



UNIVERSITE  
JEAN LOROUGNON GUEDE  
UFR AGROFORESTERIE

REPUBLIQUE DE CÔTE D'IVOIRE

Union-Discipline-Travail

-----

Ministère de l'Enseignement Supérieur et  
de la Recherche Scientifique

ANNEE : 2019-2020

N° D'ORDRE :

023 - 2020

CANDIDAT

Nom : N'GUESSAN

Prénom : Affoué Sylvie  
Rachelle

# THESE DE DOCTORAT

**Mention : Agriculture et Foresterie Tropicale**  
**Spécialité : Biotechnologie et Physiologie**  
**Végétales**

**Embryogenèse somatique indirecte et  
micropropagation chez le cotonnier [*Gossypium*  
*hirsutum* L. (malvaceae)] : étude des facteurs limitants  
et évaluation de quelques paramètres biochimiques**

## JURY

Président : M. DONGUI Bini Kouamé, Professeur Titulaire, Université  
Jean Lorougnon Guédé

Co-Directeurs : M. KOUADIO Yatty Justin, Professeur Titulaire,  
Université Jean Lorougnon Guédé

M. KOUAKOU Tanoh Hilaire, Professeur Titulaire, Université Nangui  
Abrogoua

Rapporteur : M. BOYE Mambé Auguste-Denise, Maître de Conférences,  
Université Jean Lorougnon Guédé

Examineurs : M. BROU Yao Casimir, Maître de Conférences, Institut  
National Polytechnique Félix Houphouët-Boigny

Mme. TONESSIA Dolou Charlotte, Maître de Conférences, Université  
Jean Lorougnon Guédé

Soutenu publiquement  
le : 17 / 10 / 2020



UNIVERSITE  
JEAN LOROUGNON GUEDE

UFR AGROFORESTERIE

REPUBLIQUE DE CÔTE D'IVOIRE

Union-Discipline-Travail

-----

Ministère de l'Enseignement Supérieur  
et de la Recherche Scientifique

ANNEE : 2019-2020

N° D'ORDRE :

023 - 2020

# THESE DE DOCTORAT

**Mention : Agriculture et Foresterie Tropicale**  
**Spécialité : Biotechnologie et Physiologie**  
**Végétales**

**Embryogenèse somatique indirecte et  
micropropagation chez le cotonnier [*Gossypium*  
*hirsutum* L. (malvaceae)] : étude des facteurs limitants  
et évaluation de quelques paramètres biochimiques**

## CANDIDAT

Nom : N'GUESSAN

Prénom : Affoué Sylvie  
Rachelle

Soutenue publiquement

le : 17 / 10 / 2020

## JURY

Président : M. DONGUI Bini Kouamé, Professeur Titulaire, Université  
Jean Lorougnon Guédé

Co-Directeurs : M. KOUADIO Yatty Justin, Professeur Titulaire,  
Université Jean Lorougnon Guédé

M. KOUAKOU Tanoh Hilaire, Professeur Titulaire, Université Nangui  
Abrogoua

Rapporteur : M. BOYE Mambé Auguste-Denise, Maître de Conférences,  
Université Jean Lorougnon Guédé

Examineurs : M. BROU Yao Casimir, Maître de Conférences, Institut  
National Polytechnique Félix Houphouët-Boigny

Mme. TONESSIA Dolou Charlotte, Maître de Conférences, Université  
Jean Lorougnon Guédé

## TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACES .....	ix
REMERCIEMENTS .....	x
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS .....	xiii
LISTES DES TABLEAUX.....	xvi
LISTES DES FIGURES.....	xviii
INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
PREMIÈRE PARTIE : GÉNÉRALITÉS .....	6
1. COTONNIER ET SON ENVIRONNEMENT : BIOLOGIE ET IMPORTANCE.....	7
1.1. Origine et histoire .....	7
1.2. Taxonomie .....	7
1.3. Exigences écologiques.....	8
1.3.1. Besoins en chaleur .....	8
1.3.2. Besoin en eau.....	8
1.3.3. Le type de sols .....	9
1.4. Morphologie .....	9
1.5. Physiologie .....	11
1.6. Mode de croissance et développement .....	12
1.7. Culture .....	13
1.7.1. Variétés de cotonnier .....	14
1.7.2. Coton biologique .....	14
1.7.3. Coton transgénique .....	15
1.8. Importance socio-économique.....	16
2. CULTURE <i>IN VITRO</i> CHEZ LES VÉGÉTAUX .....	18
2.1. Généralités .....	18
2.2. Différentes méthodes de culture <i>in vitro</i> .....	18
2.2.1. Micropropagation .....	18

2.2.1.1 Microbouturage .....	19
2.2.1.2. Culture de méristèmes .....	19
2.2.1.3. Embryogenèse somatique .....	19
2.2.1.3.1. Embryogenèse somatique directe .....	21
2.2.1.3.2. Embryogenèse somatique indirecte .....	21
2.3. Facteurs influençant la culture <i>in vitro</i> .....	24
2.3.1. Composition du milieu de culture .....	24
2.3.1.1. Type de milieu de culture .....	24
2.3.1.2. Régulateurs de croissance.....	26
2.3.1.3. Géloses.....	27
2.3.1.4. Hydrates de carbone .....	28
2.3.1.5. Anti-oxydants .....	28
2.3.1.6. Acides aminés.....	29
2.3.1.6.1. Hydrolysats de caséine .....	29
2.3.1.6.2. Glutamine et l'asparagine .....	29
2.3.1.6.3. Glycine.....	30
2.3.2. Facteurs environnementaux .....	30
2.3.2.1. Lumière et photopériode.....	30
2.3.2.2. Température et hygrométrie .....	30
2.3.3. Facteurs liés à l'explant .....	31
2.3.3.1. Espèces et genres .....	31
2.3.3.2. Nature et état de l'explant .....	31
2.3.3.3. Taille de l'explant.....	31
2.4. Avantages et inconvénients de la culture <i>in vitro</i> .....	32
3. COMPOSÉS BIOCHIMIQUES INTERVENANT DANS LE PROCESSUS DE L'EMBRYOGENÈSE SOMATIQUE .....	34
3.1. Composés phénoliques .....	34

3.2. Protéines .....	35
3.3. Phénylalanine ammonia-lyase (PAL).....	35
3.4. Tyrosine ammonia-lyase (TAL) .....	36
3.5. Gaïacol Peroxydases (GPx).....	36
3.6. Polyphénoloxydase (PPO).....	36
3.7. Ascorbate peroxydase et catalase .....	36
DEUXIÈME PARTIE : MATÉRIEL ET MÉTHODES .....	37
1. ÉTUDE DE L'EMBRYOGENÈSE SOMATIQUE INDIRECTE CHEZ LE COTONNIER .....	38
1.1. INDUCTION DE CALS CHEZ LE COTONNIER.....	38
1.1.1. Matériel végétal .....	38
1.1.2. Méthodes .....	38
1.1.2.1. Site d'étude .....	38
1.1.2.2. Delintage des graines.....	39
1.1.2.3. Préparation des milieux et conditions de culture.....	40
1.1.2.3.1. Milieu de germination de graines .....	40
1.1.2.3.2. Milieu d'induction de cals .....	40
1.1.2.3.4. Conditions de culture.....	41
1.1.2.4. Désinfection et germination <i>in vitro</i> des graines.....	41
1.1.2.4.1. Induction et prolifération des cals .....	42
1.1.2.4.2. Influence des sources de carbone sur la callogenèse .....	43
1.1.2.4.3. Influence de la concentration de la meilleure source de carbone sur la callogenèse .....	44
1.1.2.4.4. Influence des auxines sur la callogenèse .....	44
1.1.2.4.5. Influence des cytokinines sur la callogenèse .....	44
1.1.2.4.6. Influence des cytokinines en présence de 0,1 mg.L <sup>-1</sup> 2,4-D sur la callogenèse ...	44
1.1.2.4.7. Influence du type d'explant sur la callogenèse chez le cotonnier .....	44
1.1.2.4.8. Influence de l'âge de l'explant sur la callogenèse .....	45

1.1.2.4.9. Influence de la taille de l'explant sur la callogenèse chez le cotonnier.....	45
1.1.2.4.10. Influence de la position de l'explant sur la callogenèse chez le cotonnier.....	45
1.1.2.4.11. Influence des anti-oxydants sur la callogenèse.....	45
1.1.2.4.12. Étude du taux de prolifération (TProl) .....	45
1.1.2.4.13. Évaluation de la callogenèse.....	46
1.1.2.5. Analyses statistiques.....	47
1.2. INDUCTION D'EMBRYON CHEZ LE COTONNIER .....	48
1.2.1. Matériel végétal .....	48
1.2.2. Méthodes .....	48
1.2.2.1. Induction de cellules embryogènes.....	48
1.2.2.1.1. Influence de la source de carbone sur l'induction de cellules embryogènes.....	48
1.2.2.1.2. Influence de la concentration de la source de carbone .....	49
1.2.2.1.3. Influence du régime hormonal sur l'induction de structures embryogènes.....	49
1.2.2.1.4. Influence des acides aminés sur l'induction de cellules embryogènes.....	49
1.2.2.1.5. Effet comparative de l'influence de la composition du milieu de culture sur l'induction de cellules embryogènes .....	50
1.2.2.2. Observations microscopiques des cellules embryogènes .....	50
1.2.2.3. Étude de la viabilité des structures embryogènes .....	50
1.2.2.3.1. Coloration des cellules.....	50
1.2.2.3.2. Maturation et germination des embryons. ....	51
1.2.2.3.3. Évaluation de l'embryogenèse somatique .....	51
1.2.2.4. Analyses statistiques.....	51
2. ÉTUDE DE QUELQUES COMPOSÉS BIOCHIMIQUES INTERVENANT DANS LE PROCESSUS DE L'EMBRYOGENÈSE SOMATIQUE.....	53
2.1. Matériel et méthodes .....	53
2.1.1. Matériel végétal .....	53
2.1.2. Méthodes .....	53
2.1.2.1. Extraction et dosage des composés phénoliques .....	53

