du chromosome 12 pour le GL₂ et au niveau du chromosome 26 pour le GL₃ chez le cotonnier « *glandless* » *G. barbadense*. Ces auteurs ont nommé le gène dominant responsable du caractère « *glandless* » GL₂^c. Celui-ci est localisé au niveau du locus de GL₂. Zhu *et al.* (2004), ont aussi mis en évidence un allèle de *G. bickii* désigné par le sigle GL₂^b qui entraîne le caractère « *glandless-seed* » en remplaçant l'allèle GL₂, qui joue un rôle deux fois plus important que GL₃ dans la production des glandes à gossypol dans la graine. Le gène GL₂^b est dominant par rapport à l'allèle GL₂ de *G. hirsutum*, qu'il inhibe systématiquement, mais est récessif épistatique par rapport à l'autre gène glandulaire GL₃. Les résultats de Zhu *et al.* (2004), sont intéressants parce qu'ils ont exploité comme pour notre étude un hybride trispécifique pour introgresser le caractère recherché. En effet, selon Stewart (1995) et Konan *et al.* (2009) l'espèce donneuse du caractère *G. bickii* qu'ils ont utilisé pour obtenir l'hybride, ABH [(*G. arboreum* x *G. bickii*)2 x *G. hirsutum*, AhA2DhG1] créé par Shuijing et Biling (1993), est beaucoup plus éloignée du cotonnier cultivé que *G. sturtianum*. De plus, Zhu et Daofan (2001), ont démontré que le mécanisme de transmission du caractère « *glandless-seed* », est le même chez cinq (5) espèces australiennes dont *G. bickii* et *G. sturtianum*. Ils révèlent ainsi que les mêmes gènes qui sont localisés aux mêmes endroits (*loci*) sont concernés aussi bien chez *G. bickii* que chez *G. sturtianum*. Nos résultats ont montré qu'il est possible d'obtenir des graines à très faibles teneur en gossypol, lorsqu'on rétrocroise les hybrides HRS avec *G. hirsutum* comme parent mâle (♀BC4S3). Dans ce cas, le génome des embryons constitutifs de l'amande de ces

graines « *glandless* » porte des gènes suffisamment efficaces pour inhiber la synthèse de gossypol dans leurs tissus malgré la présence des allèles glandulaires GL_2 et GL_3 apportés par le parent récurrent *G. hirsutum*. Cependant, la proportion des graines qui expriment partiellement ou totalement le caractère « *glandless-seed* » est très faible, ce qui est en accord avec la dominance partielle de GL_2^b vis-à-vis de GL_3 observée par Zhu *et al.* (2004).

Les analyses complémentaires que nous avons réalisées au moyen de SSRs ont mis en évidence la présence d'un allèle spécifique de *G. sturtianum* sur le groupe de liaison c12-c26 qui porte les *loci* glandulaires GL_2 et GL_3 . Il serait donc possible qu'un fragment d'ADN de *G. sturtianum* porteur de l'allèle spécifique de cette espèce pour le locus GL_2 ait été introgressé dans notre matériel. Dans ce cas, cet allèle que nous nommerons GL_2^s pourrait fonctionner comme l'allèle GL_2^b de *G. bickii* et inhiber la formation de glandes chez les plantes de type $GL_2^sGL_2gl_3gl_3$ ou $GL_2^sGL_2^sgl_3gl_3$. Cette hypothèse peut être vérifiée en croisant comme parent mâle une plante BC4S3 issue d'une graine qui porte extrêmement peu de glandes à gossypol (et qui devrait donc être de type $GL_2^sGL_2GL_3GL_3$) avec une plante de *G. hirsutum* (de type $GL_2GL_2gl_3gl_3$), puis autoféconder les plantes hybrides obtenues. Si l'allèle GL_2^s existe, environ 3/16 des individus de la population issue de ces autofécondations devraient être du type $GL_2^sGL_2^sgl_3gl_3$ ou $GL_2^sGL_2gl_3gl_3$ et produire des graines « *glandless* ». Il serait aussi nécessaire de saturer les alentours du GL_2 du chromosome 12, pour vérifier son introgression réelle chez HRS.

Le caractère polygénique de l'inhibition de la synthèse du gossypol ou le gène glandulaire GL_3 qui est apporté systématiquement par le parent récurrent (*G. hirsutum*) empêchent la fixation du caractère « *glandless-seed* »

Selon notre schéma de sélection, les deux hypothèses énoncées pour comprendre le déterminisme génétique du caractère recherché « *glandless-seed* », ne permettent pas d'aboutir à sa fixation.

En effet, (i) d'une part, l'introgression d'un caractère étant aléatoire, l'association de plusieurs gènes majeurs et mineurs, localisés sur plusieurs groupes de liaison, rendent très compliqués la fixation du caractère « *glandless-seed* » chez HRS, (ii) d'autre part, le gène glandulaire GL_3 systématiquement apporté par le parent récurrent ne peut être inhibé totalement et cette situation empêche la fixation du caractère recherché.

Stratégie pour développer une variété stable de *G. hirsutum* avec le caractère « *glandless-seed and glanded-plant and* »

Sachant que le déséquilibre agro-morphologique et la DS observés sont indépendants de l'expression du caractère recherché, la stratégie à suivre pour tenter d'obtenir une variété commerciale de cotonnier qui exprime le caractère recherché tiendra compte : (i) des facteurs du déséquilibre, mais aussi (ii) du déterminisme génétique du caractère. Il s'agit d'éliminer l'instabilité des plantes HRS et créer les conditions d'expression et de fixation des gènes favorisant le caractère recherché.

L'instabilité des générations de HRS étant liée à la présence des chromosomes de *G. sturtianum* transmis via l'ovule, une succession de rétrocroisement avec le cotonnier cultivé comme parent mâle sur la première génération de HRS, devrait permettre d'éliminer les chromosomes étrangers. Vroh Bi *et al.* (1999) proposent d'instaurer une sélection cumulative si les échanges entre les chromosomes de *G. hirsutum* et ceux de *G. sturtianum* restent faibles. Cette stratégie d'amélioration qui alterne un cycle de backcross à un cycle d'autofécondation peut, d'après Demol (1981), augmenter les chances de recombinaison entre deux espèces éloignées. La sélection cumulative a fait ses preuves avec notre schéma de sélection. En effet, les générations BC3S4 et ♀BC4S3 (Figure 3 ; voie 3), qui sont issues d'une alternance entre backcross et autofécondation, expriment bien le caractère recherché avec une réduction des pertes en graines après un backcross. Par contre comme l'ampleur de la DS est très importante, il faut envisager d'entamer ce travail de sélection cumulative à partir de la génération BC2S1.

S'il se confirme que le déterminisme repose sur l'existence d'un allèle GL_2^s , et si cet allèle n'est pas affecté d'un problème de distorsion de ségrégation, la meilleure solution est d'entreprendre un nouveau programme de rétrocroisement. Ce dernier s'effectuera avec une variété récurrente de type $GL_2GL_2gl_3gl_3$, jusqu'à l'obtention d'une forme commerciale de type $GL_2^sGL_2^sgl_3gl_3$, après au moins six (6) générations de backcross. Il faut savoir qu'en utilisant *G. bickii* comme espèce donneuse du caractère, il a fallu huit (8) générations de backcross à Zhu *et al.* (2004), pour obtenir une variété presque totalement stable, qui exprime le caractère « *glandless-seed* ».

Si le contrôle du caractère est polygénique, il faut repartir de l'hybride HRS d'origine, pour produire des descendance BC1 et BC2 avec *G. hirsutum* comme parent mâle. Les générations qui vont suivre devront ensuite être produites par une sélection cumulative à

partir de plantes exprimant au maximum le caractère recherché. S'il se confirme que des problèmes de DS intenses sont associés à l'expression du caractère, il faudra se résoudre à abandonner ce schéma de sélection.

