

Titre

Isolément et caractérisation morphologique, cytogénétique et moléculaire de sept lignées monosomiques d'addition de *Gossypium australe* F. Muell. sur *G. hirsutum* L.

Auteurs

Ahoton Léonard ⁽¹⁻²⁾, Lacape Jean-Marc. ⁽³⁾, D'hont A. ⁽³⁾, Baudoin Jean-Pierre ⁽¹⁾, Mergeai Guy ⁽¹⁾

⁽¹⁾ Unité de Phytotechnie tropicale et d'Horticulture, Faculté Universitaire des Sciences agronomiques de Gembloux, 2 passage des Déportés, B-5030 Gembloux, Belgique, Email : mergeai.g@fsagx.ac.be.

⁽²⁾ Faculté des Sciences Agronomiques, Université Nationale du Bénin, B.P. 526, Cotonou, République du Bénin.

⁽³⁾ CIRAD, Avenue Agropolis, F- 34398 Montpellier Cedex 5, France.

Résumé

Afin d'évaluer les possibilités d'exploiter directement l'espèce sauvage australienne *G. australe* dans un programme d'amélioration génétique de la principale espèce de cotonnier cultivé, l'hexaploïde *G. hirsutum* x *G. australe* a été rétrocroisé par *G. hirsutum* pendant deux générations successives pour produire des pentaploïdes et des souches aneuploïdes. L'utilisation des pentaploïdes comme parent mâle dans les rétrocroisements avec *G. hirsutum* a donné une importante descendance de plantes autofertiles qui étaient euploïdes ou qui ne portaient qu'un seul chromosome surnuméraire de *G. australe* en plus des 52 chromosomes de *G. hirsutum*. Le caryotype de ces plantes a été déterminé au moyen d'observations cytogénétiques classiques de cellules mères des grains de pollen se trouvant en métaphase I de la méiose et par application de l'hybridation génomique *in situ* (GISH) avec l'ADN total du parent *G. australe* de l'hybride sur des chromosomes en métaphase de la mitose. L'analyse au moyen de marqueurs SSR cartographiés des plantes monosomiques d'addition produites a permis de distinguer parmi elles sept lignées porteuses d'un chromosome différent de *G. australe*. L'expression phénotypique de chacun de ces sept chromosomes de l'espèce australienne en addition du fonds génique de *G. hirsutum* est présentée. Les résultats obtenus mettent en évidence la subjectivité des caractères morphologiques pour distinguer entre elles des lignées monosomiques d'addition et soulignent l'importance de l'emploi de marqueurs moléculaires pour caractériser avec certitude des plantes porteuses de chromosomes surnuméraires étrangers.

Introduction

Le pool génique des espèces sauvages diploïdes du genre *Gossypium* constitue une source importante de gènes d'intérêt pour l'amélioration de l'espèce de cotonnier cultivé tétraploïde ($A_hA_hD_hD_h$) *Gossypium hirsutum* L. (Mergeai 1993). Parmi ces espèces sauvages l'espèce australienne *G. australe* (G_2G_2) présente une série de caractères agronomiques désirables pour l'amélioration génétique de la principale espèce de cotonnier cultivé. Parmi ces caractères, les plus intéressants sont l'inhibition de la synthèse du gossypol uniquement dans la graine, une forte tenacité de la fibre, un haut rendement à l'égrenage, une bonne tolérance au froid et à la sécheresse et la résistance à divers ravageurs (Brubaker et al. 1996, Demol et al. 1978, Muramoto 1969, Ndungo et al. 1988). Le transfert de ces caractéristiques au génome de *G. hirsutum* peut s'obtenir via la réalisation de rétrocroisements successifs de l'hexaploïde *G. hirsutum* x *G. australe* par une variété de son parent cultivé (Brown et Menzel, 1950) ou, indirectement, par la création d'hybrides trispécifiques allotétraploïdes en croisant l'hexaploïde avec une espèce diploïde pont appartenant aux génomes A ou D (Deodikar, 1949). La voie trispécifique est intéressante car dans de telles structures allotétraploïdes, en fonction de l'espèce pont utilisée, les chromosomes des sous-génomes A ou D n'ont pas de partenaires autosyndétiques et doivent s'apparier avec les chromosomes de l'espèce donneuse australienne (Mergeai et al. 1998). Cependant, l'utilisation des tétraploïdes de synthèse AADC ou DDAC demande des efforts considérables pour produire une descendance fertile et éliminer les caractères indésirables apportés par l'espèce donneuse et l'espèce pont (Mergeai et al. 1997, Vroh bi et al. 1999). Bien que la fréquence d'appariements entre chromosomes homéologues de l'espèce australienne et ceux des sous-génomes A_h ou D_h puisse être moindre chez les descendants bispécifiques de l'hexaploïde que chez les hybrides trispécifiques issus de celui-ci, la voie bispécifique offre théoriquement la possibilité d'obtenir une descendance plus nombreuse durant la même période de temps, et donc de produire plus d'événements méiotiques susceptibles d'assurer le transfert des caractères recherchés. De plus, en cas d'exploitation directe de l'hexaploïde par rétrocroisement avec *G. hirsutum*, les chromosomes recombinants présentent une probabilité nettement plus élevée d'être insérés dans des plantes fertiles. Cette voie permet également la production de lignées monosomiques d'addition qui constituent un matériel de choix pour assurer le transfert de caractères portés par les chromosomes d'une espèce diploïde de cotonnier (Hau, 1981). Les lignées monosomiques d'addition permettent également de distinguer les effets spécifiques des différents chromosomes d'une espèce diploïde et d'identifier les homéologies existant entre les chromosomes de cette espèce et ceux de l'espèce cultivée (Rooney et al. 1991). Le présent

article décrit les travaux que nous avons réalisés en vue de produire et de caractériser de nouvelles lignées monosomiques d'addition de l'espèce *G. australe* sur *G. hirsutum* à partir de l'hexaploïde *G. hirsutum* x *G. australe*.

Matériel et méthodes

Matériel végétal

Les hexaploïdes de première (C1 : 6x/1) et de seconde génération (C2 : 6x/2) issus du croisement entre *G. hirsutum* et *G. australe*, portant les numéros G411 et G430 au sein de la collection de génotypes de cotonniers de la Faculté Universitaire des Sciences agronomiques de Gembloux (Maréchal, 1983), ont été rétrocroisés en 1998 et 1999 par le cultivar 'STAM F' de *G. hirsutum* pour produire une descendance BC1 pentaploïde. Les pentaploïdes obtenus ont été autofécondés ou croisés avec *G. hirsutum*, comme parent mâle et femelle, à Gembloux en 1999 pour produire des graines BC1S1 et BC2. Les mêmes pentaploïdes et une partie de la descendance BC2 et BC1S1 de l'hexaploïde ont été cultivés à Cotonou au Bénin de novembre 1999 à avril 2000 pour produire des matériels BC1S1, BC1S2, BC2 et BC2S2. Les descendances BC2S1 de l'hexaploïde ont été cultivées à Gembloux en 2000 et 2001. En Belgique, les nouvelles plantes obtenues dans le cadre de ce travail ont été semées chaque année au début du mois de mai et cultivées toute l'année en serre en conditions d'ensoleillement naturel. A Cotonou, les plantes ont été cultivées en plein champ.