2.1.2.1.1. Étude des composés par Chromatographie Liquide Ultra Haute Performance (UHPLC) .....	54
2.1.2.2. Extraction et dosage des sucres totaux .....	56
2.1.2.3. Extraction et dosage des protéines.....	56
2.1.2.4. Extraction et purification des enzymes.....	57
2.1.2.4.1. Dosage des polyphénoloxydases .....	57
2.1.2.4.2. Dosage des peroxydases .....	57
2.1.2.4.3. Dosage de la phénylalanine ammonia-lyase et de la tyrosine ammonia-lyase.....	58
2.1.2.4.4. Dosage de l'ascorbate peroxydase et de la catalase .....	58
2.1.2.5. Analyses statistiques.....	59
3. MICROPROPAGATION CHEZ LE COTONNIER .....	60
3.1. Matériel et méthodes .....	60
3.1.1. Matériel végétal .....	60
3.1.2. Méthodes .....	60
3.1.2.1. Préparation des milieux de culture .....	60
3.1.2.1.1. Milieu de germination .....	60
3.1.2.1.2. Influence du benzylaminopurine (BAP) et de la Kinétine (KIN) sur l'induction de bourgeon .....	60
3.1.2.1.3. Influence de la gibbérelline (GA <sub>3</sub> ) sur l'élongation des pousses.....	61
3.1.2.1.4. Influence de trois auxines sur l'enracinement des pousses .....	61
3.1.2.2. Désinfection et obtention des bourgeons.....	61
3.1.2.3. Induction de bourgeons à partir des embryons immatures .....	63
3.1.2.4. Multiplication et élongation des plantules obtenues.....	63
3.1.2.5. Enracinement des pousses obtenues .....	64
3.1.2.6. Acclimatation des plants de cotonnier régénérés .....	64
3.1.2.6.1. Sevrage .....	64
3.1.2.6.2. Élevage .....	65
3.1.2.7. Analyses statistiques.....	65

TROISIÈME PARTIE : RÉSULTATS ET DISCUSSION.....	67
1. ÉVALUATION DE L'EMBRYOGENÈSE SOMATIQUE .....	68
1.1. RÉSULTATS.....	68
1.1.1. INDUCTION DE CALS CHEZ LE COTONNIER .....	68
1.1.1.1. Obtention des vitroplants et initiation des cals .....	68
1.1.1.2. Influence de la source de carbone sur la callogenèse les cotylédons de cotonnier..	69
1.1.1.3 Influence de la concentration du glucose sur l'induction des cals .....	70
1.1.1.4. Influence des auxines et de leur concentration sur la callogenèse des cotylédons de cotonniers.....	72
1.1.1.5. Influence des cytokinines sur la callogenèse des feuilles de cotonniers .....	73
1.1.1.6. Influence du régime hormonal sur l'induction des cals des cotylédons de cotonniers .....	74
1.1.1.7. Influence du type d'explants sur l'induction de cals chez le cotonnier.....	77
1.1.1.8. Influence de l'âge de l'explant sur l'induction et la prolifération des cals.....	78
1.1.1.9. Influence de la taille de l'explant sur la calculture .....	80
1.1.1.10. Influence de la position de l'explant sur l'induction des cals chez le cotonnier ...	81
1.1.1.11. Influence des anti-oxydants sur l'induction et le brunissement des cals .....	82
1.1.2. INDUCTION DE CELLULES EMBRYOGÈNES À PARTIR DE CALS DE COTONNIER .....	85
1.1.2.1. Influence de la source de carbone sur l'induction de cellules embryogènes.....	85
1.1.2.2. Influence des acides aminés sur l'induction de cellules embryogènes.....	86
1.1.2.3. Influence de la combinaison hormonale sur l'induction de cellules embryogènes .	87
1.1.2.4. Étude comparative des meilleurs milieux d'embryogenèse sur l'induction de structures embryogènes. ....	88
1.1.2.4. Évaluation de la maturation et de la germination des embryons .....	89
1.2. DISCUSSION.....	91
1.3. CONCLUSION PARTIELLE .....	101

2. ÉTUDE DE QUELQUES COMPOSÉS INTERVENANT AU COURS DE L'EMBRYOGENÈSE SOMATIQUE .....	102
2.1. RÉSULTATS.....	102
2.1.1. Influence du milieu de culture sur la teneur en composés biochimiques des cals....	102
2.1.2. Étude des différents composés impliqués dans le métabolisme phénoliques au cours de l'induction de cellules embryogènes.....	102
2.1.2.1. Analyse qualitative et identification des composés phénoliques.....	102
2.1.2.2. Activité de quelques protéines enzymatiques.....	104
2.1.5. Relation entre les composés phénoliques et les protéines enzymatiques .....	106
2.1.5.1. Matrice des valeurs propres .....	106
2.1.5.2. Relation entre les cals et les composés .....	107
2.3. CONCLUSION PARTIELLE .....	112
3. MICROPROPAGATION DU COTONNIER.....	113
3.1. RÉSULTATS.....	113
3.1.1. Effet de la BAP et de la KIN sur l'induction de pousses provenant des bourgeons terminaux des vitroplants de cotonnier.....	113
3.1.2. Effet de la BAP et de la KIN sur l'induction de pousses à partir des embryons immatures de cotonnier .....	115
3.1.3. Effet de la gibbérelline sur l'élongation de pousses de cotonnier .....	118
3.1.4. Effet des auxines sur l'enracinement des pousses provenant des embryons immature et des bourgeons terminaux de cotonnier .....	120
3.1.5. Acclimatation des vitroplants .....	122
3.1.5.1. Effet du type d'explant sur la pré-acclimatation des vitroplants .....	122
3.1.5.2. Effet du type d'explant sur l'acclimatation des vitroplants.....	122
3.2. DISCUSSION.....	125
3.3. CONCLUSION PARTIELLE .....	128
CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES .....	129
RÉFÉRENCES.....	133

ANNEXES .....	156
PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES.....	161

## DÉDICACES

À toi mon très cher père, **OUFFOUÉ N'guessan ; merci père pour tout,**

À ma très chère mère, **KOUASSI Adjo ; merci mère**

À mes frères aînés, **N'GUESSAN Kouadio Didier Serge et**

**OUFFOUÉ Kophy Guillaume Davy.**

À ma sœur, **OUFFOUÉ Anne-Marie.**

À mes frères cadets, **BROU Ouffoué et OUFFOUÉ Alain Junior.**

À mes neveux, **OUFFOUÉ Elase Yvan et OUFFOUÉ Mienssa Rayan.**

À mes nièces, **OUFFOUÉ Yasmine Miensah Ange Kenza, N'GUESSAN**

**N'da Mira Schekinaelle et OUFFOUÉ Aya Marie  
Shanelle Maïra.**

À mes enseignants.

À tous mes amis d'ici ou d'ailleurs.

Pour les moments d'angoisses, et de joies vécus ensemble.

## REMERCIEMENTS

Une thèse, tant nominative soit elle, est avant tout un travail de réflexion collective, d'une multitude de rencontres, de volontés encouragées et encourageantes. Ce document est le rapport d'un travail réalisé d'une part dans le Laboratoire de la Production Agricole (LPA) de l'Université Jean Lorougnon Guédé de Daloa et d'autre part dans l'unité de culture *in vitro* du Laboratoire de Biologie et Amélioration des Productions Végétales (LBAPV) de l'Université Nangui Abrogoua.

À cet effet, nous voudrions exprimer toute notre reconnaissance aux responsables de ces prestigieuses institutions. Nous adressons particulièrement, nos sincères remerciements à Madame **TIDOU Abiba Sanogo épouse KONE**, Professeur Titulaire et Présidente de l'Université Jean Lorougnon Guédé, pour avoir autorisé notre inscription en Thèse dans ladite Université.

Nous exprimons notre profonde reconnaissance au Vice-Président de l'Université Jean Lorougnon Guédé, Monsieur **AKAFFOU Doffou Sélastique**, Maître de conférences, Université Jean Lorougnon Guédé pour ses conseils et ses encouragements qui ont contribué à l'amélioration de la qualité de ce document.

Nous remercions le Directeur de l'UFR-Agroforesterie Madame **TONESSIA Dolou Charlotte**, Maître de conférences, Université Jean Lorougnon Guédé pour nous avoir permis d'effectuer ce stage dans les meilleures conditions. Nous tenons à vous remercier pour l'intérêt que vous portez à ce travail, en acceptant de le juger. Vos critiques et appréciations ne pourront qu'enrichir ce travail.

Nous exprimons notre reconnaissance à Monsieur **AYOLIÉ Koutoua**, Maître de conférences et Directeur du Laboratoire de Production Agricole (LPA) de l'Université Jean Lorougnon Guédé de Daloa pour avoir conduit nos premiers pas dans la recherche ; nous lui témoignons notre profonde gratitude pour son soutien, mais surtout pour le rôle de père qu'il a joué dans la conception de ce travail.

Nous adressons nos remerciements à Madame **DOGBO Odette**, Professeur Titulaire, Université Nangui Abrogoua et responsable du LBAPV, pour nous avoir permis d'effectuer ces travaux dans les meilleures conditions.

Nous remercions Monsieur **KOUADIO Yatty Justin**, Professeur Titulaire, Université Jean Lorougnon Guédé qui a accepté d'assurer la co-direction de ce travail malgré ses nombreuses occupations. Qu'il reçoive ici notre gratitude pour sa disponibilité, ses critiques et suggestions pertinentes qui ont, efficacement, contribué à l'aboutissement de ce travail.

Nous exprimons notre plus profonde reconnaissance et notre gratitude à Monsieur **KOUAKOU Tanoh Hilaire**, Professeur Titulaire, Université Nangui Abrogoua pour avoir accordé une attention particulière à ce travail et pour avoir aussi accepté la co-direction de cette thèse. Professeur vous avez été, pour nous une source de motivation, de courage, d'ambition et bien souvent de surpassement. Votre disponibilité, votre rigueur scientifique, votre ardeur au travail et surtout la confiance que vous avez placée en nous, ont contribué efficacement à mener ce travail à terme et dans de bonnes conditions. Nous avons été sensibles à l'accueil chaleureux et aux nombreux conseils que vous nous avez prodigués lors de la réalisation de ce projet de Thèse. Nous n'oublierons jamais tout ce que nous avons reçu de vous. Nous vous disons infiniment merci.

Nous associons à ces remerciements Monsieur **DONGUI Bini Kouamé**, Professeur titulaire, Université Jean Lorougnon Guédé (UJLOG), qui malgré son emploi du temps très chargé, a bien voulu accepter d'évaluer ce travail. Par ces critiques, remarques, suggestions et recommandations, il a contribué à l'amélioration de ce document en tant que président du jury, merci Professeur.

Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude et nos sincères remerciements à Monsieur **BOYE Mambé Auguste-Denise**, Maître de conférences, Université Jean Lorougnon Guédé (UJLOG), qui en tant que rapporteur a contribué à l'amélioration de ce document, Merci infiniment Docteur.

Merci à Monsieur **BROU Yao Casimir**, Maître de Conférences, Institut National Polytechnique Félix Houphouet-Boigny (INP-HP) de Yamoussoukro d'avoir accepté de juger ce travail malgré vos obligations. Par vos critiques, remarques, suggestions et recommandations, vous avez contribué à l'amélioration de ce travail, Merci Docteur.

Nos remerciements vont aussi à l'endroit de tous les enseignants du LBAPV, en particulier aux **Professeur KONE Mongomaké**, **Docteur KONE Tchoa**, **Docteur BOUGNONKPÉ Jean-Pierre**, **Docteur KOUAKOU Kouassi Joseph**, **Docteur KOUAKOU Kouakou Laurent**, **Docteur YAO Koffi Bertin** et **Docteur DEDI Juliette**

pour leur sincère collaboration, leur disponibilité, les critiques, leur assistance technique et leur conseils constructives lors de la correction de ce document.

Nous voudrions très sincèrement exprimer notre reconnaissance à Monsieur **YAO Kouakou Konan François**, Maître Assistant, Université Jean Lorougnon Guédé auprès de qui nous avons fait nos premiers pas en culture *in vitro* et dont les conseils nous ont été d'un apport très précieux dans la conception de ce document.

Nous tenons à remercier Monsieur **SORO Dognimeton**, Maître de conférences, Université Jean Lorougnon Guédé pour sa sympathie, sa disponibilité et ses conseils avisés en vue de l'amélioration de ce document, merci infiniment Docteur.

Nous exprimons notre reconnaissance à Madame **TRAORE Karidia**, Maître de conférences, Université Jean Lorougnon Guédé pour ses conseils et ses critiques constructives.

Nous voudrions particulièrement exprimer notre reconnaissance à Monsieur **KOUADIO Oi Kouadio Samuel**, Assistant, à l'Université Peleforo Gon Coulibaly pour sa disponibilité et son assistance technique lors de l'analyse biométrique des résultats, merci infiniment Docteur.

Nous remercions aussi les **Docteurs YAPO Sopie Edwige Salomé, ABEDA Zagadou, N'GORAN Regina épouse BLA, SOUMAHORO André, NAOUNOU Amedée, N'CHO Assi Laurent, MOUSSA-LABE Patricia épouse DOUMBIA, N'GORAN Kouakou Désiré, COULIBALY Soulemane, DJAHA Konan Engueran, KONE Dramane, GBOGBEU Françoise, KIMOU Serge** pour les conseils, les critiques et les encouragements lors de la rédaction de ce document.

Nous remercions tous les doctorants **KANGA Ahou Nadia, NANTI Bi Innocent, KOFFI Jean-Baptiste, KAMBOU Diulyalè, ELOUAFLIN Yves Andre, GBEHE Stéphane, KOUAKOU Camille, DAO Patrice** et tous les étudiants du LBAPV pour leurs aides, leurs conseils et leur fraternité durant tous les travaux.

À nos parents qui nous ont soutenus sans relâche, et à tous ceux qui de près ou de loin, ont contribué par leurs conseils, leurs encouragements et leurs prières, à l'aboutissement de ce travail, je voudrais vous traduire ma reconnaissance filiale et amicale.

## **LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS**

**2,4-D** : Acide 2,4-dichlorophenoxyacétique

**ACP** : Analyse en composantes principales

**ADHA** : Dedhydroxyascorbique

**AIA** : Acide indole-3-acétique

**AIB** : Acide indole-3-butyrique

**ANA** : Acide 1-naphthalène acétique

**ANOVA**: Analysis Of Variance

**AscPx**: Ascorbate Peroxydase

**BAP**: 6-Benzylaminopurine

**Cat** : Catalase

**CCIA** : Centre du Commerce International d'Abidjan

**CCI** : Centre du Commerce International

**CCIC** : Comité Consultatif International de Coton

**CE** : Cal Embryogène

**CI** : Côte d'Ivoire

**CNE** : Cal Non Embryogène

**CIRAD** : Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement

**CLHP** : Chromatographique Liquide Haute Performance

**CNRA** : Centre National de Recherche Agronomique

**CNUCED** : Conférence des Nations unies sur le commerce et le développement

**CPED** : Cellules pré-embryogènes déterminées

**CPEI** : Cellules pré-embryogènes indéterminées

**EDTA** : Ethylène diaminotétra-acétique

**FAO** : Food and Agriculture Organization (Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture)

**FAOSTAT** : The Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Data base (La base de données statistique de l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture)

**GA3** : Acide-3-gibbérellique

**GPx** : Gaïacal Peroxydase

**INRA** : Institut National de Recherche Agronomique

**KIN** : kinétine

**KNO<sub>3</sub>** : Nitrate de Potassium

**LBAPV** : Laboratoire de Biologie et Amélioration des Productions Végétales

**LPA** : Laboratoire de la Production Agricole

**MEP** : Milieu d'élongation des pousses

**MEnP** : Milieu d'enracinement des pousses

**MIB** : Milieu d'induction de bourgeon

**MIE** : Milieu d'induction d'embryons somatiques

**MINAGRI** : Ministère de l'Agriculture de Côte d'Ivoire

**MMC** : Meilleur Milieu de Callogenèse

**MS** : Murashige et Skoog

**MSB5** : Milieu de base MS contenant de la vitamine B5

**NCV** : Nombre de Cellule Viable

**NCNV** : Nombre de Cellule Non Viable

**NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>** : Nitrate d'Ammonium

**PAL**: Phénylalanine ammonia-lyase

**PEG**: Polyéthylène glycol

**POD**: Peroxydases

**PPO**: Polyphénol oxydase

**PF** : Poids de matière fraîche

**PIB** : Produit Intérieur Brut

**PS** : Poids de matière sèche

**PVP** : Polyvinylpyrrolidone

**TAL** : Tyrosine ammonia-lyase

**TDZ** : Thydiazuron

**TI** : Taux d'Induction de cals

**TICE** : Taux d'Induction de Cellule Embryogène

**TProl** ; Taux de Prolifération

**TS** : Taux de survie

**UHPLC** : Chromatographie Liquide Ultra Haute Performance

## LISTES DES TABLEAUX

Tableau I. Composition du milieu de base MS (Murashige et Skoog, 1962) .....	25
Tableau II. Compositions vitaminiques B5 (Gamborg, 1965) additionnés aux milieux de cultures .....	26
Tableau III. Milieu d'induction de bourgeons .....	60
Tableau IV. Influence de la source de carbone sur la callogenèse des cotylédons de cotonnier .....	70
Tableau V. Influence de la concentration de glucose sur la callogenèse des cotylédons de cotonnier.....	71
Tableau VI. Effet des auxines sur la callogenèse des cotylédons de cotonnier .....	73
Tableau VII. Effet des cytokinines et de leur concentration sur la callogenèse des cotylédons de cotonniers .....	74
Tableau VIII. Effet des cytokinine en présence de 0,1 mg.L-1 de 2,4-D sur l'induction des cals.....	76
Tableau IX. Effet du type d'explants sur la callogenèse chez le cotonnier.....	78
Tableau X. Influence de l'âge de l'explant sur l'induction et la prolifération des cals.....	79
Tableau XI. Influence de la taille de l'explant sur l'induction des cals .....	81
Tableau XII. Influence de la position de l'explant sur la callogenèse chez le cotonnier .....	82
Tableau XIII. Effet des anti-oxydants sur l'induction et le brunissement des cals.....	83
Tableau XIV. Évaluation de l'effet de la source de carbone sur l'induction de cellules embryogènes.....	85
Tableau XV. Évaluation de l'effet de la concentration du glucose sur l'induction de cellules embryogènes.....	86
Tableau XVI. Influence des acides aminés sur l'induction de cellules embryogènes chez le cotonnier.....	87
Tableau XVII. Effet de la combinaison hormonal sur l'induction de cellules embryogènes ..	88
Tableau XVIII. Étude comparative de l'influence des meilleurs milieux d'induction de structures embryogènes .....	89
Tableau XIX. Teneur en composés biochimiques des cals embryogènes et non embryogènes .....	102
Tableau XX. Matrice des valeurs propres des composés étudiés .....	107
Tableau XXI. Influence de la BAP et de la KIN sur l'induction de pousses des bourgeons terminaux après quatre semaines de culture.....	114

Tableau XXII. Effet de la BAP et de la KIN sur l'induction de pousses des embryons immatures de cotonnier .....	117
Tableau XXIII. Influence de la gibbérelline (GA3) sur l'élongation des pousses obtenues..	120
Tableau XXIV. Influence des auxines sur l'enracinement des pousses.....	121
Tableau XXV. Taux de survie des vitroplants de cotonnier préacclimatés .....	122
Tableau XXVI. Effet de l'explant sur l'acclimatation des vitroplants obtenus .....	123

## LISTES DES FIGURES

Figure 1. Floraison et fructification du cotonnier .....	11
Figure 2. Différents stades évolutifs des embryons somatique .....	24
Figure 3. Influence de l'équilibre entre les auxines et les cytokinines sur l'organogenèse .....	27
Figure 4. Carte administrative du district d'Abidjan situant le site expérimental de l'Université Nangui Abrogoua .....	39
Figure 5. Graines de cotonnier .....	40
Figure 6. Étapes de la germination <i>in vitro</i> des graines de cotonnier .....	42
Figure 7. Procédé de culture des cotylédons de cotonnier sur milieu de callogenèse .....	43
Figure 8. Graines et embryons de cotonnier.....	62
Figure 9. Obtention et mise en culture de bourgeons terminaux de vitroplants de cotonnier..	62
Figure 10. Mise en culture des embryons immatures sur milieu d'induction de bourgeon .....	63
Figure 11. Initiation de cal à partir d'explants de vitroplant âgé de sept jours .....	68
Figure 12. Cals issus de cotylédons de cotonnier sur milieu supplémenté de quatre sources de carbone après la troisième subculture. ....	70
Figure 13. Cals induits à partir de différentes concentrations de glucose.....	72
Figure 14. Effet des cytokinines en présence de 0,1 mg L <sup>-1</sup> 2,4-D sur l'induction des cals ...	77
Figure 15. Induction de cals à partir des explants de cotonnier .....	78
Figure 16. Cals de cotonniers obtenus à partir d'explants d'âge différents après la troisième subculture .....	80
Figure 17. Cals de cotonnier induit sur milieu MSB5 supplémenté des anti-oxydants .....	84
Figure 18. Embryon de cotonnier induit sur différents milieux.....	89
Figure 19. Stades d'évolution des embryons somatiques sur le milieu de maturation .....	90
Figure 20. Chromatogrammes UHPLC des composés phénoliques des cals de cultivar de cotonnier Y331B-R5 détectés à 280 nm .....	104
Figure 21. Activité enzymatique des cals embryogènes et non embryogènes .....	105
Figure 22. Répartition des variables de la teneur en composés biochimiques en fonction des taux d'induction de cellules embryogènes et non embryogènes dans le plan 1-2 d'une ACP108	
Figure 23. Phases d'induction de pousses à partir de bourgeons terminaux de cotonnier en présence de la BAP et de la KIN .....	115
Figure 24. Étapes d'induction de bourgeon à partir d'embryons immatures de cotonnier ....	118
Figure 25. Phases de multiplication et d'élongation des pousses de cotonnier.....	119
Figure 26. Vitroplant de cotonnier enraciné après quatre semaines de culture.....	121