Tout le matériel produit devra être caractérisé en utilisant en premier lieu la cytogénétique classique et moléculaire (appariement chromosomique, normalité des tétraspores, fertilité pollinique), ensuite les vingt-quatre (24) SSRs spécifiques de *G. sturtianum* identifiés tout en tentant d'en identifier d'autres et enfin en réalisant un suivi agro-morphologique. Ce suivi permettra de déterminer si les mécanismes de DS que nous avons identifiés se produisent dès les 1^{res} générations de rétrocroisement ou si leur apparition est liée à la pression de sélection exercée en faveur de souches exprimant le caractère « *glanded-plant and glandess-seed* » (par l'occurrence de recombinaison favorable à ceux-ci). Ces informations permettront de mieux comprendre le déterminisme génétique chez HRS.

BIBLIOGRAPHIE

- Ahloowalia B.S., Maluszynski M., Nichterlein K.,** 2004. Global impact of mutation-derived varieties. *Euphytica.*, **135**, 187-204.
- Ahoton L., D'Hont A., Baudoin J. P., Mergeai G.** 2002. Isolement et caractérisation de sept lignées monosomiques d'addition de *Gossypium australe* F. Muell. sur *G. hirsutum* L. Actes des VIIIèmes Journées Scientifiques du Réseau "*Biotechnologies, Amélioration des plantes et Sécurité alimentaire*" Maroc du 7 au 9 octobre 2002.
- Ahoton, L.,** 2002. Utilisation des espèces sauvages australiennes *Gossypium sturtianum* F.H Willis et *G.austral* F. Muell. pour l'amélioration du cotonnier cultivé *G. hirsutum* L. Thèse de Doctorat. Faculté des Sciences Agronomiques, Gembloux, Belgique, 175 p.
- Ahoton L., Lacape J.M., Baudoin J.P., Mergeai G.,** 2003 Introduction of Australian Diploid Cotton Genetic Variation into Upland Cotton, *Crop Sci.*, **43**, 1999-2005
- Ahoton L., Lacap J.M., Dhont A., Baudoin J.P., Mergeai G.,** 2004. Isolation and Characterization of seven alien monosomic addition lines of *Gossypium australe* F. Muell. On *G. hirsutum* L. p. 135-142. In Proc. World Cotton Res. Conf-3, Cape Town. South Africa. 9-13 March. 1998. Agricultural Research Council- Institute for Industrial Crop, Pretoria, South Africa.
- Alexander J. et al.,** 2008. Gossypol as undesirable substance in animal feed. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. *The EFSA Journal.*, **908**, 14-55.
- Alford B. B., Liepa G. U., Vanbeber A. D.,** 1996. Cottonseed protein: What does the future hold? *Plant Foods Hum Nut.*, **49**, 1-11.
- Altman D.W.,** 1988. Exogenous hormone applications at pollination for in vitro and in vivo production of cotton interspecific hybrids. *Plant Cell Report.*, **7**, 257-261.
- Altman D.W., Stelly D.M., et 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.
- Amini A and Kamkar F.,** 2005. The effects of gossypol on spermatogenesis in NMRI mice. *Iranian J. Sci. Technol. Transaction A* 29., No. **A1**, 123-133.

- Ano G., Schendiman J., Fersing J., Lacape M.**, 1982. Les cotonniers primitifs *G. hirsutum* race Yucatanense de la pointe des Châteaux en Guadeloupe et l'origine possible des cotonniers tétraploïdes et du nouveau monde. *Coton Fibres Trop.*, **37**, 327-332.
- Bâ H.**, 2004. Itinéraire technique du désherbage du maïs (*Zea mays* L.) En zone sahelo-soudanaise : alternative à l'atrazine. Mémoire d'ingénieur Agronome, ENSA Thiès. 78 p.
- Bailey N.T.J.**, 1949. The estimation of linkage with differential viability, II and III. *Heredity.*, **3**, 220-228.
- Beasley J. O.**, 1942: Meiotic chromosome behavior in species, species hybrids, haploids, and induced polyploids of *Gossypium*. *Genetics.*, **27**, 25-54.
- Becerra A. L., Brubaker C. L.**, 2007: Frequency and Fidelity of alien chromosome transmission in *Gossypium* hexaploid bridging populations. *Genome.*, **50**, 479-491.
- Benbouza H., Lognay, G., Palm R., Baudoin J.P., Mergeai G.**, 2002. Development of visual method to quantify the gossypol content in cotton seeds. *Crop Sci* **42.**, 1937-1942.
- Benbouza., H.** 2004. Introgression chez *Gossypium hirsutum* L. et cartographie au moyen de marqueurs microsatellites des gènes responsables du caractère « low-gossypol seed and high-gossypol plant ». Thèse de Doctorat, Faculté des Sciences Agronomiques, Gembloux, Belgique, 266 p.
- Benbouza H., Baudoin J.P., Mergeai G.**, 2006a. Amélioration de la méthode d'extraction d'ADN au CTAB appliquée aux feuilles de cotonnier. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, **10**, 2, 73-76.
- Benbouza H., Jacquemin J. M., Baudoin J.P., Mergeai G.**, 2006b. Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, **10**, (2), 77-81.
- Benbouza H., Lacape J. M., Jacquemin J. M., Courtois B., Diouf F. B. H., Sarr D., Konan N., Baudoin J. P., Mergeai G.**, 2009, Introgression of the low-gossypol seed & high-gossypol plant trait in upland cotton: Analysis of [(*Gossypium hirsutum* × *G. raimondii*) × *G. sturtianum*] trispecific hybrid and selected derivatives using mapped SSRs. *Mol Breeding.*, **2**, 273-286.

- Benedict C.R.**, 1984. Physiology. pp. 189-191. In R.J. Kohel and C.F. Lewis, eds. *Cotton*. American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc., Soil Science Society of America, Inc., Madison, Wisc.
- Bingham E. T.**, 2002. Notes on Segregation Distortion, Novel Traits, and Transgressive Segregation 1902 – 2002 While Thinking About the *Alfalfa* Genome1 communication personnel disponible sur internet <http://www.medicago-reports.org/pdfs/prologue.pdf>
[Review and Interpretation](#)
- Blair M.W., Iriarte G., Beebe S.**, 2006. QTL analysis of yield traits in an advanced backcross population derived from a cultivated Andean wild common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cross. *Theor Appl Genet.*, **112**, 1149-1163.
- Bocchino F.**, 1999. Les modifications du panorama cotonnier entre 1949 et 1999. *Coton Dév.*, Hors série (septembre) 8-13.
- Bradshaw HD., Stettler R.F.**, 1994 Molecular genetics of growth and development in *Populus*. II. Segregation distortion due to genetic load. *Theor Appl Genet.*, **89**, 551-558
- Brubaker C. L., Wendel, J.F.**, 1994. Re-evaluating the origin of domesticated cotton (*G. hirsutum*) using nuclear restriction fragment length polymorphism. *Am J Bot.*, **81**, 1309-1326.
- Brubaker C. L., Benson C. G., Miller C., Leach N. D.**, 1996. Occurrence of terpenoid aldehydes and lysigenous cavities in the “glandless” seeds of Australian *Gossypium* species. *Australian J Bot.*, **44**, 601-612.
- Cai Y., Xie Y., Liu J.**, 2010. Glandless seed and glanded plant research in cotton. A review. *Agron. Sustain. Dev.*, **30**, 181-190
- Callot G., Chamayou H., Maertensc., Salsac L.**, 1982. Mieux comprendre les interactions sol-racine. Incidence sur la nutrition minérale. INRA, Paris. 325 p.
- Carmi A., Shalhevet J.**, 1982. Roots effects on cotton growth and yield, *Crop science.*, vol. *R3*, 875-878
- Castro P., Rubio J., Cabrera A., Millan T., Gil J.**, 2011. A segregation distortion *locus* located on linkage group 4 of the chickpea genetic map. *Euphytica.*, **179**, 515-523.
- Cauderon, Y.** (1981). Hybridation interspécifique et amélioration des plantes. I – Évolution des voies d'étude des relations entre espèces. *C.R. Acad. Agric. Fr.*, **67**, 1001-1012.

CCIC (2014). Bulletin du Comité Consultatif International du Coton

Cheftel J. C., Chefteel H., Besançon P., 1986. Introduction à la biochimie et à la technologie des aliments. Vol 2, 145 p.