Hybridations

Les fleurs ont été castrées dans l'après midi précédant l'anthèse et leur stigmate recouvert d'un petit sachet en plastique. Le pollen a été appliqué sur les stigmates le lendemain entre 8 et 11 heures. De manière à éviter la chute précoce des capsules, un petit tampon d'ouate imbibé d'une goutte de la solution de régulateurs de croissance (100 mg L⁻¹ d'acide naphtoxyacétique + 50 mg L⁻¹ d'acide gibbérellique) recommandée par Altman et al. (1988) a été appliquée sur l'ovaire juste après la pollinisation. Les résultats des hybridations ont été regroupés par formule de croisement pour faciliter leur interprétation car aucune variation importante n'a été observée entre eux pour une même formule d'hybridation.

Evaluation de la fertilité pollinique

La fertilité pollinique du matériel a été évaluée à Gembloux selon deux méthodes : la méthode de coloration classique dans une solution d'acétocarmin (15 g de carmin par litre d'acide acétique) et la méthode de germination proposée par Barrow (1981). Pour les deux méthodes, mille grains de pollen produits par deux fleurs fraîchement ouvertes ont été utilisés. Seuls les grains présentant une grande taille et une coloration rouge intense ont été considérés comme fertiles au moment de leur observation après 30 minutes dans une solution d'acétocarmin.

Observation des chromosomes

Deux techniques ont été utilisées pour observer les chromosomes : la technique cytogénétique classique basée sur l'observation au microscope optique de plaques métaphasiques de cellules mères des grains de pollen obtenues à partir de jeunes boutons floraux et l'hybridation génomique *in situ* basée sur l'observation au moyen d'un microscope à épifluorescence de plaques mitotiques obtenues à partir de pointes de racine après marquage des chromosomes au moyen de sondes génomiques spécifiques de l'ADN de chacun des parents.

Observation des chromosomes au microscope optique

L'observation des chromosomes au microscope optique a été réalisée à Gembloux. Les jeunes boutons floraux ont été collectés entre 8 et 11 heures du matin en fonction des conditions météorologiques et fixés dans la solution de Carnoy (éthanol à 95% - chloroforme - acide acétique glacial dans des proportions volumiques 6 :3 :1). La solution de fixation a été remplacée par de l'éthanol à 70 % après 48 heures et les boutons ont été conservés à 4°C jusqu'à leur évaluation. Les plaques de cellules en métaphase I ont été obtenues en faisant macérer et en écrasant au moyen d'un scalpel quelques anthères dans une goutte de solution d'acétocarmin sur une lame porte-objet. Après élimination des débris des parois des anthères, la solution contenant les cellules mères des grains de pollen a été recouverte par une lame couvre-objet puis a été légèrement chauffée sur un lampe à alcool de manière à accentuer la coloration des chromosomes à l'acétocarmin. Les cellules mères du pollen ont ensuite été aplaties en exerçant une pression sur la lame couvre-objet. Les observations des plaques métaphasiques ont été réalisées avec un microscope optique Nikon Eclipse E800 sous huile d'immersion.

Observation des chromosomes au microscope à épifluorescence

L'observation des chromosomes du matériel d'origine interspécifique traités par hybridation génomique *in situ* a été réalisée au CIRAD à Montpellier. Les racines utilisées pour la préparation des plaques ont été prélevées sur les plantes cultivées en serre à Gembloux. Toutes les racines excisées ont été traitées avec une solution à 0,04 % de 8-hydroxyquinoline à la température ambiante pendant 4 heures puis fixées pendant 48 à 72 heures dans une solution contenant trois volumes d'éthanol à 70% et un volume d'acide acétique glacial. La solution de fixation a été ensuite remplacée par de l'éthanol à 100 % et les pointes de racines ont été conservées à 4°C jusqu'à leur évaluation. Les plaques métaphasiques ont été préparées selon le protocole de D'hont et al. (1996) dans lequel, après avoir été digérées au moyen de cellulase et de pectolyase, les pointes de racine fixées sont étalées sur une lame dans une solution 3 :1 d'éthanol et d'acide acétique glacial. Les préparations obtenues ont été évaluées

en utilisant un microscope à contraste de phase et les plaques retenues ont été utilisées immédiatement ou conservées à -70°C .

L'ADN de l'hybride hexaploïde et des lignées d'addition a été extrait à Gembloux au moyen du protocole développé par Vroh bi et al. (1996) ; celui des parents *G. hirsutum* (cultivar STAM F) et *G. australe* a été extrait au CIRAD par la méthode décrite par Risterucci et al. (2000), suivie d'une purification par ultracentrifugation dans un gradient de chlorure de césium. L'ADN total du parent *G. australe* de l'hybride hexaploïde a été marqué au moyen de biotine 14-dUTP (kit Gibco BRL 18247-015) associée à un fluorochrome Rouge Texas pour *G. australe*. Après hybridation avec la sonde marquée et détection de la biotine avec le Rouge Texas et coloration au DAPI, selon le protocole de D'hont et al. (1996), les chromosomes ont été observés au moyen d'un microscope à épifluorescence muni d'un système de capture d'image composé d'une caméra CCD et du logiciel QFISH de Leica.

Caractérisation des chromosomes étrangers au génome de G. hirsutum au moyen de marqueurs SSR.

A partir de la carte génétique du cotonnier tétraploïde développée au CIRAD (Lacape et al, 2002), un ensemble de quatre-vingt deux marqueurs SSR répartis sur les 13 paires de chromosomes homéologues du génome A_4D_4 (Liu et al, 2000) ont été utilisés afin de caractériser la nature génétique des chromosomes étrangers présents dans le génome des plantes BC1S1 et BC2 produites à partir de l'hexaploïde *G. hirsutum* x *G. australe*.

Les conditions de PCR et la visualisation des produits amplifiés après marquage à l'aide de $[\text{}^{32}\text{P}]$ ATP puis électrophorèse sur gel de polyacrylamide réalisées à Montpellier sont décrites par Risterucci et al (2000).

Résultats

Production de pentaploïdes (BC1) et de plantes BC1S1 et BC2 à partir de l'hexaploïde G.hirsutum x G.australe

L'obtention d'hybride BC1 à partir de l'hexaploïde *G. hirsutum* x *G. australe* n'a pas été aisée. Le nombre moyen de graines produites par pollinisation était de 1,64 (Tableau 1). Les hybrides pentaploïdes obtenus ont montré un taux de fertilité mâle relativement bon (Tableau 2) mais la grande majorité des graines BC1 n'ont pas donné naissance à de plantes adultes. La plupart de ces graines étaient vides ou contenaient un embryon incomplètement développé.