Figure 27. Vitroplant de cotonnier après 2 mois et demi d'acclimatation ..... 124

# **INTRODUCTION GÉNÉRALE**

Le cotonnier est une plante tropicale appartenant au genre *Gossypium* et comprend environ 50 espèces dont quatre seulement sont cultivées (Pathi & Tuteja, 2013). *Gossypium hirsutum* est actuellement l'espèce la plus cultivée et fournit près de 95 % de la production mondiale de coton (Kouakou *et al.*, 2008). La culture du cotonnier occupe environ 2,5 % des terres arables du monde, soit un peu plus de 34 millions d'hectares (Berti *et al.*, 2006). La plante exige pour son développement des températures élevées et constantes, des pluies modérées, espacées et une sécheresse absolue au moment de la cueillette (Konan, 2015 ; Bachelier, 2016). Le cotonnier est cultivé pour ses fibres qui constituent la principale matière première en industrie textile. Les graines renferment 18 à 20 % d'huile et le tourteau contient 40 % de protéines qui pourraient satisfaire 5 à 6 % des besoins mondiaux en protéines (Berti *et al.*, 2006 ; Sekloka *et al.*, 2016).

La Chine, l'Inde, les États Unis d'Amérique et le Pakistan sont les plus grands producteurs avec plus de 80 % de la production mondiale (Hilario, 2019). Les pays africains contribuent à 8 % de la production mondiale (Kouakou *et al.*, 2014). La production de coton-graine de la Côte d'Ivoire est passée de 412 646 tonnes, lors de la campagne 2017-2018 à 458 762 tonnes en 2018-2019, plaçant ainsi le pays au troisième rang des producteurs Africains au sud du Sahara, après le Mali et le Benin (Dia, 2019). Le coton revêt ainsi une importance économique et sociale considérable pour la Côte d'Ivoire où il représente le quatrième produit d'exportation après le cacao, le café et la noix de cajou (FAO, 2018). En effet, il fait non seulement vivre une partie substantielle de la population du Nord et du Centre qui sont les zones de culture mais constitue une source importante de rentrées de devises (N'cho, 2008).

Le coton couvre un peu plus de 50 % de la consommation mondiale de fibres textiles. Cette place prédominante du coton est menacée par le développement des fibres synthétiques (30 %) et des fibres animales (19 %) (Berti *et al.*, 2006; CIRAD, 2012). De plus, la production et la qualité des fibres du cotonnier sont négativement impactées par des ravageurs, les parasites et des maladies diverses (Vaissayre, 1994). En effet, un parasitisme mal contrôlé peut provoquer jusqu'à 50 % de perte de production et entraîner parfois la destruction quasi-totale du potentiel de production (Sayegh, 2009 ; CIRAD, 2019).

Face à ces contraintes, des méthodes d'amélioration conventionnelle telles que l'hybridation interspécifique qui permet l'introduction de nouveaux caractères agronomiques savèrent être une technique pour l'amélioration de la plante (Demol *et al.*, 1992).

Cependant, celles-ci sont difficile à réaliser à cause des barrières dues aux niveaux de ploïdie, mais surtout à cause du temps long (environ une dizaine d'année) pour obtenir une variété améliorée (Magniez, 2007; Haouala *et al.*, 2010). Ainsi, la biotechnologie qui couvre de nombreux domaines allant des concepts de culture de tissus (culture *in vitro*) au génie génétique s'avère être une technique pour l'amélioration variétale du cotonnier (Kouakou, 2009 ; Kodjo *et al.*, 2014). En effet, la culture *in vitro* est un moyen efficace pour l'obtention d'une grande quantité de plants homogènes et performants de manière rapide. Elle permet d'assurer l'amélioration génétique et la sélection des géotypes ayant de bonnes valeurs agronomiques. Les avantages de cette technologie ne se limitent pas au seul coefficient de rapidité de la multiplication, en effet les plantes auto-enracinées *in vitro* se sont avérées plus vigoureuses et plus résistantes aux maladies (Kouadio, 2018). Deux techniques de propagation *in vitro* sont actuellement les plus utilisées. Il s'agit de l'embryogenèse somatique qui utilise la totipotence, caractéristique des cellules végétales pour l'obtention d'embryons et la micropropagation ou organogenèse qui repose sur la capacité de bourgeonnement des explants (Yapo, 2013; Khatoon *et al.*, 2014; Rainville & Tremblay, 2014; Kouadio, 2018).

Le cotonnier se prête difficilement aux manipulations dans les systèmes de culture de tissus. Cela est dû en partie à la libération des polyphénols observés fréquemment chez les espèces ligneuses et surtout à la dépendance génotypique qui constitue un sérieux handicap pour la culture des tissus de cotonnier. (Ganesan & Jayabalan, 2004). La plupart des travaux réalisés montrent que seul le cultivar Coker se prête aux vitrocultures chez le cotonnier (Koné, 2003 ; Cao *et al.*, 2008). Toutefois, des travaux ont révélé la présence d'un certain potentiel embryogène chez d'autres cultivars de cotonnier (Zhang *et al.*, 2001 ; Kouadio *et al.*, 2004; Kouakou, 2009). De plus, l'embryogenèse somatique d'après Kouakou (2003) est tributaire des modifications biochimiques endogènes. L'embryogenèse somatique est donc un processus important dans la propagation des plantes. Elle consiste à induire de nombreuses divisions cellulaires à partir des tissus mis en culture. Ces cellules génèrent alors des embryons au cours des divisions ou dans les cals, c'est-à-dire un amas de cellules indifférenciées par le grâce totipotence des cellules végétales. Sous certaines conditions, les cultures cellulaires s'organisent ensuite en de nombreux petits massifs à structure bipolaire (avec un méristème de racines et un méristème de tiges) nommés embryons somatiques (Ganesan & Jayabalan, 2004). Comme les embryons zygotiques présents dans les graines, les embryons somatiques obtenus à partir de cellules non sexuées (sans fécondation) peuvent se développer en un nombre illimité de plantes conformes à la plante mère (Trolinder & Goodin, 1988 ; Firoozabady & Deboer, 1993).

De plus, les embryons somatiques obtenus offrent des possibilités de manipulations génétiques qui aboutissent à l'obtention de variétés améliorées (Murphy *et al.*, 2008; Gautier, 2017). L'embryogenèse somatique est donc une voie possible pour obtenir du matériel végétal sain, homogène et à haut rendement. L'obtention d'embryons somatiques peut se faire selon deux modes : le mode direct et indirect (callogenèse). Lorsque l'embryogenèse est de type direct, la cellule somatique subit une dédifférenciation puis une redifférenciation au sein du même tissu dont elle est issue. En revanche, l'embryogenèse de type indirect passe par un état de cal formant une masse de cellules à caractère indifférencié dont certaines vont donner des embryons (Benabdelhafid, 2015; Gautier, 2017). Ainsi, le cal est un matériel de choix pour les vitrométhodes. Toutefois, l'aptitude à la callogenèse et l'acquisition des compétences embryogènes sont sous la dépendance de plusieurs facteurs (Rhimi *et al.*, 2006; Kouakou, 2009; Yapo, 2011; Kouadio, 2018). De plus, les cals embryogènes formés sont particulièrement fragiles et ont une survie qui varie beaucoup suivant le génotype. La régénération des plantes *via* l'embryogenèse somatique, bien que permettant une "rejuvenilisation" et une multiplication en masse rapide et importante, est soumise à beaucoup de contraintes qu'il faut lever afin d'optimiser cette voie de propagation *in vitro*. Cela présente donc l'inconvénient de nécessiter beaucoup de temps pour atteindre son objectif comme l'ont rapporté Krishna & Narendra (2013). Une autre alternative de régénération efficace, rapide et indépendante du génotype est la micropropagation qui permet la formation de vitroplants et dans lequel le risque d'obtention de copies de plants non conformes est très faible (Koné, 2003; Cao *et al.*, 2008; Hamad & Taha, 2009; Yapo, 2013; Khatoon *et al.*, 2014; Kouadio, 2018). Cette méthode facilite l'application de la culture de tissus végétaux et du génie génétique, mais elle est aussi influencée par le type d'explant, les conditions du milieu de culture. Cette étude qui entre dans la politique de l'intensification des systèmes agricoles pour une meilleure création de richesses pour la population rurale, recherchera les facteurs limitants la propagation *in vitro* du cotonnier, afin de lever les contraintes pour la réussite de l'embryogenèse somatique indirecte et l'organogenèse chez le cotonnier. Elle a pour objectif principal de régénérer *in vitro* le cotonnier afin de contourner les barrières d'incompatibilités génétiques et obtenir du matériel végétal sain. De façon spécifique, il s'est agi :

- d'établir un protocole efficace de régénération du cotonnier par embryogenèse somatique indirecte;
- d'étudier l'effet de quelques métabolites qui influencent l'embryogenèse somatique et la callogenèse chez le cotonnier,
- d'induire des pousses par la micropropagation,

- d'évaluer la capacité de survie des vitroplants issus des embryons immatures et des bourgeons terminaux

Pour atteindre ces objectifs, les hypothèses suivantes ont été formulées:

- la callogenèse et l'embryogenèse somatique pourraient être influencées par la composition du milieu et le type d'explant;
- les embryons somatiques pourraient être induits à partir des cals friables;
- il existerait certains composés biochimiques qui limiteraient l'induction des embryons somatiques;
- la micropropagation pourrait constituer une voie de régénération des variétés récalcitrantes de cotonnier

Le présent document comporte trois parties. Après l'introduction, la première partie, consacrée aux généralités, est scindée en trois sous-parties. Dans le premier chapitre, nous présentons les données relatives à la biologie et à l'importance socio-économique du cotonnier. Le deuxième chapitre relève les généralités sur la culture *in vitro* en général et celle du cotonnier en particulier. Le troisième chapitre traite des composés biochimiques impliqués dans l'embryogenèse somatique.