Chen Y., Wang Y., Wang K., Zhu X., et al., 2014 Construction of a complete set of alien chromosome addition lines from *Gossypium australe* in *Gossypium hirsutum*: morphological, cytological, and genotypic characterization. *Theor Appl Genet.*, **127**, 1105-1121.

Cheng R., Saito A., Takano Y., Ukai Y., 1996. Estimation of the position and effect of a lethal factor *locus* on a molecular marker linkage map. *Theor Appl Genet.*, **93**, 494-502.

Cloutier S., Cappadocia M., Landry B. S., 1997. Analysis of RFLP mapping inaccuracy in *Brassica napus* L. *Theor Appl Genet.*, **95**, 83-91.

Crow J. F., Dove W. F., 1988. Anecdotal, Historical and Critical Commentaries on Genetics: The ultraselfish gene. *Genetics.*, **118**, 389-391.

Dao V. T., 2002. Le Gossypol et ses nouveaux dérivés : synthèses et études d'activités biologiques. Thèse de Doctorat., Paris : Université Paris XI, Orsay. 201 p.

De Vienne D., 1998. Les marqueurs moléculaires en génétique et biotechnologies végétales. 2^e éd. INRA Paris. 200 p.

Demol J., Baudoin J P., Louant B. P., Maréchal R., Mergeai G., Otoul E., 2002. Amélioration des plantes. Application aux principales espèces cultivées en régions tropicales. (éd) Les presses agronomiques de Gembloux. 581 p.

Dethier P., 1987. Etude de la valeur alimentaire des produits et sous produits disponibles au Sénégal pour l'alimentation des volailles. Mémoire d'ingénieur Agronome. FUSAGX. 78 p.

Diaw T., Dieng A., Mergeai G., Camara A., Hornick J.L., 2012. Effets de la substitution totale du tourteau d'arachide par la fève de coton glandless sur les performances zootechniques de poulets de chair au Sénégal. *Rev. Elev. Méd. vét Pays trop.*, **65** (1-2), 17-23

Dighe N. D., Stelly D. M., Menz M., Robinson A. F., Bell A. A., Bridges A., 2005: Reniform nematode resistance – cytogenetics of *Gossypium longicalyx* introgression products. In: P. Dugger, and D. Richter (eds), Proc. Beltwide Cotton Conf. New Orleans, LA January 4–7, 2005, 194. National Cotton Council, Memphis, TN [abstract].

- Dilday R. H.**, 1986. Development of a cotton plant with glandless seeds, and glanded foliage and fruiting forms. *Crop Sci.*, **26**, 639-641.
- Diouf F.B.H., Benbouza H., Konan N. O., Sarr D., Ndir K N., Baudoin J. P., Mergeai G.**, 2010. Effect of Gamma Ray in the Progeny of Trispecific Hybrid [(*Gossypium hirsutum* x *G. raimondii*)² x *G. sturtianum*]. *Not Bot Hort Agrobot.*, **38**, (2), 78-83.
- Diouf F.B.H., Mergeai G.**, 2013. Distorsions de ségrégation et amélioration génétique des plantes (synthèse bibliographique). *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, **16** (4), 499-50.
- Diouf F.B.H., Benbouza H., Nacoulima L.N., Ndir K.N., Konan O., Mergeai G.**, 2014. Segregation distortions in interspecific cotton populations issued from the HRS triple species hybrid [(*G. hirsutum* x *G. raimondii*)² x *G. sturtianum*]. *Tropicultura.*, **32** (2), 73-79
- Dong C, Ding Y, Guo W, Zhang T.** (2007). Fine mapping of the dominant glandless Gene GL₂^c in Sea-island cotton (*Gossypium barbadense* L.). *Chin Sci Bull.*, **52**, 3105-3109. [10.1007/s11434-007-0468-6](https://doi.org/10.1007/s11434-007-0468-6)
- Doolittle W.F., Sapienza C.**, 1980. Selfish genes, the phenotype paradigm and genome evolution. *Nature.*, **284**, 601-603.
- Doussinault G., Pavoine M. T., Jaudeau B., Jahier J.**, 2001. Evolution de la variabilité génétique chez le blé. Dossier de l'environnement INRA., n°**21**, 91-103.
- Echt C.S., Kidwell K.K., Knapp S.J., Osborn T.C., McCoy T.J.**, 1994. Linkage mapping in diploid alfalfa (*Medicago sativa*). *Genome.*, **37**, 61-71.
- Endo T. R.**, 1990. Gametocidal chromosomes and their induction of chromosome mutations in wheat. *Jpn J Genet.*, **65**, 135-152.
- Endo T. R.**, 2002. Alien introgression in wheat by gametocidal genes. In: Plant, Animal and Microbe Genomes X Conference: Workshop on plant Alien introgression, Town and Country Convention Centre, San Diego, CA, USA. <http://www.intlpag.org/10/abstracts/workshops.html>.
- Endrizzi J. E.**, 1962. The diploid-like cytological behavior of tetraploide cotton. *Evolution.*, **16**, 325-329
- Endrizzi J. E., Turcotte E. L., Kohel R. J.**, 1985. Genetics, cytology, and evolution of *Gossypium*. *Adv Genet.*, **23**, 271-375.

- Estur G., 2006.** Le marché mondial du coton : évolution et perspectives. *Cah. Agric.*, **15** (1), 9-16.
- Fao., 2004.** Secrétariat CNUCED d'après le "Coton : statistiques mondiales - Bulletin du Comité consultatif international du coton (CCIC)".
- Fiorini C., Tilloy-Ellul A., Chevalier S., Charuel C., a Pointis G., 2004.** Sertoli cell junctional proteins as early targets for different classes of reproductive toxicants. *Reprod. Toxicol.*, **18**, 413-421.
- Fishman L., Willis J.H., 2005.** A novel meiotic drive *locus* almost completely distorts segregation in *Mimulus* (Monkeyflower) hybrids. *Genetics.*, **169**, 347-353.
- Fryxell P., Craven L. A., J. M. Stewart., 1992:** A revision of *Gossypium* sect. *Gandicalyx* (Malvaceae), including the description of six new species. *Syst. Bot.*, **17**, 91-114.
- Fu Y. B., Ritland K., 1994.** On estimating the linkage of marker genes to viability genes controlling inbreeding depression. *Theor Appl Genet.*, **88**, 925-932.
- Gamboa D. A., Calhoun M. C., Kuhlman, S. W., Haq A. U., Bailey C. A, 2001.** Use of expander cottonseed Meal in Broiler Diets Formulated on a Digestible Amino Acid Basis. *Poultry Science.*, **80**, 789-794.
- Gardiner J.M., Coe E.H., Melia-Hancock S., Hoisington D.A., Chao S., 1993.** Development of a core RFLP map in maize using an immortalized F2 population. *Genetics.*, **134**, 917-930.
- Gawai K.R, Cox C., Jackson J., Dalvi R.R., 1995.** Changes in the activity of metabolic and non-metabolic liver enzymes in rats following co-administration of gossypol with phenobarbital. *Pharmacol Toxicol.*, **76(4)**, 289-291.
- Graner A., Jahoor A., Schondelmaier J., Siedler H., Pollen K., Fischbeck G., Wenzel G., Herrmann R.G., 1991.** Construction of an RFLP map of barley. *Theor Appl Genet.*, **83**, 250-256.
- Haider Ali S. N., Ramana M. S., Jacobsen E., Visser R. G. F., 2001.** Establishment of a complete series of a monosomic tomato chromosome addition lines in the cultivated potato using RFLP and GISH analyses. *Theor. Appl. Genet.*, **103**, 687-695.