Tableau 1. Production de graines et de plantes F1 à partir de l'hybride hexaploïde *G. hirsutum* x *G. australe*

Parent femelle	Parent mâle	Nombre de Croisements	Nombre de Graines F1		Nombre de Graines F1 semées	Nombre (%) De plantes Adultes Obtenues
			obtenues	Croisement		
<i>G. hirsutum</i> x <i>G. australe</i> (6x)	<i>G. hirsutum</i> cv STAM F	123	202	1.64	9	2 (22)

Tableau 2. Fertilité pollinique des hybrides hexaploïde et pentaploïde

Genotype	Pourcentage	
	De grains colorés	De grains Germés
<i>G. hirsutum</i> cv STAM F	97,20	95,50
<i>G. australe</i>	96,30	96,00
<i>G. hirsutum</i> x <i>G. australe</i> (6x)	37,20	42,75
<i>G. hirsutum</i> x <i>G. australe</i> (5x)	15,60	19,70

Les deux plantes pentaploïdes obtenues étaient vigoureuses et ont pu être cultivées jusqu'à leur maturité. De manière à disposer de suffisamment de matériel pour réaliser un grand nombre de croisements, ces deux plantes ont été multipliées par greffage en une dizaine d'exemplaires. L'estimation de la fertilité pollinique selon la méthode classique de coloration du pollen à l'acétocarmin et en utilisant la méthode de germination de Barrow (1981) ont donné des résultats similaires (Tableau 2). On constate une chute significative du taux de fertilité pollinique entre les stades hexaploïde (environ 40 %) et pentaploïde (environ 17 %). Cependant, avec un taux de grains colorés de 15,6 % et un taux de germination des grains de pollen de 19,7 %, la fertilité pollinique du pentaploïde *G. hirsutum* x *G. australe* peut être considérée comme relativement bonne par rapport à ce qui est habituellement observé chez de tels types d'hybrides. Les résultats concernant les hybridations réalisées à partir du pentaploïde (Tableau 3) mettent en évidence l'intérêt de ce bon niveau de fertilité pollinique pour la suite du programme d'amélioration du cotonnier au moyen de *G. australe*. L'utilisation du pentaploïde comme parent mâle dans le croisement avec *G. hirsutum* permet d'obtenir respectivement quatre et dix fois plus de graines par hybridation que dans le cas du

croisement en sens inverse et lors de l'autofécondation du pentaploïde. De plus, le taux de survie des plantules issues des graines produites en utilisant le pentaploïde comme parent mâle et la proportion de plantes fertiles issues de ces graines sont très largement supérieures à ce qui est observé pour les deux autres types de croisement.

Parmi la descendance obtenue à partir du pentaploïde *G. hirsutum* x *G. australe*, presque toutes les plantes autofertiles étaient des génotypes BC2 produits en utilisant le pentaploïde comme parent mâle (Tableau 3).

Les 311 plantes BC₂ fertiles obtenues en croisant le pentaploïde et *G. hirsutum* se répartissent en 18 classes phénotypiques (Tableau 4). Dix-sept de ces classes proviennent de graines obtenues en croisant le pentaploïde comme parent mâle et une seule d'entre elles (G₂XII) du croisement en sens inverse. Le nombre d'individus pour chacun de ces 18 phénotypes et leur pourcentage moyen de fertilité en autofécondation comparé à celui du cultivar témoin STAM F sont repris au tableau 4. Parmi ces 18 classes phénotypiques, la classe G₂XVIII qui présentait de loin le nombre le plus élevé d'individus (249 plantes sur 311) et le plus haut niveau de fertilité (98 % de la production de graines du témoin) était également celle dont les caractères qualitatifs et quantitatifs étaient similaires à ceux de *G. hirsutum*. La fréquence d'apparition des dix-sept autres phénotypes était très variable. Elle allait de 21 individus pour le phénotype G₂I à un seul pour douze classes phénotypiques. À part la classe G₂I, deux autres classes se distinguent de l'ensemble par la fréquence de leurs individus. Il s'agit de la classe G₂III avec 13 individus et la classe G₂VII avec 7 individus.

Analyse de la descendance BC₂S₁ de l'hexaploïde

Pour toutes les classes phénotypiques autofertiles identifiées à Cotonou en 1999, une douzaine de graines BC₂S₁ a été semée à Gembloux en 2000 et en 2001. Parmi les dix-huit descendances analysées, treize (celles provenant des classes G₂I à G₂XIII) présentaient une ségrégation de phénotypes permettant de supposer que leur plante mère était porteuse d'un seul chromosome supplémentaire de *G. australe* et des 52 chromosomes de *G. hirsutum*. Les plantes issues de ces treize classes phénotypiques se répartissaient en effet presque toutes en trois phénotypes distincts : (i) des individus similaires phénotypiquement à leur plante mère dont on peut supposer qu'elles sont porteuses d'un seul chromosome surnuméraire de *G. australe* ($4x+1 = 53$ chromosomes), (ii) des individus stériles ou quasi stériles présentant une accentuation de certains caractères de leur plante mère dont on peut supposer qu'elles sont porteuses de deux exemplaires du même chromosome surnuméraire de *G. australe* ($4x+2=54$

Tableau 3. Production de graines BC₂ et BC₁S₁ à partir du pentaploïde *G. hirsutum* x *G. australe*

Parent femelle	Parent mâle	Nombre de Croisements	Nombre de Graines BC ₂ ou BC ₁ S ₁ Obtenues	Nombre de graines BC ₂ ou BC ₁ S ₁ Par croisement	Nombre de graines BC ₂ ou BC ₁ S ₁ semées	Nombre (%) de plantes BC ₂ ou BC ₁ S ₁ obtenues	Nombre (%) de plantes fertiles BC ₂ ou BC ₁ S ₁ obtenues
<i>G. hirsutum</i> x <i>G. australe</i> (5x)	<i>G. hirsutum</i> cv STAM F	195	53	0,27	24	10 (42)	1 (10)(*)
<i>G. hirsutum</i> cv STAM F	<i>G. hirsutum</i> x <i>G. australe</i> (5x)	807	1043	1,29	366	316 (86)	310 (98)
<i>G. hirsutum</i> x <i>G. australe</i> (5x)	<i>G. hirsutum</i> x <i>G. australe</i> (5x)	104	11	0,11	11	3 (27)	0 (0)

(*) 9 plantes totalement stériles et 1 plante presque totalement stérile

Tableau 4. Distribution de fréquence et niveau de fertilité des différents phénotypes fertiles observés dans la descendance du pentaploïde *G. hirsutum* x *G. australe*

Classes phénotypiques	G ₂ I	G ₂ II	G ₂ III	G ₂ IV	G ₂ V	G ₂ VI	G ₂ VII	G ₂ VIII	G ₂ IX
Fréquence	21	1	13	3	3	1	7	1	1
Nombre de graines par plante (% de graines/plante par rapport à la production de <i>G. hirsutum</i> cv STAM F)	102 (41)	109 (43)	197 (78)	205 (82)	210 (84)	213 (85)	210 (84)	214 (85)	138 (55)
Classes phénotypiques	G ₂ X	G ₂ XI	G ₂ XII	G ₂ XIII	G ₂ XIV	G ₂ XV	G ₂ XVI	G ₂ XVII	G ₂ XVIII
Fréquence	1	2	1	1	1	1	2	1	249
Nombre de graines par plante (% de graines/plante par rapport à la production de <i>G. hirsutum</i> cv STAM F)	225 (90)	80 (32)	220 (88)	182 (73)	200 (80)	196 (78)	187 (75)	55 (22)	245 (98)