Dans la seconde partie, le matériel et les méthodes utilisés pour atteindre les objectifs ont été abordés. Cette partie est scindée en trois chapitres. Dans le premier chapitre, les conditions d'une bonne callogenèse et de l'induction de cellules embryogènes ont été recherchées. Puis, les composés biochimiques intervenant dans l'embryogenèse ont été dosés dans le deuxième chapitre. Dans le chapitre trois qui aborde de la micropropagation du cotonnier, nous recherchons d'abord le type d'hormones adaptées à l'induction de pousses chez le cotonnier puis, les conditions d'une bonne acclimatation.

Enfin dans la dernière partie, nous présentons les résultats qui sont discutés ; une conclusion générale et des perspectives. Nous terminons ce travail par le recueil des références bibliographiques.

# **PREMIÈRE PARTIE : GÉNÉRALITÉS**

# 1. COTONNIER ET SON ENVIRONNEMENT : BIOLOGIE ET IMPORTANCE

## 1.1. Origine et histoire

L'origine et l'utilisation du coton semble remonter à 4 500 ans av. J.-C. En effet, dans une tombe néolithique à Mehrgarh, au Pakistan, des archéologues ont découvert un fil de coton préservé au sein d'une perle de cuivre. Des études de Vianney (2017) ont révélé que des filets à base de fils de coton ont été découverts au Pérou sur le site archéologique de Caral et datent d'environ 2 500 av. Mille ans plus tard, le Grec Hérodote, parlant du coton indien, affirme que : « Là-bas, il y a des arbres qui poussent à l'état sauvage, dont le fruit est une laine bien plus belle et douce que celle des moutons. Les Indiens en font des vêtements ». C'est en voyant les habitants des îles Barbades porter des vêtements en coton que Christophe Colomb fut convaincu qu'il avait bien atteint les côtes indiennes. Car, comme l'atteste N'goran (2016) le coton était à l'époque associé à l'Inde au même titre que les épices. Dès le VII<sup>e</sup> siècle, les conquêtes arabes diffusent l'usage du coton en Afrique du Nord et en Europe. L'ouverture de la route des Indes par Vasco de Gama, en 1497, donne un nouvel essor au commerce du coton entre l'Europe et l'Inde.

En Côte d'Ivoire, depuis 1923, les populations du nord et du centre utilisent le cotonnier comme culture secondaire et emploient le coton pour leurs activités de filage et de tissage. À partir de 1963, la Côte d'Ivoire confie l'encadrement et la vente du coton à la Compagnie Française pour le Développement des Fibres Textiles (CFDT). Dès 1973, l'État ivoirien crée la Compagnie Ivoirienne pour le Développement des Textiles (CIDT) et dont la CFDT est actionnaire et conserve un rôle d'assistant technique (Konan, 2015).

## 1.2. Taxonomie

Selon la définition de la (Centre du Commerce International) CCI (2010), le cotonnier est une plante dicotylédone dialypétale de l'ordre des Malvales, de la famille des Malvaceae et de la tribu des Hibisceae. Il appartient au genre *Gossypium* qui compte plus de 50 espèces dont seulement quatre caractérisées par la présence sur les graines des poils cellulosiques sont cultivées. Les espèces diploïdes sont représentées par *G. herbaceum* L. et *G. arboreum* L. (elles possèdent  $2n = 2x = 26$  chromosomes) et les tétraploïdes par *Gossypium hirsutum* L. et *G. barbadense* L. (soit  $2n = 4x = 52$  chromosomes). Les espèces diploïdes sont peu productives et donnent un coton à fibres courtes, épaisses et peu résistantes. Aujourd'hui, deux de ces espèces originaires d'Amérique constituent l'essentiel du coton dans le monde :

- *Gossypium hirsutum*, qui vient du Mexique, fournit des fibres intermédiaires et représente 95 % de la production mondiale,
- *Gossypium barbadense*, qui vient des îles Barbades, donne les fibres longues et fines dit coton « égyptien », et assure 5 % de la production mondiale selon Bagayoko, (2013). N'goran (2016) atteste qu'en Afrique subsaharienne, *Gossypium hirsutum* est actuellement la seule espèce cultivée depuis la quasi disparition de *Gossypium barbadense*.

La nomenclature de *Gossypium hirsutum* L. proposée par Cronquist (1981) se présente comme suit :

Règne	: Plantae
Sous-règne	: Tracheobionta
Division	: Magnoliophyta
Classe	: Magnoliopsida
Sous-classe	: Dilleniidae
Ordre	: Malvales
Famille	: Malvaceae
Genre	: <i>Gossypium</i>
Espèce	: <i>Gossypium hirsutum</i> L.

### 1.3. Exigences écologiques

#### 1.3.1. Besoins en chaleur

Le cotonnier est une plante originaire des pays chauds. Il préfère les régions à climat sec et à longs cycles végétatifs, avec une température élevée (autour de 30 °C). La température minimum en début de germination se situe entre 12 et 13 °C pour l'espèce *G. Barbadense* et 14 à 15 °C pour *G. hirsutum*. En dessous de 4 °C la plante dépérit. L'ensoleillement est très important pour le cotonnier, surtout en phase de fructification. Sa culture nécessite une saison sèche en phase terminale bien marquée, indispensable à une bonne ouverture des capsules et à la récolte (Konan, 2015). En Côte d'Ivoire, le Nord, le Centre et l'Est possèdent des conditions pédoclimatiques favorables à la culture du cotonnier.

#### 1.3.2. Besoin en eau

La culture du cotonnier nécessite une pluviométrie minimale de 600 mm bien répartie sur tout le cycle. Les phases les plus sensibles se situent au stade plantule (les plants sont

fragiles) et à la floraison au cours de laquelle le stress hydrique provoque des désordres physiologiques aboutissant à la chute des fleurs appelée “shedding”. L’excès d’eau entraîne également une baisse de rendement (perte de capsules) (FAO, 2014). Environ 60 % de la production mondiale est obtenue en conditions pluviales. Les régions ayant une pluviosité irrégulière ou faible, avec moins de 700 mm d’eau par an comme (une partie des États-Unis, l’Égypte, le Proche et le Moyen-Orient...) nécessitent le recours à l’irrigation (Bachelier, 2016).

### 1.3.3. Le type de sols

Le sol est non seulement le support de la plante mais aussi, le réservoir dans lequel elle puise sa nourriture. Un bon sol pour la culture cotonnière doit être profond, de type argilo-sableux ou sablo- argileux, riche en matière organique, bien travaillé pour être aéré et perméable à l'eau et aux racines. Ces sols doivent en outre être riches en éléments minéraux majeurs (Azote (N), Potassium (K), Phosphore (P)) ; secondaires, et oligoéléments (Calcium (Ca), Magnésium (Mg), Soufre (S), Fer (Fe), Bore (B), Cuivre (Cu), Zinc (Zn) etc.). Le pH optimum se situe entre 6,0 et 7,0 (Fok, 2016). Le cotonnier est très sensible à la toxicité d'aluminium et de manganèse. Pour assurer une bonne production, l'application d'un amendement calcaire est indispensable dès que le pH est inférieur à 5,0 (Constable, 2015).

### 1.4. Morphologie

Selon Bachelier (2016), le cotonnier a la plus complexe morphologie parmi les plantes cultivées annuellement à cause du caractère indéterminé de sa croissance. Cette morphologie est caractérisée par un polymorphisme marqué non seulement entre les différentes espèces, mais aussi à l'intérieur d'une même espèce sous l'influence des facteurs climatiques (Bagayoko, 2013). Petit arbuste atteignant le plus souvent 1 à 1,5 m de haut, parfois plus, le cotonnier présente une partie souterraine et une partie aérienne. La partie souterraine comprend une racine pivotante pourvue de nombreuses ramifications latérales. Les études réalisées par la FAO (2014) montrent que ces ramifications permettent la fixation de la plante au sol et assurent la plus grande partie de son alimentation. La partie aérienne est constituée d’une tige principale érigée et sert de support au reste de la plante. De cette tige, partent deux types des branches qui sont : les branches fructifères et les branches végétatives.

**Les branches végétatives** se développent à partir des nœuds situés au-dessus du nœud cotylédonaire et varient suivant les cultivars (Sekloka *et al.*, 2016). Elles présentent une croissance continue comme l'axe principal avec des ramifications secondaires qui peuvent

développer des fruits. À la différence des branches fructifères, les branches végétatives ne portent pas directement les fruits mais donnent des ramifications secondaires qui peuvent produire des fruits (Boquet & Moser, 2003 ; Davidonis *et al.*, 2004).

**Les branches fructifères** se développent à partir de tous les nœuds du tronc principal situés au-dessus des branches végétatives ; chez la plupart des variétés de *G. hirsutum*, elles apparaissent entre le cinquième et huitième nœud à partir des cotylédons (Sekloka *et al.*, 2016), sur la tige principale, ou dès le premier nœud sur les branches végétatives. Le nombre et la longueur des branches fructifères peuvent être variables suivant les conditions d'environnement ou le génotype de la variété utilisée (Hougni *et al.*, 2014)..

**Les feuilles** du cotonnier sont lobées et à nervation palmée. Elles sont polymorphes sur un même plant et présentent des caractères liés à l'espèce, voire au cultivar. Elles se développent sur les nœuds de la tige et des branches. À leur aisselle, les bourgeons donnent naissance soit à une branche, soit à une fleur sur la branche fructifère.

**Les fleurs** sont blanches/jaunes à leur ouverture, puis passent au rose dès le lendemain. Elles possèdent un calice à cinq sépales verts et soudés et une corolle à cinq pétales libres et bien développés (Kouakou, 2009).