- Han Z. G., Guo W.Z., Song X. L., Zhang T.Z.,** 2004, Genetic mapping of EST-derived microsatellites from the diploid *Gossypium arboreum* in allotetraploid cotton. *Mol Gen Genom.*, **272**, 308-327.
- Harlan J. R. and De Wet J. M. J.,** 197). Towards a rational classification of cultivated plants. *Taxon*, **20**, 509-517.
- Harushima Y., N. Kurata M. Yano Y. Nagamura T. Sasaki et al.,** 1996. Detection of segregation distortions in an indica-japonica rice cross using a high-resolution molecular map. *Theor. Appl. Genet.*, **92**, 145-150.
- Hau B., Lançon J. et Dessauw D.,** 1997. Les cotonniers in ORSTOM (Ed. L'amélioration des plantes tropicales)., ,241 – 265.
- He D. H., Lin Z. X., Zhang X. L., Zhang Y. X., Li W., Nie Y. C., Guo X. P.,** 2008, Dissection of genetic variance of fiber quality in advanced generation from an interspecific cross of *Gossypium hirsutum* and *G. barbadense*. *Plant Breed.*, **127**, 286-294.
- Hedin P.A., Parrott W.L., Jenkins J.N.,** 1991 Effects of cotton plant allelochemicals and nutrients on behavior and development of Tobacco Budworm. *J Chem Ecol.*, **17**,1107-1121
- Hedin P. A., Parrot W. L. et Jenkins J. N.,** 1992. Relationship of glands, cotton square terpenoid aldehydes and other allelochemicals to larvae growth of *Heliothis virescens* ouveu(Lepidoptera:Noctui). *J Econ Entomol.*, **85**, 359-364.
- Heijbroek W., Roelands A.J., de Jong J.H., van Hulst C., Schoone A.H.L., Munning R.G.,** 1988. Sugar beets homozygous for resistance to beet cyst nematode (*Heterodera schachtii* Schm.), developed from monosomic additions of *Beta procumbens* to *B. vulgaris*. *Euphytica.*, **38**, 121-131.
- Iwata T., Nagamatsu T., Omura T.,** 1964. Abnormal segregation of waxy and apiculus coloration by a gametophyte gene belonging to the first linkage group in rice. *Jpn J Breed.*, **14**, 33-39.
- Jahier J.,** 1992. Techniques de cytogénétique végétale. Paris : INRA.
- Jiang W., Struik P. C., van K. H., Zhao M., Jin L. N., Stomph T. J.,** 2008. Does increased Zn uptake enhance grain Zn mass concentration in rice? *Ann. Appl. Biol.*, **153**, 135-147
10.1111/j.1744-7348.2008.00243.x [[Cross Ref](#)]

- Kakani A.; Saha S., Sapra V. T., Zipf A., Stelly D. M.,** 1999: Genetic mechanism and chromosomal location of pollen-specific gene(s) in *Gossypium*. *Crop Sci.*, **39**, 668-673.
- Kalo P., Endre G., Zimanyi L., Csanadi G., Kiss G.B.,** 2000. Construction of an improved linkage map of diploid alfalfa (*Medicago sativa*). *Theor Appl Genet.*, **100**, 641-657.
- Kammacher P.,** 1956. Les possibilités actuelles d'application de l'hybridation interspécifique pour l'amélioration du cotonnier en milieu africain. *Coton Fibres Trop.*, **11**, 101-136.
- Kammacher P.,** 1966. Etude des relations génétiques et caryologiques entre génomes voisins du genre *Gossypium*. *Coton et Fibres Tropicales.*, **21**, 263-290.
- Kashi Y., Soller M.,** 1997. Functional roles of microsatellites and minisatellites. In Goldstein D. B., Schlotterer C. eds. *Microsatellites: Evolution and Applications*. Oxford, UK: Oxford University Press., 10-23.
- Katterman F.R.H., Ergle D. R.,** 1970. A study of nucleic acids in *Gossypium*. *Phytochemistry* **9**, 2007-2010.
- Kébé B.,** 1999. Mise en place d'un système d'alerte et d'avertissement Agricole sur le coton ; analyse d'un suivi phytosanitaire. Mémoire d'ingénieur Agronome, ENSA Thiès. 60 p.
- Kesseli R. V., Paran I., Michelmore R. W.,** 1994. Analysis of a detailed genetic linkage map of *Lactuca sativa* (Lettuce) constructed from RFLP and RAPD markers. *Genetics.*, **136**, 1435-1446.
- Ketekou S. F.,** 1985. Intérêt biologique de l'huile de graine de coton *In* Le cotonnier sans gossypol, une nouvelle ressource alimentaire. Abidjan, Côte-d'Ivoire: IDESSA, 58-62.
- King I. P., Laurie D. A.,** 1993. Chromosome damage in early embryo and endosperm development in crosses involving the preferentially transmitted 4Sl chromosome of *Aegilops sharonensis*. *Heredity.*, **70**, 52-59.
- Klekowski E.J.** 1988. Genetic load and its causes in long-lived plants. *Trees.* **2(4)** : 195-203
- Kohel R.J., Lee J.A.,** 1984. Genetic analysis of Egyptian glandless cotton. *Crop Sci* **24**:1119–1121
- Konan N.O., Mergeai G.,** 2007. Possibilités d'amélioration de la principale espèce cultivée de cotonnier (*Gossypium hirsutum* L.) pour la résistance au nématode réniforme

(*Rotylenchulus reniformis* Linford et Oliveira). *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, **11** (2), 159-171.

Konan N.O., 2007. Introgression chez le cotonnier cultivé *Gossypium hirsutum* L. de la résistance au nématode réniforme (*Rotylenchulus reniformis* Linford and Oliveira) à partir de l'espèce diploïde sauvage *G. longicalyx* Hutch. et Lee. Thèse de Doctorat. FUSAGx, Gembloux (Belgique), 181 p.

Konan O., D'Hont A., Baudoin J.P., Mergeai G., 2007. Cytogenetics of a new trispecies hybrid in cotton: [(*Gossypium hirsutum* L. × *G. thurberi* Tod.) 2 × *G. longicalyx* Hutch. & Lee]. *Plant Breeding.*, **126**, 176–181.

Konan N O., Baudoin J.P., D'Hont A., Mergeai G., 2009. Bridging classical and molecular cytogenetics of *Gossypium*. In : Genetics and genomics of cotton. Paterson Andrew H. (ed.). New York : Springer [Etats-Unis], 257-281. (Plant Genetics and Genomics: Crops and Models, 3) ISBN 978-0-387-70809-6

Koornneef M., 2002. Classical mutagenesis in higher plants. Department of Genetics, Wageningen University, Dreijenlaan 2, 6703 HA Wageningen, The Netherlands. 12p. <http://en.scientificcommons.org/1141384>.

Koto E., 1989 Tentative de transfert du caractère "retard à la morphogenèse des glandes à gossypol" I. caractéristiques des hexaploïdes *G. hirsutum* x *G. sturtianum* et *G. hirsutum* x *G. australe*. In: M I. (ed) 1ère Conférence de la recherche cotonnière africaine, Lomé, Togo, pp 167-173.

Kovacic P., 2003. Mechanism of drug and toxic actions of gossypol: focus on reactive oxygen species and electron transfer. *Curr. Med. Chem.*, **10**, 2711-2718.

Ky C.L., Barre P., Lorieux M., Thouslot P., Akaffou S., Louarn J., Charrier A., Hamon S., Noirot M., 2000. Interspecific genetic linkage map, segregation distortion and genetic conversion in coffee (*Coffea* sp.). *Theor Appl Genet.*, **101**, 669-676.

Lagercrantz U., 1998. Comparative mapping between *Arabidopsis thaliana* and *Brassica nigra* indicates that Brassica genomes have evolved through extensive genome replication accompanied by chromosome fusions and frequent rearrangements. *Genetics.*, **150**, 1217–1228.