chromosomes) et (iii) des individus à l'aspect totalement similaire à celui de *G. hirsutum* dont on peut supposer qu'ils sont euploïdes et ne portent aucun chromosome surnuméraire de *G. australe* ($4x = 52$ chromosomes). Aucune plante ressemblant totalement à *G. hirsutum* n'a été trouvée dans la descendance de la classe phénotypique G₂I et aucun cotonnier présentant un faible niveau de fertilité nul ou très réduit avec accentuation de certains traits de la plante mère (plantes supposées disomiques d'addition) n'a été observé dans la descendance de la classe phénotypiques G₂IV. Les observations cytologiques réalisées au microscope optique (Figure 1a) sur au moins une plante de chacune des lignées supposées porteuses d'un chromosome différent de *G. australe* et au moyen de l'hybridation *in situ* (Figure 2), chez une partie de ces plantes, ont confirmé la présence d'un seul chromosome surnuméraire de *G. australe* chez chacune de ces treize classes phénotypiques. De plus, dans la descendance des lignées G₂III, G₂VI, G₂VIII, G₂XI et G₂XII, des plantes dont le phénotype ne correspond à pas à celui des matériels euploïdes, d'addition monosomique et d'addition disomique caractéristiques de chaque lignée ont été découverts. On peut supposer que le phénotype particulier de ces plantes résulte de l'introgression de fragments de chromosomes de l'espèce *G. australe* au sein du génome de *G. hirsutum*. Parmi ces matériels, seules deux plantes provenant de la lignée G₂XI ont été analysées cytologiquement. L'analyse de l'appariement des chromosomes de ces plantes en métaphase 1 de la méiose (Figure 1b) montre qu'il s'agit de matériel à 52 chromosomes qui présentent 25 bivalents et deux univalents. La descendance des cotonniers BC₂ G₂XIV et G₂XV ne comportait que des individus euploïdes à 26 paires de chromosomes qui étaient phénotypiquement similaires à leur plante mère. Six phénotypes distincts ont été observés dans la descendance de la classe phénotypique G₂XXVI : six individus ressemblaient complètement à *G. hirsutum* et cinq individus étaient totalement différents les uns des autres et montraient des signes d'introgression. L'analyse de la descendance BC₂S₁ de la plante G₂XXVII a permis de déduire que leur plante mère était porteuse de deux chromosomes distincts de *G. australe* en plus des 52 chromosomes de *G. hirsutum*. Parmi les onze individus issus du cotonnier G₂XXVII, quatre présentaient le phénotype de *G. hirsutum*, quatre présentaient le phénotype de la classe G₂III, un présentait le génotype de la lignée disomique d'addition G₂III et le dernier présentait le phénotype de la lignée G₂IV

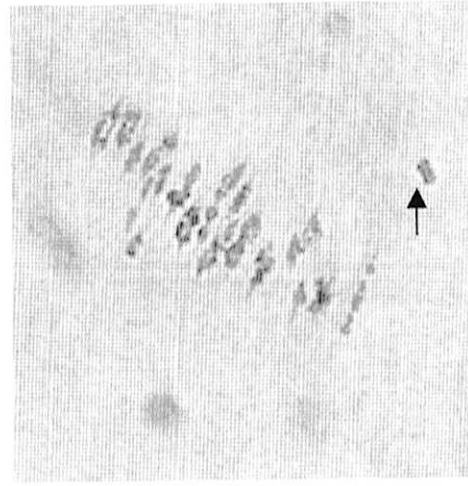


Figure 1a : lignée G₂ III

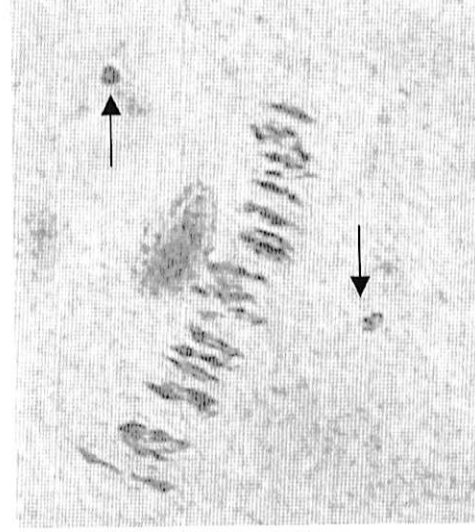


Figure 1b : Intro G₂ XI(1)

Figure 1. a. Plaque métaphasique de la lignée G₂III. b. Plaque métaphasique d'une plante issue de la lignée G₂XI présentant vingt-cinq bivalents et deux univalents
Les flèches indiquent les chromosomes surnuméraires

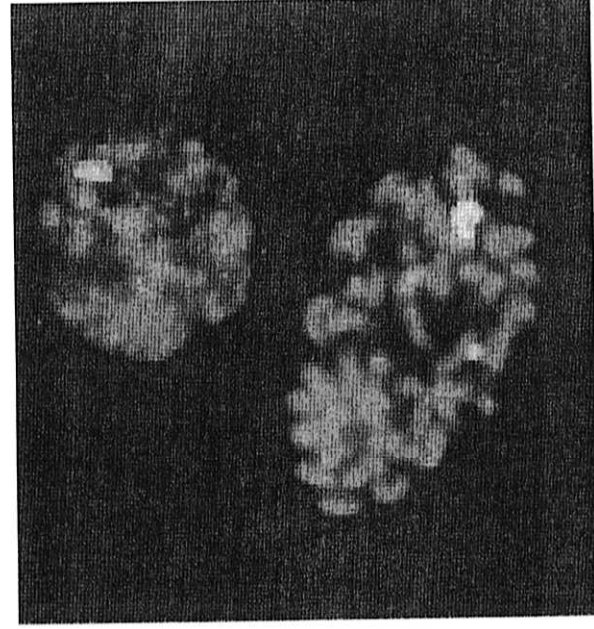


Figure 2. Préparation chromosomique après GISH et coloration au DAPI d'une plante de la lignée d'addition monosomique G₂IV. La superposition de la coloration bleu de l'ensemble des chromosomes par le DAPI et de la coloration rouge (Rouge-Texas) qui révèle le génome de *G. australe* met en évidence le chromosome additionnel de G₂ (en rose). Les autres sites colorés en rose correspondent aux sites ADN ribosomiaux (ADNr). Ces ADNr sont très conservés entre espèces, ce qui explique que les ADNr situés sur les chromosomes de *G. hirsutum* (bleu) soient détectés par l'ADN total de *G. australe* (rouge).

Analyse au moyen de marqueurs SSR des plantes d'addition monosomiques et de deux plantes présentant deux univalents identifiées dans la descendance de l'hexaploïde.

Sur les 82 marqueurs SSR utilisés afin de confirmer la nature génétique du chromosome surnuméraire des treize lignées supposées d'addition monosomique G₂I à G₂XIII isolées dans la descendance BC₂ de l'hexaploïde, 31 ont révélé un polymorphisme traduit par la présence d'un alloallèle SSR spécifique de *G. australe*. Le tableau 5 présente la distribution de ces amplicons spécifiques de *G. australe* observés chez l'hybride hexaploïde, chez les treize plantes d'addition testées, et chez deux plantes issues de la lignée G₂XI comptant 25 bivalents et deux univalents.

Tableau 5. Polymorphisme des marqueurs SSR cartographiés: présence des alloallèles spécifiques de *G. australe* chez les 13 lignées d'addition (I à XIII) et chez 2 plantes présentant 25 bivalents et 2 univalents (Intro1 et Intro2)

SSR	Groupes de liaison	Nb loc	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	Intro1	Intro2
2443	C03 - c17	2						X									
3029	c05sup-c20	2												X			
852	c05sup - c20	2												X			
2448	c05 - c20	2							X								
3992	c05	>2							X								
1671	c20	1							X								
2569	c06	2			X									X			X
3436	c25	2			X		X									X	
3103	c25	2			X					X				X			
2884	c06	1			X					X				X			
1604	c07	2				X							X				
1694	c07	2				X							X				
3008	c16	1				X							X				
3031	c09 - c23	2							X			X				X	X
2847	c09	1							X			X				X	X
1317	c09 - c23	2							X		X					X	X
4053	c09bot-c23	2							X		X					X	X
3838	D04	1	X														
946	D04	2	X														
3563	c10	2	X														
1045	c12-c26	2						X								X	X
3537	c26	1						X								X	X
1673	c12	1						X								X	X
3599	c12 - c26	2						X								X	X
3261	c12	>2						X								X	X
2571	A01 - c18	2												X			
3479	c18	2												X			
2652	A01-c18	2												X			
3556	A02	2														X	
3474	A02-D03	2														X	X
1646	A02 - D03	2														X	X

La présence d'alloallèles marqueurs du génome de *G australe* chez certaines des lignées d'addition, et le fait que ces marqueurs ont par ailleurs été cartographiés et assignés à certains chromosomes, ou paires de chromosomes homéologues, du génome tétraploïde, conduit à proposer des assignations chromosomiques pour chacune des lignées d'addition.