**Les fruits** sont des capsules qui s'ouvrent à maturité et laissent apparaître des fibres qui recouvrent des graines et forment une petite boule blanche : le coton (Figure 1). Ces fibres peuvent mesurer 2 à 3 cm de long, pour *Gossypium hirsutum*, et jusqu'à 5 cm pour *Gossypium barbadense* (Mosiniak, 2015).

**Les graines** sont recouvertes de longs poils unicellulaires d'aspect soyeux qui commencent à pousser dès la fécondation et constituent les fibres de coton formées de cellulose quasiment pure. Ces fibres sont utilisées pour la fabrication de coton hydrophile, de fil ou d'étoffe (Mosiniak, 2015). La Figure 1 montre les différentes étapes de la fructification du cotonnier.

Le cotonnier renferme deux sortes de glandes, notamment les glandes internes et les glandes externes. Les glandes internes ou glandes à gossypol se trouvent dans toutes les espèces du cotonnier et sont réparties dans la plante entière (ainsi que dans l'amande des graines) à l'exception de la racine. Ces glandes secrètent un composé toxique appelé gossypol. Les glandes externes ou glandes nectaires sont présentes à l'intérieur et à l'extérieur

de la fleur, ainsi que dans les nervures des feuilles. Le nectar secrété, attire certains insectes (Hougni *et al.*, 2014).



**Figure 1. Floraison et fructification du cotonnier**

Source (AFD, 2018) ; A : bouton floral ; B : fleur épanouie ; C : fleur fécondée ; D : jeune capsule ; E : capsule déhiscente ; F : ouverture des capsules à maturité avec fibre de coton.

### 1.5. Physiologie

La physiologie du cotonnier répond dans sa généralité à celle de nombreuses dicotylédones avec cependant quelques particularités originales. Le cotonnier est une plante vivace, mais il est cultivé comme une culture annuelle. Les variétés cultivées ont ainsi conservé de leurs ancêtres sauvages la possibilité de refleurir après leur premier cycle de fructification. Elles ont une croissance de type indéterminé et on rencontre sur la même plante des boutons floraux, des fleurs et des capsules à tous les âges de développement (Konan,

2015). La fleur est hermaphrodite et le mode de reproduction est préférentiellement autogame mais avec des taux d'allogamie pouvant atteindre 30 % dans certaines localités en fonction de la densité des insectes pollinisateurs (Lawson, 2008). La floraison chez le cotonnier progresse du bas vers le haut et de l'intérieur vers l'extérieur de la plante (Nouatin *et al.*, 2014). Le cotonnier produit deux à trois fois plus de fleurs qu'il ne peut en conduire à maturité et transformer en capsules récoltables. À cause du caractère indéterminé de la plante, l'avortement d'une fleur pour des raisons physiologiques ou parasitaires ne se traduit pas forcément par une perte de rendement. Il est souvent compensé par le maintien d'un autre organe fructifère, qui aurait pu avorter (Moussa *et al.*, 2003).

En revanche, les études de Sekloka *et al.* (2016) montrent que lorsqu'une capsule est perdue, cette disparition n'est pas entièrement compensée par le développement de nouvelles capsules ou le grossissement de capsules existantes sur la même branche fructifère. Les chutes d'organes fructifères peuvent aussi engendrer un retard de maturité et éloigner le cotonnier de son potentiel de production si la longueur de la saison des pluies et la disponibilité en éléments nutritifs ne sont pas suffisantes (Tidjani & Akponikpè, 2012). Cette situation est courante dans les agricultures pluviales africaines. Ainsi, la recherche de variétés ou de conditions de culture favorisant une bonne rétention des capsules est en fait un objectif important en recherche cotonnière (Cretenet *et al.*, 2006).

## **1.6. Mode de croissance et développement**

Le cotonnier est une plante à croissance continue, cela signifie que les phases végétatives et fructifères ne sont pas séparées dans le temps, comme c'est le cas avec les céréales. La croissance végétative se poursuit pendant que les premiers boutons floraux apparaissent. La mise en place des fruits sur la plante chez le cotonnier, provoque un ralentissement progressif de la vigueur végétative (Sekloka *et al.*, 2016). Son cycle de développement, c'est-à-dire du semis à la récolte, varie de 166 jours à 205 jours selon les variétés, les zones agro écologiques et les dates de semis. Selon l'Organisation de Nations Unies pour de l'alimentation et l'agriculture (FAO), le développement de la plante se fait en cinq phases :

- la phase de la levée : cette phase part de la germination à l'étalement des cotylédons ; elle dure entre six et 10 jours après le semis ;
- la phase plantule : elle dure 20 à 25 jours et part de l'étalement des cotylédons au stade trois à quatre feuilles ;

- la phase de préfloraison : elle débute du stade trois à quatre feuilles au début de la floraison et dure entre 30 et 35 jours ;
- la phase de floraison : elle part du début de la floraison à l'arrêt de la croissance appelé "Cutout". Cette phase commence 80 à 100 jours après la levée. Normalement seul 1/3 des fleurs deviennent des capsules, et ce taux peut chuter jusqu'à 10 % lorsque les conditions sont défavorables, comme dans les cas de sécheresse, d'excès d'eau, de baisse de température, ou en cas d'infestation de ravageurs. La phase de la floraison dure 50 à 70 jours (FAO, 2014) ;
- la phase de la maturation des capsules : elle dure entre 50 et 80 jours.

Deux types variétaux de cotonnier ont été distingués :

- **les variétés à cycle déterminé**, dont la croissance s'arrête en fin de cycle. Ces variétés ont peu de branches végétatives, et sont de petites tailles avec de courtes branches fructifères et un cycle court.

- **les variétés à cycle indéterminé**, c'est le cas de la plupart des variétés africaines, dont la croissance végétative continue même après l'ouverture des capsules. Ce sont des cotonniers de grandes tailles avec de grandes branches végétatives, de longues branches fructifères et qui produisent beaucoup de fleurs. Ces variétés ont un cycle soit moyen soit long.

Ces termes couramment utilisés par les sélectionneurs sont en fait peu précis. Car, dans les deux cas, la plante est capable de redémarrer la croissance végétative en fin de saison, si les conditions hydriques et de température le permettent (Sekloka *et al.*, 2016).

## 1.7. Culture

Le cotonnier est cultivé sur tous les continents et sa culture se fait selon plusieurs techniques. Actuellement, le cotonnier est cultivé dans toutes les zones suffisamment chaudes du globe où les températures sont comprises entre 11 et 25 °C. Les limites extrêmes de son aire de culture s'étendent de la Bulgarie à l'Australie en passant par l'Ouzbékistan et la partie septentrionale de l'Argentine (Konan, 2015). En Amérique et en Ouzbékistan la plupart des cultures cotonnières se fait par irrigation. Les pays en développement, tels que ceux de l'Afrique de l'Ouest et du Centre qui connaissent souvent des aléas climatiques rudes pratiquent la culture pluviale.

En raison de ces conditions climatiques, le coton est cultivé depuis plus d'un siècle dans les zones de savane sahéliennes et soudaniennes d'Afrique de l'Ouest. La superficie cotonnière mondiale s'élevait à 31,1 millions d'hectare en 2016. Il est produit dans l'ensemble des zones subhumides et semi arides bénéficiant d'une pluviométrie annuelle comprise entre

500 à 700 mm et 1200 à 1500 mm (Bagayoko, 2013). En Côte d'Ivoire, la Compagnie Ivoirienne pour le Développement Textile (CIDT) conseille aux agriculteurs depuis 1985 de semer les graines de cotonnier au cours de la période allant de mai à juillet qui représente la saison des pluies. Pendant cette période, les semis sont réalisés, soit mécaniquement soit manuellement entre le 20 mai et le 30 juin dans le Nord ; entre le 1<sup>er</sup> juin et le 10 juillet dans le Centre-Ouest et enfin entre le 10 juin et le 20 juillet dans le Centre et l'Est du pays. La différence entre ces deux types de semis réside dans la quantité de semences utilisées. En effet, le semis mécanique utilise environ 20 kg de semences par hectare alors que dans le cas du semis manuel, 30 kg de semences sont utilisés par hectare (Konan, 2015).

### **1.7.1. Variétés de cotonnier**

Aujourd'hui, environ 50 espèces (45 espèces diploïdes et cinq espèces allotétraploïdes) sont dénombrées dans le genre *Gossypium* et de nouvelles espèces continuent d'être découvertes (Wendel & Cronn, 2003). Cependant, quatre variétés de cotonnier sont cultivées dans le monde (*Gossypium hirsutum*, *Gossypium barbadense*, *Gossypium arboreum* et *Gossypium herbaceum*). *Gossypium hirsutum* est la plus cultivée avec près de 95 % de la production mondiale.

En Côte d'Ivoire, deux variétés de cottonniers sont cultivées. Ce sont : les variétés classiques dont les tissus contiennent de petits sacs remplis d'une substance toxique appelée gossypol (Bulk-SR, ISA 205N, ISA 205K, ISA 268A, N'TA 886, R405-2000, etc.) et les variétés glandless où le gossypol est génétiquement éliminé (ISA GL6, ISA GL7, ISA LP5, ISA FMG11, etc.). Ces variétés dont la fibre et la graine présentent des caractéristiques technologiques reconnues et appréciées sur le marché international sont adaptées aux conditions pédoclimatiques du pays (N'goran, 2016).

### **1.7.2. Coton biologique**

La culture du coton conventionnel est la plus polluante au monde. Elle représente 25 % des pesticides utilisés dans le monde pour seulement 2,5 % des surfaces cultivées de la planète. Elle est aussi la troisième culture la plus consommatrice d'eau d'irrigation, après le Riz et le blé.

Ainsi, selon une étude, il faut entre 7 000 et 29 000 litres d'eau pour produire un kilogramme de coton. La culture de cette plante fait un usage intensif de produits chimiques qui appauvrissent les sols à long terme (Kouser & Qaim, 2011). Face à ce problème, la culture du coton biologique (coton bio) a été initiée. Le coton bio est cultivé sans pesticide de

synthèse ni autres produits chimiques. Au fil des ans, le coton biologique (coton bio) s'est taillé une place enviable sur le marché du textile. Bien que sa production ne représente que 0,1 % du marché, la culture du coton biologique croît de 35 % chaque année depuis 2001. Des lignes de vêtements urbains faits de coton bio font leur apparition sur les étagères des petits comme des grands magasins. Levi's, Gap, Mavi, et MEC sont quelques-unes des grandes compagnies qui offrent maintenant des collections faites exclusivement de coton biologique (CCI, 2010).