- Lambrides CJ, Godwin I.D, Lawn R.J, Imrie B.C.,** 2004, Segregation distortion for seed test a color in mungbean (*Vignaradiata L.* Wilcek). *J Hered.*, **95** (6), 532-535
- Lashermes P., Combes M. C., Prakash N. S., Trouslot P., Lorieux M., Charrier A.,** 2001, Genetic linkage map of *Coffea canephora*: effect of segregation rate in male and female meioses. *Genome.*, **44**, 589-596.
- Lee J. A., Cockerham C. C., Smith F.H.,** 1968. The Inheritance of Gossypol Level in *Gossypium* I. Additive, Dominance, Epistatic, and Maternal Effects Associated with Seed Gossypol in Two Varieties of *Gossypium hirsutum* L. *Genetics.*, **59**, 285-298.
- Lee J.A.,** 1974. Some genetic relationships between seed and square gossypol in *G. hirsutum* L. In: Beltwide Cotton Production Research Conference, 1974, Dalas. Proceedings. Memphis: National Cotton Council, 1974. 87p.
- Lee J.A.,** 1981. Genetics of D₃ complementary lethality in *Gossypium hirsutum* and *G. barbadense*. *J. Hered.*, **72**, 299-300.
- Lee J.A.,** 1982. Linkage relationship between Le and Gl allele in cotton. *Crop Sci.*, **22**, 1211-1213.
- Li W., Lin Z., Zhang X.,** 2007. A Novel Segregation Distortion in Intraspecific Population of Asian Cotton (*Gossypium arboretum* L.) Detected by Molecular Markers. *J Genet Genomics.*, **34**(7), 634-640.
- Liu X., Guo L., You J., Liu X., He Y., Yuan J., Liu G., Feng Z.,** 2010. Progress of segregation distortion in genetic mapping of plants. *Res J Agron.*, **4**(4), 78-83.
- Liu B., Brubaker C.L., Mergeai G., Cronn R.C., Wendel J.F.,** 2001. Polyploid formation in cotton is not accompanied by rapid genomic changes. *Genome.*, **44**, 321-330.
- Liu J., Benedict C. R., Stipanovic R. D., Bell A. A.,** 1999. Purification and characterization of S-Adenosyl-L-Methionine: Desoxyhemigossypol-6-0-Methytransferase from Cotton Plants. An Enzyme Capable of Methylating the defense Terpenoids of Cotton. *Plant Physiology.*, **121**, 1017-1024.
- Livingstone K. D., Lackney V. K., Blauth J. R., Wijk R. V., Jahn M. K.,** 1999. Genome Mapping in *Capsicum* and the Evolution of Genome Structure in the *Solanaceae*. *Genetics.*, **152**, 1183-1202.

- Lorieux M.**, 1993. Cartographie des marqueurs moléculaires et distorsions de ségrégation: modèles mathématiques. Thèse de doctorat. Montpellier II
- Lorieux M., Goffinet B., Perrier X., Gonzalez de Leon D., Lanaud C.**, 1995a. Maximum-likelihood models for mapping genetic markers with segregation distortion. 1. Backcross populations. *Theor Appl Genet.*, **90**, 73-80.
- Lorieux M., Perrier X., Goffinet B., Lanaud C., Gonzalez de Leon D.**, 1995b. Maximum-likelihood models for mapping genetic markers showing segregation distortion. 2. F2 populations. *Theor Appl Genet.*, **90**, 81-89.
- Lorieux M.**, 2007. MapDisto, A Free User-Friendly Program For Computing Genetic Maps. Computer demonstration (P958) given at the Plant and Animal Genome XV conference, Jan 13-17 2007, San Diego, CA. URL: <http://mapdisto.free.fr/>
- Lorieux M.**, 2012. MapDisto: fast and efficient computation of genetic linkage maps. *Molecular Breeding.*, **30**:1231-1235 (DOI 10.1007/s11032-012-9706-y)
- Lu H., Romero-Severson J., Bernardo R.**, 2002. Chromosomal regions associated with segregation distortion in maize. *Theor Appl Genet.*, **105**, 622–628.
- Luro F., Lorieux M., Laigret F., Bové J.M., Ollitrault P.**, 1995. Cartographie du génome des agrumes à l'aide des marqueurs moléculaires et distorsions de ségrégation. Techniques et utilisation des marqueurs moléculaires Montpellier (France), 29-31 mars 1994 Ed. INRA, Paris (Les Colloques, n. 72). ISBN 2-7380-0614-0
- Lusas E.W., Jividin G.M.**, 1987. Glandless cottonseed: a review of the first 25 years of processing and utilization research. *J Am Oil Chem.*, **64**, 839-854
- Lyttle. T. W.**, 1991. Segregation Distorters. *Annu Rev Genet.*, **25**, 51 I-57.
- Mangelsdorf P. C., Jones D. F.**, 1926. The expression of mendelian factors in the gametophyte of maize. *Genetics.*, **11**, 423-455.
- Marais G. F., Pretorius Z. A.**, 1996. Gametocidal effects and resistance to wheat leaf rust and stem rust in derivatives of a *Triticum turgidum* ssp durum/*Aegilops speltoides* hybrid. *Euphytica.*, **88**, 117-124.
- Marais G. F., Bekker A. T., Eksteen A., McCallum B., Fetch T., Marais A. S.**, 2010. Attempts to remove gametocidal genes co-transferred to common wheat with rust resistance from *Aegilops speltoides*. *Euphytica.*, **171**, 71-85.

- Maréchal 1974 R.**, 1974. Analyses de la conjugaison méioitique chez les hybrides triploïdes entre *Gossypium hirsutum* L. et des espèces sauvages australiennes. *Bull. Rech. Agron. Gembloux.*, **9**, 193-204.
- Marquié C., Eric Hequet.**, 1995. Le coton glandless. Une sécurité alimentaire en période de soudure. *Bulletin du Réseau TPA 11*. Cirad-CA, laboratoire de technologie cotonnière.
- McMichael S.C.**, 1960. Combined Effects of Glandless Genes gl_2 and gl_3 on Pigment Glands in the Cotton Plant. *Agron.*, **52**, 385-386.
- Menzel M.Y., Brown M.S., 1953.** The significance of multivalent formation in three species *gossypium* hybrids. *Genetics.*, **39**, 546-558.
- Mergeai G.**, 1992a. Utilisation du cotonnier sauvage *Gossypium areysianum* (Defl) Hutch. Pour l'amélioration de l'espèce cultivée *Gossypium hirsutum* L. Thèse de Doctorat. Faculté des Sciences Agronomiques. Gembloux, Belgique, 168 p.
- Mergeai G.**, 1992b. Nouvelles perspectives concernant la méthodologie à suivre pour l'introgession chez le cotonnier cultivé (*G. hirsutum* L.) du caractère retard à la morphogenèse des glandes à Gossypol. *Coton fibre trop.*, **47**, 113-116.
- Mergeai G., Baudoin J. P., Vroh Bi I.**, 1997. Exploitation of trispecies 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.
- Mergeai G, Vroh Bi I, Baudoin J.P, du Jardin P.**, 1998. Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers to assist wide hybridization in cotton. In: Bajaj YPS (ed) *Biotechnology in agriculture and forestry, Cotton*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg., 121-1393.
- Mergeai G.**, 2006. Introgessions interspécifiques chez le cotonnier. *Cah. Agric.*, **15**, 135-143.
- Muramoto H.**, 1969. Hexaploid cotton: some plant and fiber properties. *Crop Sci.*, **9**, 27-29.
- Nakagahra M.**, 1972. Genetic Mechanism on the Distorter Segregation of Marker Genes belonging to the Eleventh Linkage Group in Cultivated Rice. *Japan J Breed.*, **22**(4), 232-238.
- Ndungo V., Demol J., Maréchal R.**, 1998. L'amélioration du cotonnier *Gossypium hirsutum* L. par hybridation interspécifique. 2. Méthodologie pour l'exploitation de la diversité génétique du genre *Gossypium*. *Bull Rech Agron Gembloux.*, **23**, 27-49