Dans le cas des lignées G₂I, G₂V et G₂VI, les assignations, qui sont propres à ces lignées, correspondent respectivement aux homéologies c10-D04 (pour G₂I), c12-c26 (pour G₂V) et c3-c17 (pour G₂VI).

Dans le cas de G₂XII on retrouve des bandes spécifiques *G australe* par ailleurs cartographiées sur 2 paires homéologues, c5-c20 et A01-c18. Les 2 SSR (3029 et 852) cartographiés sur c5 et c20 sont proches et séparés entre eux de moins de 10 cM ; tandis que les 3 SSR de la paire A01-c18 couvrent les $\frac{3}{4}$ de la longueur de ces chromosomes (150 cM sur 200). Cette lignée d'addition pour un chromosome *G australe* homéologue de A01-c18 pourrait ainsi avoir subi en plus une introgression par recombinaison d'un fragment du chromosome *G australe* homéologue de c5-c20.

Les autres lignées peuvent être distribuées en trois groupes distincts sur la base des identités observées pour les marqueurs SSR spécifiques de *G australe* :

- lignées G₂IV et G₂XI identiques entre elles avec un chromosome *G australe* surnuméraire homéologue de la paire c7-c16. L'amplicon spécifique de *G. australe* correspondant au marqueur SSR 3008 n'est pas présent au niveau de la lignée G₂XI. Ceci pourrait être dû à une délétion d'un fragment du chromosome surnuméraire de *G. australe* chez cette lignée.
- lignées G₂II, G₂VII, G₂IX et G₂X avec chacune un chromosome *G australe* surnuméraire homéologue de la paire c9-c23 (environ $\frac{1}{2}$ de la longueur totale couverte par les locus marqueurs). Dans le cas de la lignée G₂IX, la présence supplémentaire de 3 SSR de la paire A02-D03 couvrant également une longueur importante (130 cM sur 225) de ces chromosomes, ne permet pas de conclure sur les échanges génomiques (addition, substitution, recombinaison) mis en jeu dans le cas de cette lignée. Les amplicons spécifiques de *G. australe* correspondant aux marqueurs SSR 1317 et SSR 4053 ne sont pas présents au niveau de la lignée G₂X. Ceci laisse supposer la délétion d'un fragment du chromosome surnuméraire de *G. australe* chez cette lignée.
- lignées G₂III, G₂VIII et G₂XIII avec chacune un chromosome *G australe* surnuméraire homéologue de la paire c6-c25, grâce à 4 SSR couvrant la totalité de la longueur de ces chromosomes. Dans le cas de la lignée G₂VIII, on observe une homéologie additionnelle avec la paire c5-c20 (3 SSR couvrant 75 cM dans une partie centrale).

Le cas du marqueur SSR3436, cartographié sur c25 et présent comme attendu sur les lignées G₂III et G₂VIII mais également sur la lignée G₂V (homéologie c12-c26), est probablement dû à une confusion entre les allèles de 2 locus dupliqués et de même migration (homoplasie). Les 2 plantes, intro 1 et intro 2, portant deux univalents présentent systématiquement les marqueurs *G australe* retrouvés sur la lignée G₂V (addition du chromosome homéologue de c12-c26) d'une part, et des lignées G₂II, G₂VII et G₂IX (addition du chromosome homéologue de c9-c23) d'autre part. Ces résultats laissent supposer que ces 2 génotypes ont subi une double substitution (ou une recombinaison) de 2 chromosomes *G hirsutum* par des chromosomes *G australe* homéologues des chromosomes *G hirsutum* c9-c23 (4 SSR sont marqueurs de la ½ de la longueur) et c12-c26 (5 SSR sont marqueurs de 130 cM sur 180).

A la suite de ces résultats, le matériel constitué par les 13 lignées d'addition identifiées dans la descendance du pentaploïde, a été rassemblé en sept groupes sur la base des homéologies identifiées avec les chromosomes du génome *G hirsutum* : G₂A (lignée G₂I) , G₂B (lignées G₂II, G₂VII et G₂X), G₂C (lignées G₂III, et G₂XIII), G₂D (lignées G₂IV et G₂XI), G₂E (lignée G₂V), G₂F (lignée G₂VI) et G₂G (lignée G₂XII).

Deux lignées G₂VIII et G₂IX présentent des allèles *G australe* de SSR cartographiés sur 2 paires homéologues, c5-c20 et c6-c25 pour G₂VIII d'une part et c9-c23 et A02-D03 pour G₂IX d'autre part. Il apparaît probable que ces plantes portent bien 1 chromosome *G australe* additionnel, la formule caryologique étant de 26 bivalents et 1 univalent, mais ont également subi une introgression au stade pentaploïde d'un fragment d'un autre chromosome *G australe*, sans que toutefois il ne soit possible d'assigner les homéologies concernées entre chromosome surnuméraire et fragment de chromosome introgressé.

Les plantes intro 1 et intro 2 provenant de la lignée G₂D et ne sont pas porteuses du chromosome de *G. australe* spécifique de cette lignée mais de chromosomes (ou de grands fragments de chromosomes) caractéristiques des lignées G₂VIII et G₂IX. L'explication la plus plausible de cette observation est la réalisation au Bénin d'un croisement naturel entre des ovules d'une plante de la lignée G₂XI et des grains de pollen d'une autre souche aneuploïde porteuses des deux chromosomes (ou fragments de chromosomes) de *G. australe* identifiés au moyen de marqueurs SSR.

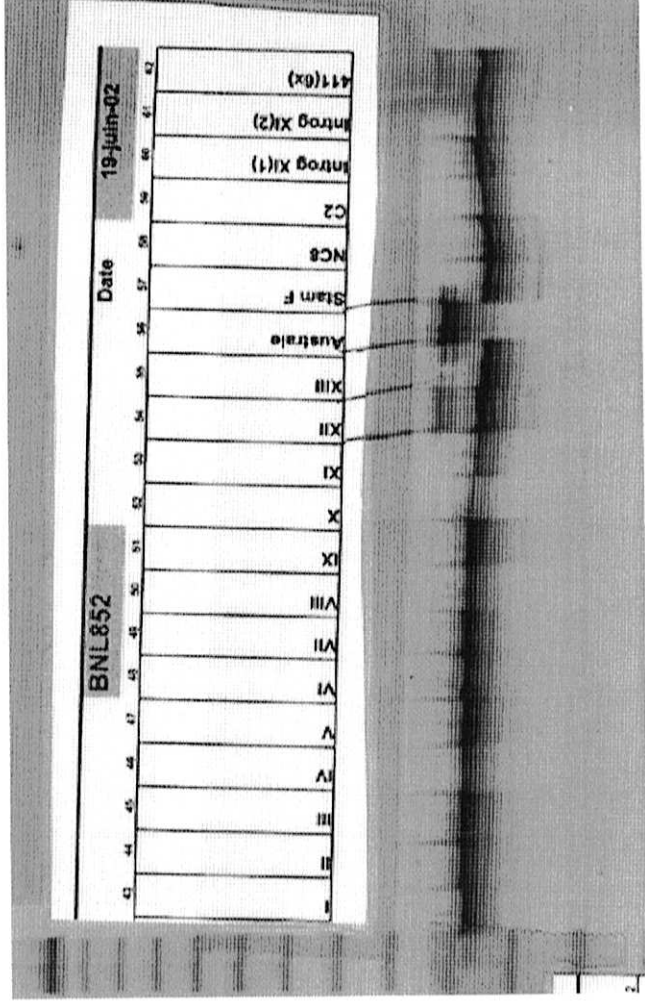


Figure 3. Electrophorégramme obtenu par amplification de l'ADN des matériels comparés avec l'amorce SSR 852