### 1.7.3. Coton transgénique

Aujourd'hui, l'arrivée des plantes transgéniques dans le paysage variétal mondial a modifié complètement les conditions de travail en sélection cotonnière. La recherche de cultivars naturellement résistants aux insectes justifie cet effort de recherche entrepris à l'échelle mondiale. En quelques années, des firmes privées sont parvenues à occuper une place importante dans le monde semencier. Elles ne dissimulent pas leur appétit de se lancer aujourd'hui à la conquête des marchés mondiaux de la semence et de s'implanter délibérément dans les pays du Sud, menaçant la variabilité et la diversité génétique du cotonnier (CIRAD, 1999). Les cotonniers Bt sont des cultivars de cotonnier de l'espèce *Gossypium hirsutum* qui ont été modifiées génétiquement par l'ajout du gène leur conférant la capacité de produire un insecticide. Le terme « Bt » fait référence au *Bacillus thuringiensis* dont le gène codant la protéine insecticide a été extrait. Les cotonniers génétiquement modifiés (cotonniers GM) Bollgard I (MON 531) et Bollgard II (MON 15985) de Monsanto sont des cotonniers Bt (Yanhui *et al.*, 2013).

En 2007, les cotonniers GM ont été cultivés à l'échelle commerciale dans neuf pays et les terres allouées à cette culture transgénique ont couvert plus de 15 millions d'hectares représentant 36 % de la superficie mondiale (Hofs, 2010). Jusqu'en 2007, seule l'Afrique du Sud commercialisait le cotonnier génétiquement modifié (CGM) à grande échelle. Dans ce pays, le cotonnier GM ne fait pas l'objet d'une conduite spécifique par rapport au cotonnier conventionnel. Au Burkina, depuis 2008, les variétés de coton génétiquement modifié sont vulgarisées par l'état (Fok, 2016). Le Burkina Faso a multiplié le coton Bt sur 8 500 hectares en vue d'atteindre près de 120 000 hectares en 2009 (Hofs, 2010). Le cotonnier Bt, variété Bollgard est le principal cotonnier transgénique commercialisé. Les variétés de type Bollgard I contenant le gène Cry1Ac ont été précocement introduites en Afrique du Sud et continuent d'être cultivées à grande échelle (Kouser & Qaim, 2011). Les cultivars de type Bollgard II

contiennent deux gènes à savoir le Cry1Ac et le Cry2Ab. Le gène Cry2Ab a été introduit dans objectif de renforcer les défenses de la plante contre les chenilles de la capsule et d'étendre le spectre de résistance de la plante à d'autres chenilles, notamment *Spodoptera frugiperda* (Leonard *et al.*, 2006).

### **1.8. Importance socio-économique**

La culture du cotonnier occupe une place importante dans l'économie mondiale. La fibre de coton représente plus de 50 % du marché des fibres textiles (Bourgou *et al.*, 2013). Les graines du cotonnier constituent également une matière première intéressante pour les industries agro-alimentaires. En effet, elles sont transformées en divers sous-produits, notamment de l'huile et des tourteaux de haute valeur protéique utilisés en alimentation humaine et animale (Berti *et al.*, 2006). La culture du cotonnier est donc très importante, parce qu'elle est à la fois une culture industrielle et une culture vivrière (Kouakou *et al.*, 2014). Les États-Unis sont les premiers exportateurs mondiaux de coton avec 40 % des ventes mondiales, devant l'Inde (FAO, 2018). Les enjeux économiques du secteur cotonnier sont importants en Afrique de l'Ouest, au Tchad et au Cameroun. En effet, les exportations de coton contribuent significativement au Produit Intérieur Brut (PIB). Cette contribution s'élève de trois à 10 % pour le Bénin, le Burkina Faso, le Mali, le Tchad et le Togo (CIRAD, 2018). Dans ces pays d'Afrique francophone, l'expression "or blanc" a été couramment employée pour évoquer en particulier l'impact économique du développement de la production cotonnière. L'impact économique positif de la production ou de la transformation du coton est bien connu dans d'autres pays depuis le XIV<sup>ème</sup> siècle (N'goran, 2016). En Afrique, le coton est un véritable moteur de développement, il revêt donc une importance économique et sociale considérable pour le continent. En effet, 35 des 53 pays africains produisent du coton et 32 d'entre eux en sont exportateurs (Konan, 2015). Le coton est également une culture importante pour l'Afrique subsaharienne en tant que source de revenus, de devises étrangères par le biais des exportations et en tant qu'outil de lutte contre la pauvreté, car il est produit comme culture commerciale par de nombreux petits exploitants agricoles (Kouakou *et al.*, 2008). Il contribue à cet effet à la sécurité alimentaire et à l'accroissement de l'espérance de vie de nombreuses zones rurales des pays en développement. Dans ces pays plus de 100 millions d'exploitations agricoles familiales vivent du coton. C'est pourquoi la forte baisse des coûts du coton enregistrés au cours des dernières années provoque une crise sans précédent.

En Côte d'Ivoire, le coton représente environ 10 % du volume des exportations et occupe la quatrième place après le cacao, le café et la noix de cajou. Il contribue à environ 1,7

% du PIB et joue de ce fait un rôle important dans économie. Il demeure une source de revenu monétaire des régions du Nord et du Centre du pays (Coulibaly, 2014). La culture cotonnière occupe plus de 150 000 producteurs et nourrit directement ou indirectement près de 3,5 millions de personnes selon l’Autorité de Régulation du Coton et de l’Anacarde (ARECA). En termes de résultat, le chiffre d’affaire de l’industrie cotonnière se situe entre 100 et 120 milliards de Francs CFA dont 70 à 80 % en devise (ARECA, 2013). Grâce à la bonne tenue des cours du coton dans le monde entre 2016-2017. En 2017, les surfaces emblavées en coton ont atteint 32 millions d'hectares.

## **2. CULTURE *IN VITRO* CHEZ LES VÉGÉTAUX**

### **2.1. Généralités**

En 1878, Claude Bernard formule les principes théoriques de la création d'un système artificiel dans lequel les organes pourraient survivre hors de l'organisme entier. Depuis cette orientation, la recherche de façon progressive a permis à la biologie de faire de grandes avancées (Nozeron & Bancihon, 1972). La culture *in vitro* a été mise au point à partir des travaux de White en 1939. Celui-ci a obtenu des racines sans virus à partir des extrémités de racines de tomates virosées mises en culture. Mais, ce n'est que en 1950 que les premières reproductions de végétaux complets *in vitro* furent réalisées (Agnès *et al.*, 2013). La culture de tissus végétaux *in vitro* correspond à la mise en culture d'explants (racines, tiges, feuilles, pétioles...), d'embryons, des ovules, des anthères ou de tissus (apex, ou méristèmes) de plantes sur un milieu synthétique et à les exposer à des conditions contrôlées. Les buts visés sont la micropropagation, la production de cellules isolées et de protoplastes (De Silva, 2008). Les méthodes de culture *in vitro* sont de plus en plus employées pour assurer la propagation clonale des génotypes élites afin de satisfaire les besoins en agriculture et horticulture. La culture *in vitro* est par ailleurs un outil très efficace au service de la recherche biologique et physiologique (Rainville & Tremblay, 2014). Les méthodes de culture *in vitro* exploitent la capacité de régénération des cellules végétales et assurent la micropropagation des clones végétaux élites par organogenèse ou embryogenèse somatiques. Par la modification des conditions de culture, il est maintenant possible de régénérer les plantes à partir des organes entiers, d'explants, de cals et de protoplastes (Ghomari, 2016). Le principe de la culture *in vitro* est basé sur la totipotence. La totipotence est la capacité intrinsèque de toute cellule à se différencier et se développer par la suite en un nouvel organisme (Augé *et al.*, 1982). La culture *in vitro* peut se faire selon différentes techniques.

### **2.2. Différentes méthodes de culture *in vitro***

#### **2.2.1. Micropropagation**

La multiplication végétative est un moyen de reproduire un être vivant sans passer par la voie sexuée (graine). La micropropagation ou propagation clonale en masse, est la multiplication *in vitro* des plantes à partir de tissus dans le but de reproduire une plante génétiquement identique à la plante mère (Grafi, 2004). C'est une technique très utile pour la multiplication des espèces sexuellement stériles tels les triploïdes, les aneuploïdes qui ne peuvent pas être perpétués par graines, les plantes sans graines comme la banane ou celles

dont les semences sont rares ou présentant des difficultés de germination et/ou dont les techniques de bouturage ou de greffage sont difficiles (Haicour, 2003). Elle nécessite peu d'espace et peut être programmée indépendamment des saisons. La technique représente donc un outil puissant aux perspectives industrielles et économiques importantes (Soneji *et al.*, 2002).

### **2.2.1.1 Microbouturage**

Le microbouturage est la technique de multiplication végétative qui consiste à cultiver des explants (bourgeons, tissus méristématiques, apex, feuilles, racines...) sur un milieu artificiel approprié. Il représente la technique la plus répandue pour produire un maximum de plantes en un temps réduit. Le microbouturage se déroule en plusieurs étapes que sont : l'initiation de la culture à partir de l'explant, la multiplication, l'élongation, l'enracinement et l'acclimatation avant le transfert au champ (Dossa *et al.*, 1994 ; Ndoumou *et al.*, 2004).

### **2.2.1.2. Culture de méristèmes**

Les méristèmes sont des zones de cellules non différenciées et à divisions intenses. Les méristèmes sont situés au cœur des bourgeons et des extrémités de racines et à l'origine de tous les tissus de la plante (tiges feuillées, système racinaire...) (Kouadio, 2018). Plusieurs travaux ont été réalisés à partir du méristème dans le but d'obtenir des plants indemnes de virus. En général, des dômes méristématiques de 0,2 à 0,5 mm sont prélevés à partir de bourgeons axillaires (Feng *et al.*, 2000). Ces méristèmes sont cultivés sur milieu artificielle additionné d'hormones de croissances.