- Orgel L. E, Crick F. H. C.**, 1980. Selfish DNA: the ultimate parasite. *Nature.*, **284**, 604-607
- Parry G.**, (1982). Le cotonnier et ses produits. Techniques Agricoles et Productions Tropicales. (éd) Maisonneuve et Larose, Paris, France, 502 p.
- Paterson A., Lander E., Hewitt J.D., Paterson S., Lincoln S.E., Tanksley S.D.**, 1988. Resolution of quantitative traits into mendelian factors by using a complete linkage map of restriction fragment length polymorphisms. *Nature.*, **335**, 721-726.
- Paterson A., Bowers, J., Peterson D., Estill J., Chapman B.**, 2003. Structure and evolution of cereal genomes. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **13**, 644-650.
- Pauly G.**, 1979. Les glandes a pigments du cotonnier: aspects génétique et sélection des variétés *glandless* et *high gossypol*. *Cotton Fibres Trop.*, **34**, 379-402.
- Percy R.G., Calhoun M.C., Kim H. L.**, 1996. Seed gossypol within *Gossypium barbadense* L. cotton. *Crop Sci.*, **36**, 193-197.
- Pereira M.G., Lee M., Bramel-Cox P., Woodman W., Doebley J., Whitkus R.**, 1994. Construction of an RFLP map in sorghum and comparative mapping in maize. *Genome.*, **37**, 236-243.
- Plieske, J., D. Struss., G. Röbbelen**, 1998: Inheritance of resistance derived from the B-genome of *Brassica* against *Phoma lingam* in rapeseed and the development of molecular markers. *Theor Appl Genet.*, **97**, 929-936.
- Poncet V., Allouis S., Devos K.M., Lamy F., Sarr A., Robert T.**, 2002. Comparative analysis of QTLs affecting domestication traits among two domesticated x wild pearl millet (*Pennisetum glaucum* L., Poaceae) crosses and cereals. *Theor Appl Genet.*, **104**, 965-975.
- Pons W. A., Hoffpauir C. L., Hopper T. H.**, 1953. Gossypol in cottonseed—Influence of variety and environment. *J. Agric. Food Chem.*, **1**:1115-1118.
- Qian S-Z and Wang Z-G**, 1984. Gossypol: a potential antifertility agent for males. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **34**, 329-360.
- Reddy P. S., Reddi M. V., Raju B. T., Ali S. M.**, 1977. Creation of genetic variability by recourse to irradiation in groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Oleagineux.*, **32** (2), 59-62.
- Rédei G. P., Koncz, C.**, 1992. In Methods in Arabidopsis research (ed. C. Koncz, N-H. Chua, and J. Schell) World Scientific Publishing, Singapore, p. 16.

- Reinisch A. J., Dong J. M., Brubaker C. L., Stelly D. M., Wendel J. F., Paterson A. H.,** 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.
- Rick C., Smith M.P.G.,** 1953. Novel variation in tomato species hybrids. *Am Naturalist.*, **87**, 359-373.
- Rick C.M.,** 1966. Abortion of male and female gametes in the tomato determined by allelic interaction. *Genetics.*, **53**, 85-96.
- Rivière R.,** (1977). Manuel d'alimentation des ruminants domestiques en milieu tropical. (éd) Institut d'élevage et de Médecine Vétérinaire des pays Tropicaux, 521 p.
- Robert J. M.,** 1983. Génétique. *Ed. Flammarion Médecine-Sciences*, 433p.
- Rong J.K., Abbey C., Bowers J.E., Brubaker C.L., Chang C., Chee P.W., Delmonte T.A., Ding X., Garza J.J., Marler B.S., Park C., Pierce G.J., Rainey K.M., Rastogi V.K., Schulze S.R., Trolinder N.L., Wendel J.F., Wilkins T.A., Williams-Coplin T.D., Wing R.A., Wright R.J., Zhao X., Zhu L., Paterson A.H.,** 2004. A 3347-locus genetic recombination map of sequence-tagged sites reveals features of genome organization, transmission and evolution of cotton (*Gossypium*). *Genetics.*, **166**, 389-417.
- Rooney W.L., Stelly D.M.,** 1991. Preferential transmission and somatic elimination of a *Gossypium sturtianum* chromosome in *G. hirsutum*. *Journal of Heredity.*, **82**, 151-155.
- Sanogo M., I. Vroh bi., Baudoin J.-P., Mergeai G.,** 2000. Analyse de la microsporogénèse chez la descendance BC2A et BC3 de l'hybride trispécifique *G. hirsutum* L. x *G. raimondii* Ulb. x *G. sturtianum* Will. *Tropicultura.*, 18(1), 44-46
- Sano Y.,** 2005. Genetic architecture and complexity in wild and cultivated rice. "Rice is life: scientific perspectives for the 21st century". Session 1: The genus *Oryza*, its diversity, and its evolution. *International Rice Research Notes (IRRN).*, 49-52.
- Santoni S., Faivre-Rampant P., Prado P., Prat D.,** 2000. Marqueurs moléculaires pour l'analyse des ressources génétiques : et l'amélioration des plantes. *Cah Agric.*, **9**, 311-327.
- Sarr D.,** 2003. Rôle des marqueurs microsatellites cartographiés dans l'exploitation des lignées monosomiques d'addition. Rapport DEA en Sciences Agronomiques et ingénierie biologique, FUSAGX 24 p.

- Sarr D.**, 2008 - Utilisation de l'espèce sauvage diploïde *Gossypium australe* F. Muell. pour l'amélioration de l'espèce cultivée tétraploïde *G. hirsutum* L. par la méthode des lignées monosomiques d'addition. Thèse de Doctorat. FUSAGx, Gembloux (Belgique), 74 p.
- Sarr D., Mergeai G.**, 2009. Élargissement de la base génétique de la principale espèce de cotonnier cultivé *Gossypium hirsutum* L. par la création et l'exploitation de lignées monosomiques d'addition. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, **13** (1), 187-201.
- Sément G.**, 1986. Le cotonnier en Afrique tropicale. Coll. Le technicien d'agriculture tropicale. Maisonneuve & Larose, Paris, France. 133 p.
- Sheidai M., Arman M., Zehzad B.**, 2002. Chromosome pairing and B-chromosomes in some Aegilops species and populations of Iran. *Caryologia.*, **55**(3), 261- 271.
- Shuijing Z., Biling L.**, 1993. Studies of introgression of the «glandless seeds-glanded plant» trait from *Gossypium bickii* into cultivated Upland cotton (*G. hirsutum*). *Coton et fibres Tropicales.*, **48**, 195-200.
- Siregar I.Z., Yunanto T.**, 2008. Inference on the possible causes of segregation distortion from open pollination progenies of merkus pine (*Pinus merkusii*). *Hayati J Biosci.*, **15**, 155-158.
- SKOVSTED A.**, 1933. Cytological studies in cotton. I. The mitosis and meiosis in diploid and triploid Asiatic cotton. *Ann. Bot.*, **47**, 227-251.
- SKOVSTED A.**, 1937. Cytological studies in cotton. IV. Chromosome conjugation in interspecific hybrids. *J. Genet.*, **34**, 97-134.
- Slocum M.K., Figdore S.S., Kennard W.C., Suzuki J.Y., Osborn T.C.**, 1990. Linkage arrangement of restriction fragment length polymorphism loci in *Brassica oleracea*. *Theor Appl Genet.*, **8**, 57-64.
- SODEFITEX**, 2005. 30 ans au service du developpement durable. Journal d'entreprise trimestriel. 56p.
- Song X., Sun X., Zhang T.**, 2006. Segregation distortion and its effect on genetic mapping in plants. *Chinese J Agric Biotech.*, **3**, 163-169.
- Song Xian liang., Wang K., Guo W., Zhang J., Zhang. T.**, 2005. A comparison of genetic maps constructed from haploid and BC₁ mapping populations from the same crossing between *Gossypium hirsutum* L. and *Gossypium barbadense* L. *Genome.*, **48**, 378-390.

- Stephens S.G.**, 1947. Cytogenetics of *Gossypium* and the problem of the origin of new world cottons. *Adv Genet.*, **1**, 431-442.
- Stewart J. M.**, 1995. Potentiel for crop improvement with exotic germplasm and genetic engineering. In Constable G A F.N., ed. *World Cotton Research Conference 1*: 313-327. Brisbane, Australian, CSIRO.
- Tagu D.**, 1999. Principes des techniques de biologie moléculaire. Paris : INRA.
- Tang C. M., Min L. F., and Pan J.J.**, 1994. Genetic analysis for Hai 1 strain of glandless cotton (*G. barbadense* L) 1. Allelism test. *Acta Agron. Sin.*, **20**, 8-12.
- Tatineni V., Cantrell R.G., Davis D. D.**, 1996. Genetic diversity in elite cotton germplasm determined by morphological characteristics and RAPDs. *Crop Sci.*, **36**, 186-192.
- Taylor D.R., Igvarsson P.K.**, 2003. Common features of segregation distortion in plants and animals. *Genetica.*, **117**, 27-35.
- Tonguç M., Earle E. D., Griffiths P. D.**, 2003: Segregation distortion of *Brassica carinata* derived black rot resistance in *Brassica oleracea*. *Euphytica.*, **134**, 269-276.
- Tran G.**, 1994. Le coton et ses co-produits en alimentation animale, la revue de *l'alimentation animale.*, **482**, 1-3.
- Truong S. K., McCormick R. F., Daryl T.M. Mullet J. E.**, 2014. Resolution of Genetic Map Expansion Caused by Excess Heterozygosity in Plant Recombinant Inbred Populations. *G3: Genes Genomes Genetics.*, **4**, 1963-1969.
- Ulloam R.G., Cantrell R., Oercy Z., Lu E., Zeiger.**, 2000: QTL analysis of stomatal conductance and relationship to lint yield in intraspecific cotton. *J Cotton Sci.*, **4**, 10-18.
- Vancetovic. J.**, 2008. An impact of environment on segregation ratio of qualitative traits in maize. *Genetika.*, **40**, 145 -156.
- Vander Jagt D.L., Deck L.M., Royer R.E.**, 2000) Gossypol: Prototype in inhibitors targeted to dinucleitid folds. *Cur Med Chem.*, **7**, 479-798.
- 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 (*Gossypium hirsutum* L.). *Plant Breed.*, **117**, 235-241.