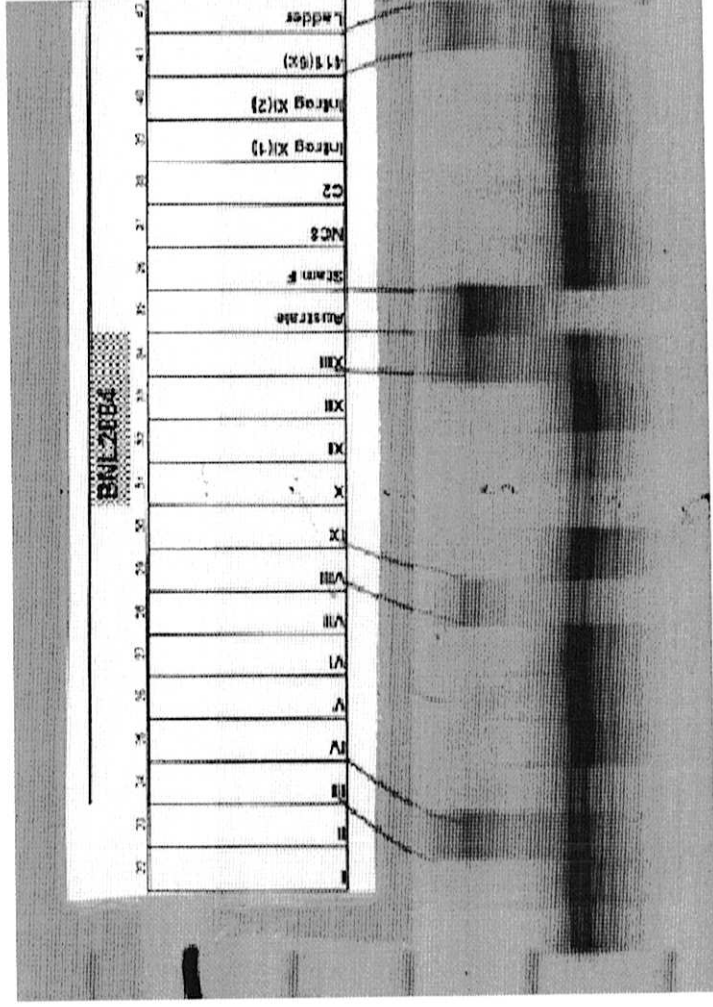


Figure 4. Electrophorégramme obtenu par amplification de l'ADN des matériels comparés avec l'amorce SSR 2884

Effet de l'addition de chacun des sept chromosomes surnuméraires de G. australe sur le phénotype de G. hirsutum.

Les caractères morphologiques permettant de distinguer sans ambiguïté les plantes produites dans la descendance des pentaploïdes en fonction de la nature du chromosome surnuméraire de *G. australe* qu'elles portent sont finalement relativement peu nombreux et de nature essentiellement qualitative. Les plus discriminants sont la couleur de la corolle, la position du stigmate par rapport à la colonne staminale et la couleur de la fibre. Les phénotypes de chacun de ces caractères pour les sept lignées monosomiques d'addition isolées dans la descendance de l'hybride pentaploïde *G. hirsutum* x *G. australe* sont repris au Tableau 6. La couleur rose de la corolle permet ainsi de distinguer aisément les plantes porteuses du chromosome G₂D. Il en va de même pour la couleur brune des fibres pour la lignée G₂C. Une série d'autres caractères, comme le port, la taille et la forme des capsules sont utiles mais ne permettent pas d'identifier à eux seul de manière univoque la nature du chromosome surnuméraire de *G. australe*. Si la lignée G₂D présente une certaine réduction de la teneur en gossypol dans ses graines, on ne peut pas dire que celle-ci soit drastique ; ce qui laisse supposer l'intervention d'autres gènes de *G. australe*, portés par des chromosomes que nous n'avons pas réussi à isoler à l'état d'addition monosomique, dans l'expression de l'inhibition de la synthèse du gossypol uniquement dans la graine. La plupart des capsules portées par les plantes monosomiques d'addition de la lignée G₂F ont leur sommet dirigé vers le bas suite à une forte courbure du pédoncule. Ce caractère qui n'avait jusqu'à présent été observé que chez les cotonniers diploïdes sauvages australiens appartenant à la section *Grandicalyx*, (Craven et al. 1995) présente un grand intérêt agronomique car il favorise la qualité de la fibre en empêchant le développement de pourritures dues à l'accumulation d'eau dans le coton-graine en cas de pluies tardives après la déhiscence du fruit.

Tableau 6. Effet de l'addition de chacun des sept chromosomes surnuméraires de *G. australe* sur le phénotype de *G. hirsutum*

Chromosome	G ₂ A	G ₂ B	G ₂ C	G ₂ D	G ₂ E	G ₂ F	G ₂ G
Port	Buissonnant	Elancé	Pyramidal	Pyramidal	Elancé	Cluster	Pyramidal
Corolle	Crème	Crème	Crème	Rose	Crème	Crème	Crème
Stigmate	Brévistyle	Normal	Longistyle	Brévistyle	Normal	Normal	Longistyle
Capsules	Petite	Petite	Normale	Normale	Grosse	Pendante	Petite
Fibre	Blanche	Blanche	Brune	Blanche	Blanche	Blanche	Blanche

Discussion et conclusion

Comme cela a déjà été mis en évidence par Dilday (1986), Koto (1989), Altman et al. (1987) et Brubaker et al. 1999, obtenir des pentaploïdes à partir de l'hexaploïde *G. hirsutum* x *G. australe* est nettement plus aisé que de produire des plantes aneuploïdes à partir de ces pentaploïdes. Le taux de réussite de ces opérations varie en fonction du type (autofécondation ou rétrocroisement) et du sens des croisements réalisés. Nos données confirment que le pentaploïde *G. hirsutum* x *G. australe* présente une fertilité pollinique relativement élevée et qu'il n'est pas nécessaire d'avoir recours aux techniques de sauvetage d'embryon pour utiliser ce type de matériel dans un programme d'amélioration. Contrairement à Koto (1989), nous avons réussi à produire des graines en autofécondant le pentaploïde. Si le taux de réussite du croisement dans le sens pentaploïde (parent femelle) x *G. hirsutum* (parent mâle) était relativement faible, la réalisation du croisement réciproque *G. hirsutum* (parent femelle) x pentaploïde (parent mâle) a permis de produire une descendance abondante dont la majorité des plantes présentaient un bon niveau de fertilité. Ces plantes autofertiles étaient généralement euploïdes ($2n = 4x = 52$) ou ne portaient qu'un seul chromosome surnuméraire de l'espèce australienne ($2n = 4x + 1 = 53$). Des résultats similaires ont été obtenus par Koto (1983) dans la descendance du croisement de *G. hirsutum* par le pentaploïde *G. hirsutum* x *G. longicalyx* utilisé comme parent mâle. Les plantes issues de l'autofécondation du pentaploïde ou des croisements dans lesquels il était utilisé comme parent femelle était par contre généralement totalement stériles. Le même type d'observation a été réalisé par Poisson (1970), André et Verschraege (1984), Koto (1983), Altman et al (1987) et Brubaker et al. (1999) sur des hybrides pentaploïdes bispécifiques impliquant *G. hirsutum* et des espèces diploïdes appartenant aux génomes B, C, E, G ou F du genre *Gossypium*. Les plantes autostériles produites dans la descendance rétrocroisée de ces pentaploïdes portaient généralement plusieurs chromosomes étrangers. Nos résultats confirment indirectement la meilleure tolérance des gamètes femelles par rapport aux gamètes mâles à l'addition multiple de chromosomes d'une autre espèce. Ils confirment également les observations faites par Hau (1981), Koto (1983), Poisson (1970) et Schwendiman (1978) sur la meilleure compétitivité des gamètes mâles de cotonnier quand ils portent un seul chromosome surnuméraire comparé à ceux portant plusieurs chromosomes étrangers. Pour l'hybride *G. hirsutum* x pentaploïde, il ne sont cependant pas conforme à la règle générale qui veut que le plus haut taux de succès dans un croisement interspécifique soit obtenu quand on utilise le matériel présentant le plus haut niveau de ploïdie comme parent femelle (Beasley, 1941).

Les données obtenues montrent que, pour peu que la fertilité mâle du pentaploïde soit suffisante, l'isolement d'un nombre élevé de familles d'addition monosomique d'une espèce diploïde sur *G. hirsutum* est une opération relativement aisée et que la production de souches monosomiques d'addition est un phénomène fréquent dans la descendance du croisement du pentaploïde *G. hirsutum* x *G. australe* par *G. hirsutum* utilisé comme parent femelle. Selon les observations morphologiques et cytologiques que nous avons réalisées, environ 20 % des plantes issues du pentaploïde portaient un chromosome surnuméraire de *G. australe* en plus de la garniture chromosomique complète de l'espèce cultivée. Les marqueurs moléculaires microsatellites se sont montrés très utiles pour confirmer le statut chromosomique des lignées d'addition isolées. Les homologies génomiques des chromosomes *G. australe* (génome G_2) avec ceux de *G. hirsutum* (génome A_hD_h) ont également pu être révélées grâce aux séquences flanquantes des SSR conservées entre ces espèces. De plus, les résultats des analyses au moyen des marqueurs moléculaires de l'ADN ont montré que l'utilisation des seuls caractères morphologiques ne permettait pas de distinguer entre elles de manière univoque les plantes porteuses du même chromosome surnuméraire de l'espèce australienne. Sur base des données obtenues, il apparaît en effet que seulement sept chromosomes distincts de *G. australe* se trouvent à l'état d'addition monosomique chez les treize familles de plantes au phénotype différent porteuses d'un chromosome surnuméraire de l'espèce australienne que nous avons isolées dans la descendance du pentaploïde. Plusieurs facteurs peuvent expliquer la très grande variation de l'aspect de plantes porteuses d'un même chromosome surnuméraire de *G. australe*. Il y a tout d'abord le nombre de variétés qui sont intervenues dans la création de ces lignées. Le phénotype de chaque plante porteuse du même chromosome surnuméraire de *G. australe* varie en effet en fonction de la ségrégation des caractères des trois cultivars de *G. hirsutum* qui sont intervenus dans sa création. De plus, on peut supposer que l'expression de ces différentes combinaisons de caractères est influencée différemment par les gènes du même chromosome surnuméraire de *G. australe*. Il y a ensuite l'introgression chez les plantes issues du pentaploïde de fragments d'autres chromosomes de *G. australe* que celui qui s'y trouve à l'état d'addition monosomique. Ainsi, au moins trois (G_2VIII , G_2IX et G_2XII) des treize lignées au phénotype distinct porteuses d'un chromosome surnuméraire de *G. australe* identifiées lors de nos travaux présentaient également dans leur génome des fragments de plus ou moins grande taille d'autres chromosomes de *G. australe*. A cela vient s'ajouter la délétion probable de fragments du chromosome surnuméraire de *G. australe* chez certaines des lignées isolées, comme tend à le montrer l'absence de certains amplicons SSR spécifiques du

chromosome surnuméraire de *G. australe* présent chez les lignées G₂X et G₂XI. Les résultats obtenus mettent donc en évidence la subjectivité des caractères morphologiques pour distinguer entre elles des lignées monosomiques d'addition et soulignent l'importance de l'emploi de marqueurs moléculaires de l'ADN pour caractériser avec certitude des plantes porteuses de chromosomes surnuméraires étrangers.

Nos résultats indiquent que chaque chromosome surnuméraire possède un taux de transmission qui lui est propre et qui peut être très variable. Ces variations peuvent s'expliquer par la variation du degré de similitude entre ce chromosome et ses homéologues au sein de *G. hirsutum* et par une série de facteurs plus ou moins favorables agissant sur la viabilité du gamète aneuploïde, sur le développement du zygote, sur la germination des graines aneuploïdes et sur la survie des plantules porteuses d'un chromosome additionnel. Des observations similaires concernant la variabilité du taux de transfert des différents chromosomes d'une espèce diploïde dans la descendance de pentaploïdes impliquant des espèces diploïdes des génomes B, C, E et F ont été faites par Poisson (1970), Hau (1981), André (1983), Koto (1983), Rooney et al. (1991) et Mergeai et al. (1993).

Le relativement bon niveau de fertilité observé pour la souche G₂XVII porteuse de deux chromosomes surnuméraires différents (chromosomes G₂III et G₂IV) par rapport aux plantes porteuses d'un même chromosome additionnel en double exemplaire montre que l'addition de deux chromosomes distincts a tendance à être moins néfaste pour la plante que lorsqu'il s'agit d'une addition disomique du même chromosome. Cette observation confirme les conclusions de Poisson (1970) et de Schwendiman (1978) qui stipulent que l'addition de deux chromosomes différents est beaucoup mieux acceptée par la plante sauf si ceux-ci sont homéologues l'un de l'autre. Le comportement observé au niveau de la souche G₂XVII montre également que l'action des gènes portés par deux chromosomes différents a tendance à s'additionner.

Les essais préliminaires d'hybridation *in situ* de l'ADN (GISH) que nous avons réalisés ont montré que cette technique constituait un outil intéressant pour mettre en évidence l'introgression de fragments de chromosomes étrangers chez *G. hirsutum*. L'emploi de cette technique nous paraît particulièrement pertinent pour éclaircir des situations où l'introgression de fragments de plusieurs chromosomes étrangers dans une même plante est mise en évidence par les marqueurs moléculaires de l'ADN, comme c'est par exemple le cas au niveau de nos lignées G₂VIII et G₂IX.