- Vroh Bi I.**, 1999. Etude de l'introgression du retard à la morphogenèse des glandes à gossypol de la graine chez le cotonnier cultivé *Gossypium hirsutum* L. à partir de l'espèce diploïde australienne *G. sturtianum* Willis. Thèse de Doctorat. Faculté des Sciences Agronomiques, Gembloux, Belgique, 179 p.
- Vroh Bi I., Maquet A., Baudoin J.P., Du Jardin P., Jacquemin J.M., G. Mergeai.**, 1999. Breeding for "low gossypol seed and high gossypol plants" in upland cotton. Analysis of tri species hybrids and backcross progenies using AFLP and mapped RFLPs. *Theor. Appl. Genet.*, **99**, 1233-1244.
- Wagner H., Weber W.E., Wricke G.**, 1992. Estimating linkage relationship of isozyme markers and morphological markers in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) including families with distorted segregations. *Plant Breed.*, **108**, 89-96.
- Waites G. M. H.**, 1986. Régulation de la fécondité masculine. *Bulletin de l'Organisation mondiale de la Santé.*, **64**(4), 493-501. Disponible sur <http://www.who.int/iris/handle/10665/46984>
- Waites G.M, Wang C., Griffin P.D.**, 1998. Gossypol: reasons for its failure to be accepted as a safe, reversible male antifertility drug. *Int. J. Androl.*, **21**, 8-12.
- Wang Yong Jun., WU Xiao Lei., YU De Yue., Zhang Yuan Ming., Chen Shou Yi., GAI Jun Yi.**, 2004. Method of Evaluation and Adjustment of Recombinant Inbred Line Population and Its Application to the Soybean RIL Population NJRIKY. *Acta Agricultura sinica.*, **30**(5), 413-418.
- Wendel J. F.** 1989., New world tetraploid cotton contain old world cytoplasm. *Evolution.*, **88**, 4132-4136.
- Wendel J.F., Albert V.A.**, 1992. Phylogenetics of the cotton genus (*Gossypium*): character-state weighted parsimony analysis of chloroplast-DNA restriction site data and its systematic and biogeographic implications. *Systm Bot.*, **17**, 115-143.
- Wendel J.F., Cronn R.C.**, 2003. Polyploid and the evolutionary history of cotton. *Adv Agron.*, **78**, 139-186.
- Wilson F.D.; Lee J. A.**, 1971. Genetic relationship between tobacco budworm feeding response and gland number in cotton seedlings. *Crop Sci.*, **11**, 419-421.

- Wricke G., Wehling P.**, 1985. Linkage between an incompatibility *locus* and a peroxidase *locus* (Prx 7) in rye. *Theor Appl Genet.*, **71**, 289-291.
- Wu Li., Zhongxu Lin., Xianlong Zhang.**, 2007. A Novel Segregation Distortion in Intraspecific Population of Asian Cotton (*Gossypium arboreum* L.) Detected by Molecular Markers. *Journal of Genetics and Genomics.*, **34**(7), 634-640.
- Wu X.L., He C.Y., Wang Y.J., Zhang Z.Y., Dongfang Y., Zhang J.S., Chen S.Y., Gai J.Y.**, 2001. Construction and analysis of a genetic linkage map of soybean. *Acta Botanica sinica.*, **11**, 1051-1061.
- Xu Y., Zhu L., Xiao J., Huang N., McCouch S.R.**, 1997. Chromosomal regions associated with segregation distortion of molecular markers in F₂, backcross, doubled haploid, and recombinant inbred populations in rice (*Oryza sativa* L.). *Mol Gen Genet.*, **253**, 535-545.
- Yang H.C., Davis D.D.**, 1976. Variation in gossypol concentration of flower buds of cotton. *Crop sci.*, **16**, 485-488.
- Yu J., Yu S., Lu C., Wang W., Fan S., Song M., Lin Z., Zhang X., Zhang J.**, 2007. High-density Linkage Map of Cultivated Allotetraploid Cotton Based on SSR, TRAP, SRAP and AFLP Markers. *Journal of Integrative Plant Biology.*, **49** (5), 716-724.
- Yu Y., D Yuan., S Liang., X Li., X Wang., Z Lin., X. Zhang.**, 2011, Genome structure of cotton revealed by a genome-wide SSR genetic map constructed from a BC₁ population between *Gossypium hirsutum* and *G. barbadense*. *BMC Genomics.*, **9**, 12-15.
- Zagbaï H.S., Berti F., & Lebailly Ph.**, 2008. Evaluation de l'impact économique du cotonnier sans gossypol en Côte d'Ivoire. *Tropicicultura*, **26**, 1, 28-32
- Zhang L. Y., Wang S. Q., Li H. H., Deng Q. M., Zheng A. P., Li S. C., Li P., Li Z. L., Wang J. K.**, 2010. Effects of missing marker and segregation distortion on QTL mapping in F₂ populations. *Theor Appl Genet.*, **121**, 1071-1082.
- Zhao B, Deng Q. M., Zhang Q.J., Li Q. J., Ye S. P., Liang S. Y., Peng Y., Li P.**, 2006. Analysis of segregation distortion of molecular markers in F₂ population of rice. *Actu Genetica Sinica.*, **33**, 449-57.
- Zhongxu Lin., Yanxin Zhang., Xianlong Zhang., Xiaoping Guo.**, 2009. A high-density integrative linkage map for *Gossypium hirsutum*. *Euphytica.*, **166**, 35-45.

- Zhongxu L., Xianlong Z., Yichun N., Daohua H., Maoqing W.U.,** 2003. Construction of a genetic linkage map for cotton based on SRAP. *Chin Sci Bul.*, **48**, 2063-2067.
- Zhou D.R., Zhou Y.C., Cui G.H., Guo X., Qin J, Gui Y.T., Cai Z.M.,** 2008. Gossypol repressed the gap junctional intercellular communication between Sertoli cells by decreasing the expression of Connexin43. *Toxicol In Vitro.*, **22**, 1719-1725.
- ZHU S., Daofan J.I.,** 2001. Inheritance of the delayed gland morphogenesis trait in Australian wild species of *Gossypium*. *Chinese Science Bulletin.*, **46**, 14, 1168-1175.
- Zhu S. J., Reddy N. Jiang Y. R.,** 2005. Introgression of a gene for delayed pigment gland morphogenesis from *Gossypium bickii* into upland cotton. *Plant Breeding.*, **124**, 590-594
- Zhu S.J., Li B.L.,** 1993 Studies of introgression of the "glandless seeds- glanded plant" trait from *Gossypium bickii* into cultivated Upland cotton (*Gossypium hirsutum*), *Source Cotton et Fibres Tropicales.*, **48**, 195-200
- Zhu S. J., Jiang Y. R., Reddy N., Ji D. F.,** 2004. Breeding, introgression and inheritance of delayed gland morphogenesis trait from *Gossypium bickii* into upland cotton germplasm. *Chin. Sci. Bull.*, **49**, 2470-2476.