Les différentes lignées monosomiques d'addition que nous avons isolées dans la descendance du pentaploïde *G. hirsutum* x *G. australe* constituent un matériel de choix pour mener des

études génétiques complémentaires de type fondamental et appliqué. Après avoir mieux précisé les caractères d'intérêt agronomique susceptibles d'être apportés par chacune de ces lignées, celles-ci pourront servir à l'introgession chez la principale espèce de cotonnier cultivé des caractères retenus. Dans cette perspective, l'emploi des marqueurs cartographiés de l'ADN sera très utile pour faciliter le transfert de caractères d'intérêt de *G australe* chez *G hirsutum* et pour quantifier le taux d'introgession de fragments du chromosome additionnel de *G australe* dans la descendance de chaque lignée. Ce matériel permettra également de distinguer les effets spécifiques des différents chromosomes de *G australe* sur le fonds génique de *G. hirsutum* et de compléter les travaux en cours concernant l'établissement d'une carte du génome du cotonnier.

Remerciements

Ce travail a été financé par la convention 2.4536.99 du « Fonds de la recherche fondamentale collective » de Belgique.

Références bibliographiques

- Altman, D.W., D.M. Stelly and R.J. Kohel. 1987. Introgression of the glanded-plant and glandless-seed trait from *Gossypium sturtianum* Willis into cultivated upland cotton using ovule culture. *Crop Sci.* 27:880-884.
- Altman, D.W. 1988. Exogenous hormone applications at pollination for in vitro and in vivo production of cotton interspecific hybrids. *Plant Cell Rep.* 7:257-261.
- André, B., and L. Verschraege. 1984. Amélioration du cotonnier *Gossypium hirsutum* L. par hybridation interspécifique : utilisation de l'espèce *G. areysianum* Delf. *Hutch. Bull. Rech. Agron. Gembloux*, 18 :151-164.
- Barrow, J.R. 1981. A new concept in assessing cotton pollen germinability. *Crop Sci.* 21:441-444.
- Beasley, J.O. 1940. The production of polyploids in *Gossypium*. *J. Hered.* 31:39-48.
- Beasley, J.O. 1941. Hybridization, cytology and polyploidy of *Gossypium*. *Chron. Bot.* 6:394-395.

- Brown, M.S., and M.Y. Menzel. 1950. New trispecies hybrids in cotton. *J. Hered.* 41 :291-295.
- Brubaker, C.L., C.G. Benson, C. Miller, and D.N. Leach. 1996. Occurrence of terpenoid aldehydes and lysigenous cavities in the glandless seeds of Australian *Gossypium* species. *Aust. J. Bot.* 44:601-612.
- Brubaker C.L., A.H.D., Brown, J.McD., Stewart, M.J., Kilby, and J.P. Grace. 1999. Production of fertile hybrid germplasm with diploid Australian *Gossypium* species for cotton improvement. *Euphytica*, 108 :199-213.
- Demol, J., L., Verschraege, and R. Marechal. 1978. Utilisation des espèces sauvages en amélioration cotonnière. Observations sur les caractéristiques technologiques des nouvelles formes allohexaploïdes. *Coton Fibres Trop.* 33:327 - 333.
- Deodikar, G.B. 1949. Cytogenetic studies on crosses of *Gossypium anomalum* with cultivated cottons. I. (*G. hirsutum* x *G. anomalum*)doubled x *G. hirsutum*. *Ind. J. Agric. Sci.* 19 :389-399.
- Dilday, R.H. 1986. Development of cotton plant with glandless seeds and glanded foliage and fruiting forms. *Crop Sci.* 26:639-641.
- Hau, B. 1981. Lignées d'addition sur l'espèce *G. hirsutum*. II. Description phénotypique de quelques lignées d'addition monosomique. *Coton Fibres Trop.* 36: 285-296.
- Koto, E. 1983. Tentative d'utilisation de l'espèce sauvage diploïde *Gossypium longicalyx* pour l'amélioration de l'espèce cultivée tétraploïde *G. hirsutum* L. par la méthode des lignées d'addition et de substitution. Ph.D. thesis. University of Orsay, France.
- Koto, E. 1989. Tentative de transfert du caractère "retard à la morphogénèse des glandes à gossypol".I. Caractéristiques des hexaploïdes *G. hirsutum* x *G. sturtianum* et *G. hirsutum* x *G. australe*. 1re Conférence de la recherche cotonnière africaine, Lomé, Togo, 31 janv.-2 fév., 1989, IRCT, Montpellier, Tome I. 167-173.

- Lacape J.-M., Nguyen T.-B., Thibivilliers S., Bojinov B., Matz E.C., Blewitt M., Courtois B., Cantrell R.G., Burr B., and Hau B. 2002. First combined RFLP-SSR-AFLP map of tetraploid cotton based on a *Gossypium hirsutum* x *Gossypium barbadense* backcross population. Genome. Soumis].
- Maréchal, R. 1983. A collection of interspecific hybrids of genus *Gossypium*. Coton Fibres Trop. 38:240-246.
- Mergeai, G., J.M. Noël, J. Louwagie, and J.P. Baudoin. 1993. Utilisation du cotonnier sauvage *G. areysianum* pour l'amélioration de l'espèce cultivée *G. hirsutum* L.
- Description de deux nouvelles lignées d'addition monosomiques. Coton Fibre Trop. 48 :231-250.
- Mergeai, G., J.P. Baudoin and I. Vroh Bi. 1997. Exploitation of trispecific hybrids to introgress the glandless seed and glanded plant trait of *Gossypium sturtianum* Willis in *G. hirsutum* L. Biotech. Agron. Soc. Environ. 1 :272-277.
- Mergeai, G, I. Vroh Bi, J.P. Baudoin and P. du Jardin. 1998. Use of randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers to assist wide hybridization in cotton. p. 121-139. In Y.P.S. Bajaj (ed.). Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 42, Cotton. Springer verlag. Berlin.
- Muramoto, H. 1969. Hexaploid cotton: some plant and fiber properties. Crop Sci. 9:27-29
- Ndungo, V., J., Demol, and R. Maréchal. 1988. L'amélioration du cotonnier *G. hirsutum* L. par hybridation interspécifique. 3. Applications et résultats obtenus. Bull. Rech. Agron. Gembloux, 23:283-316.
- Poisson, C. 1970. Contribution à l'étude de l'hybridation interspécifique dans le genre *Gossypium* : transfert de matériel génétique de l'espèce sauvage diploïde *G. anomalum* à l'espèce cultivée *G. hirsutum*. Ph.D. thesis. University of Orsay, France.
- Risterucci, A.M., Grivet, L., N'Goran, J.A.K., Pieretti, I., Flament, M.H., and Lanaud, C. 2000. A high density linkage map of *Theobroma cacao* L. Theor. Appl. Genet. 101 : 948-955.

- Rooney, W.L., D.M. Stelly, and D.W. Altman. 1991. Identification of *four Gossypium sturtianum* monosomic alien addition derivatives from a backcrossing program with *G. hirsutum*. *Crop Sci.* 31:337-341.
- Schwendiman, J. 1978. L'amélioration du cotonnier *Gossypium hirsutum* par hybridation interspécifique: utilisation des espèces *G. barbadense* et *G. stocksii*. Ph.D. thesis. University of Orsay, France.
- Stephens, S.G. 1942. Colchicine-produced polyploids in *Gossypium*. I. An autotetraploid Asiatic cotton and certain of its hybrid with diploid species. *J. Genet.* 44:272-295.
- Vroh bi, I., A. Maquet, J.P. Baudoin, P. du Jardin, J.M. Jacquemin, and 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.