ANNEXES

Annexe 1: Protocole d'extraction d'ADN selon la méthode du CTAB améliorée appliquée aux feuilles de cotonnier décrite par Benbouza et al. (2006)

- (1) préchauffer le tampon d'extraction dans un bain-marie à 60 ° C ;
- (2) broyer les échantillons de feuilles dans de l'azote liquide ;
- (3) ajouter au broyat 7,5 ml de tampon CTAB par g de jeunes feuilles broyées. Le tampon est composé de 2% (p/v) CTAB, 2% (p/v) (polyvinylpyrrolidone), 2,0 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl (pH 8,0) et 5% (v/v) β-mercaptoéthanol (ajouté juste avant l'utilisation sous hotte) ;
- (4) ajouter 10-15 mg.g-1 du charbon actif et 375 µl.g-1 β-mercaptoéthanol sous hotte et bien vortexer ;
- (5) incuber pendant une heure à 65 ° C avec agitation ;
- (6) ajouter 7,5 ml.g-1 de feuilles broyées dans une solution de chloroforme : alcool isoamylique (24 : 1) à température ambiante et agiter manuellement (par inversement des tubes) pendant 5 min ;
- (7) centrifuger pendant 10 min à 16300 g à 4 ° C pour accélérer la phase de séparation, si nécessaire cette étape est répétée sur le surnageant pour clarifier la phase aqueuse ;
- (8) récupérer le surnageant et ajouter 2/3 du volume prélevé d'isopropanol conservé à 4°C, inverser les tubes doucement puis laisser précipiter au moins 30 min à -20 ° C ;
- (9) centrifuger pendant 5 min 13000 g à 4°C ;
- (10) éliminer le surnageant ;
- (11) ajouter 10 ml de tampon de lavage par g de feuilles broyées et placer en agitateur vertical pendant 30 min ;
- (12) centrifuger pendant 5 min à 13000 g à 4 ° C ;
- (13) éliminer le surnageant et sécher l'ADN à l'air libre pendant 20 min ;
- (14) suspendre le culot d'ADN dans 100 à 300 µl de TE 1x ;
- (15) incuber l'ADN pendant 10 min à 60 ° C ; et
- (16) traiter la solution avec 8 µl de RNase par 100 µl d'ADN et incuber pendant 30 min à 37°C. L'ADN extrait peut être stocké à 4 ° C la nuit ;
- (17) centrifuger pendant 2 min à 650 g ; cette dernière étape est facultative.

Annexe 2: Solutions de révélation au nitrate d'argent

- Préparation d'une solution Fix stop de 400ml

Ethanol 40ml

Acide acétique 2ml

Compléter avec de l'eau distillée jusqu'à 400ml

- Préparation de la solution de coloration de 400ml

Nitrate d'argent 0.4 à 0.6g

Formaldéhyde 0.6ml

Compléter avec de l'eau distillée jusqu'à avoir une solution finale de 400ml

- Préparation de la solution de développement de 400ml

NaOH 6g

Formaldéhyde 0.8ml

Compléter avec de l'eau distillée jusqu'à 400ml

Annexe 3: Ségrégation des allèles de *G. sturtianum* SSR chez les hybrides ♀BC4S3

STAMF*S1BC1BC2S2(8)3G14											
Groupe de liaison (chromosome <i>G.sturtianum</i>)		1					2				
localisation chromosomique sur <i>G.hirsutum</i>		c3	c3	c6	c25	c25	c2	c2	c3	c3	c3
N° Plante	Marqueur	CIR058	CIR228	BNL3359	BNL3436	BNL1153	BNL3590	BNL3971	BNL24431	BNL3989	BNL226
	P1	+		+	+	+					
	P2	+		+	+	+					
	P3	+		+	+	+					
	P4	+		+	+	+					
	P5	+		+	+	+					
	P6	+		+	+	+					
	P7	+		+	+	+					
	P8	+		+	+	+					
	P9	+		+	+	+					
	P10	+		+	+	+					
	P11	+									
	P12	+									
	P13	+									
	P14	+									
	P15	+									
	P16	+									
	P17	+		+	+	+		+			
	P18	+	+	+	+	+		+			
	P19	+		+	+	+	+	+			
	P20	+	+	+	+	+	+		+	+	
	P21	+	+	+	+	+					+
	P22	+		+	+	+		+			
	P23	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	P24	+		+	+	+					
	P25	+	+	+	+	+		+			
	P26	+	+	+	+	+		+		+	
	P27	+		+	+	+		+	+		+
	P28	+	+	+	+	+	+	+			
	P29	+	+		+	+		+			
	P30	+	+	+	+	+	+	+			
	P31	+	+	+	+	+					
	P32	+		+	+	+		+			

+ = indique la présence de *G.sturtianum* au niveau du locus

Annexe 4 : Ségrégation des allèles de *G. sturtianum* chez les hybrides ♂BC4S3

S1BC1BC2S2(8)3G14*STAMF											
Groupe de liaison (chromosome <i>G.sturtianum</i>)		1					2				
localisation chromosomique sur <i>G.hirsutum</i>		c3	c3	c6	c25	c25	c2	c2	c3	c3	c3
N° Plante	Marqueur	CIR058	CIR228a	BNL3359	BNL3436	BNL1153	BNL3590	BNL3971	BNL2443b	BNL3989	BNL226
P1		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P2		+	+	+	+	+					
P3		+	+	+	+	+	+		+	+	+
P4		+	+	+	+	+					+
P5		+	+	+	+	+	+		+		
P6		+	+	+	+	+			+		
P7		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P8		+	+	+	+	+					
P9		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P10		+	+	+	+	+					
P11		+	+	+	+	+					
P12		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P13		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P14		+	+	+	+	+	+	+	+	+	
P15		+	+	+	+	+					+
P16		+	+	+	+	+	+		+	+	
P17		+	+	+	+	+			+	+	+
P18		+	+	+	+	+	+				+
P19		+	+	+	+	+			+	+	
P20		+	+	+	+	+	+				+
P21		+	+	+	+	+			+	+	
P22		+	+	+	+	+	+				+
P23		+	+	+	+	+	+		+	+	
P24		+	+	+	+	+				+	
P25		+	+	+	+	+	+				+
P26		+	+	+	+	+		+	+	+	
P27		+	+	+	+	+		+			+
P28		+	+	+	+	+		+			+
P29		+	+	+	+	+		+			+
P30		+	+	+	+	+		+			+
P31		+	+	+	+	+			+	+	
P32		+	+	+	+	+		+	+	+	+
P33		+	+	+	+	+		+			+
P34		+	+	+	+	+		+	+	+	+
P35		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ = indique la présence de *G.sturtianum* au niveau du locus

Annexe 5: Ségrégation des allèles de *G. sturtianum* chez les hybrides BC3S4

Groupe de liaison		S1BC1BC2S2(8)3G14									
localisation chromosomique sur <i>G.hirsutum</i>		1					2				
N° Plante	Marqueur	c3	c3	c6	c25	c25	c2	c2	c3	c3	c3
		CIR058	CIR228	BNL3359	BNL3436	BNL1153	BNL3590	BNL3971	BNL24431	BNL3989	BNL2261
P1		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P2		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P3		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P4		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P5		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P6		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P7		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P8		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P9		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P10		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P11		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P12		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P13		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P14		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P15		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P16		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P17		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P18		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P19		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P20		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P21		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P22		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P23		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P24		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P25		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P26		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P27		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P28		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P29		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P30		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P31		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P32		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P33		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P34		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P35		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P36		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P37		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P38		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P39		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P40		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P41		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P42		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P43		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P44		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P45		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P46		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P47		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P48		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P49		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P50		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P51		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P52		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P53		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P54		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P55		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P56		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P57		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P58		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P59		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P60		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P61		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P62		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P63		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P64		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P65		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P66		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P67		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P68		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P69		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P70		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P71		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P72		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P73		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P74		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P75		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P76		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P77		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P78		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P79		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P80		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P81		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P82		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P83		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P84		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P85		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P86		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P87		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P88		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P89		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P90		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P91		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P92		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P93		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P94		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P95		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P96		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P97		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P98		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P99		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P100		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P101		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P102		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P103		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P104		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P105		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P106		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P107		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P108		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+= indique la présence de *G.sturtianum* au niveau du locus