### **2.2.1.3. Embryogenèse somatique**

La vie d'un être vivant passe par l'embryogenèse, l'acquisition de l'état adulte, la sénescence et la mort. L'embryogenèse décrit le développement de l'embryon et occupe ainsi une place importante dans la vie des plantes. Les techniques de cultures *in vitro* ont montrées que des cellules somatiques pouvaient produire des structures comparables à des embryons, méritant l'appellation d'embryons somatiques (Soupi, 2013). L'embryogenèse somatique est la formation d'embryons à partir de cellules non issues de la fusion des gamètes. De façon morphologique et physiologique, le développement de l'embryon somatique ressemble étroitement à celui de l'embryon zygotique (Ledwòn & Gaj, 2011).

La culture de tissus est la première étape des études en génie génétique (Aydin *et al.*, 2016). Les systèmes de régénération de plante exigent l'application réussie de la

biotechnologie dans l'amélioration des cultures. Son intérêt économique dans l'agriculture a fait de l'embryogenèse végétale un sujet d'étude qui intéresse également les sélectionneurs (Soupi, 2013). L'embryogenèse somatique représente une méthode très prolifique de multiplication *in vitro* des végétaux (Beniken *et al.*, 2013). Le tissu embryogène présente un aspect très caractéristique. Il est blanchâtre, luisant, translucide et mucilagineux contrairement au tissu non embryogène qui reste vert. Les embryons somatiques se détachent facilement du cal avec lequel ils n'ont aucune liaison vasculaire. Ce qui permet de les distinguer facilement des bourgeons adventifs. Les potentialités callogènes et embryogènes diffèrent suivant le génotype, et dans une moindre mesure en fonction du stade de prélèvement de l'explant (Label *et al.*, 2015).

La totipotence trouve son expression la plus complète au cours de l'embryogenèse somatique durant laquelle une cellule somatique (non issue de tissus sexués) développe les caractéristiques des différents stades embryonnaires sans qu'il y ait eu au préalable méiose et fusion de gamètes (Gonzalez *et al.*, 2012). L'embryon somatique dérive d'un groupe de cellules par mitoses successives. Il est important de noter que si elle existe à l'état spontané dans la nature (cas des genres *Citrus* et *Mangifera*) (Sané, 1998), l'embryogenèse somatique est surtout développée expérimentalement comme un moyen de régénération et de multiplication *in vitro*. L'embryogenèse somatique représente aussi un outil de développement en foresterie et en agriculture. Cette technique est déjà utilisée à l'échelle industrielle pour les épicéas et différents pins aux États Unis et en Nouvelle Zélande (Tremblay & Lamhamedi, 2006). Des embryons zygotiques immatures ont été utilisés comme explants et mis en culture sur un milieu contenant des hormones de croissance telles que : les auxines et les cytokinines. Outre l'équilibre hormonal, de nombreux facteurs sont déterminants dans la réussite du processus de la callogenèse et de l'embryogenèse somatique (Kouadio, 2018).

Chez le cotonnier, l'embryogenèse somatique dépend du génotype. Cette dépendance génotypique limite l'efficacité l'embryogenèse somatique pour l'amélioration du cotonnier (Zouzou *et al.*, 2008). Ainsi, selon l'état des connaissances actuelles, seule la variété de cotonnier Coker présente une aptitude à l'embryogenèse somatique à un taux et une fréquence élevée (Feng *et al.*, 2000 ; Koné, 2003). De ce fait, cette variété est considérée comme embryogène. Aux États Unis, sur une centaine de variétés de cotonniers cultivées, la plupart sont récalcitrantes à l'embryogenèse somatique (Sakhanokho *et al.*, 2001). Des études ont montré que l'acquisition des compétences embryogènes est accompagnée d'une synthèse

accrue de phénols et de protéines dans les cellules (Kouakou, 2003). De même, des travaux ont révélé que l'accumulation de lipides ne favorise pas l'acquisition des capacités embryogènes chez plusieurs espèces végétales (Weber & Taylor, 1990). Des études récentes montrent que des variétés de cotonnier plus productives (*Gossypium hirsutum* L. et *Gossypium barbadense* L.), ont également été régénérées par embryogenèse somatique, mais à un taux et fréquence faibles (Sakhanokho *et al.*, 2001 ; Zhang *et al.*, 2001). L'embryogenèse somatique se fait soit directement, soit indirectement (Karami & Saidi, 2010).

#### **2.2.1.3.1. Embryogenèse somatique directe**

Elle se réalise en une seule phase, par la culture des explants sur milieu unique. Au cours de l'embryogenèse directe, les embryons proviennent de tissus et il y a absence de prolifération de cal. Ces embryons sont issus de cellules pré-embryogéniques déterminées (P.E.D.C) dans lesquelles les cellules sont déjà engagées dans un développement embryogène (Soupi, 2013). Selon Saadi & Hamdani (2007), ces embryons existent déjà dans les tissus de certains explants comme les embryons immatures ou les fragments de très jeunes plantes.

#### **2.2.1.3.2. Embryogenèse somatique indirecte**

Cette voie nécessite une prolifération cellulaire (callogenèse). Les embryons somatiques ne présentent pas de phase de déshydratation comme les embryons zygotiques qui se développent directement en plantules, ils diffèrent aussi par leur origine. Selon Evans *et al.* (1989), des cellules initiatrices différenciées dépourvues de capacité embryogène appelées cellules pré-embryogènes indéterminées (PEIC) seraient à l'origine de ce type d'embryogenèse. L'embryogenèse somatique indirecte ou callogenèse offre de nombreuses perspectives pour la création variétale et la propagation des porte-greffes (Dutt & Grosser, 2009). La callogenèse constitue la première étape de l'embryogenèse somatique indirecte et un sentier possible pour l'amélioration des espèces. Les potentialités callogènes et embryogènes apparaissent fortement différentes suivant le génotype, et dans une moindre mesure en fonction du stade de prélèvement. Le développement des cals embryogènes est le point de départ pour isoler des protoplastes et la régénération des plantules (Label *et al.*, 2015). Les cellules embryogènes apparaissent plus tard, au sein du cal obtenu (Ramdan *et al.*, 2014). L'obtention de cals par culture *in vitro* permet une augmentation de la variabilité et peut être suivie d'une régénération et d'un taux élevé de multiplication (Özgen *et al.*, 1996).

## - Callogenèse

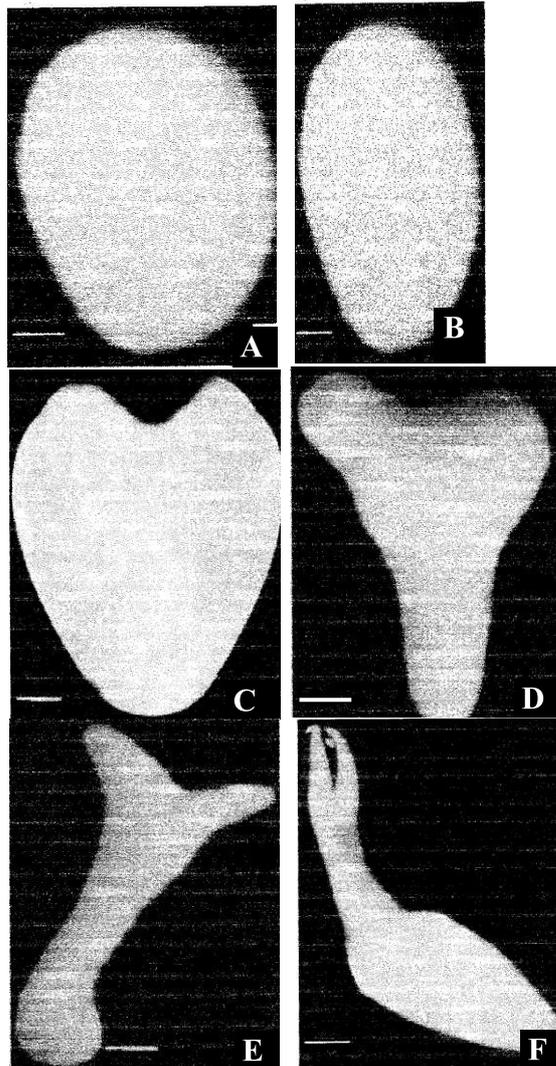
La callogenèse est la formation de cals qui sont des amas de cellules indifférenciées. Les cals résultent d'une dédifférenciation de cellules différenciées sous l'influence d'un stress hormonal et/ou osmotique (Najiba *et al.*, 2008). L'obtention de cals implique la mise en culture de l'explant sur un milieu artificiel additionné de phytohormones. Les phytohormones peuvent agir seul. Cependant, plusieurs auteurs ont montré que la combinaison auxine/cytokinine est indispensable pour l'induction et la prolifération des tissus végétaux (Houndonougbo, 1989 ; Akbar *et al.*, 2003 ; Yapo, 2013 ; Kouadio, 2018). La photosynthèse étant quasiment nulle en culture *in vitro*, l'addition d'une source de carbone est nécessaire au milieu de culture pour fournir l'énergie aux tissus cultivés. Plusieurs sources de carbone sont couramment utilisées pour l'induction et la prolifération des cals et la réponse des explants, diffère selon les espèces. Chez l'ananas par exemple, le saccharose a été identifié comme meilleur sucre pour induire les cals (Yapo, 2013 ; Kouadio, 2018). Alors que chez le cotonnier, les travaux de plusieurs auteurs ont révélé que le glucose à la concentration 30 g.L<sup>-1</sup> induisait les cals les plus volumineux et les plus friables (Kouadio, 2004 ; Zouzou *et al.*, 2008 ; Kouakou, 2009). La callogenèse peut être initiée à partir de n'importe quelle partie de la plante (ovules, embryons excisés, tiges, racines et feuilles) (Handaji *et al.*, 2005 ; Benyahia *et al.*, 2012 ; Ramdan *et al.*, 2014 ; Kouadio, 2018). Chez le Blé tendre (*Triticuma estivum*), l'initiation de cals a été réalisée à partir de fragments de feuilles, d'inflorescences, d'embryons immatures et matures avec plus ou moins de succès selon les variétés (Ayolié *et al.*, 2007).

Chez le cotonnier, les cals ont été obtenus pour la première fois par Beasley en 1971 sur le milieu Murashige & Skoog (MS) (1962). Depuis cette époque, l'induction des cals à partir de plusieurs explants a été rapportée (Trolinder & Goodin 1988; Zhang *et al.*, 2001 ; Zouzou *et al.*, 2008 ; Kouakou *et al.*, 2009). Plusieurs facteurs influencent la callogenèse chez le cotonnier. Selon Trolinder & Goodin (1988) la composition du milieu de base influence d'une manière ou d'une autre l'induction des cals chez le cotonnier. En effet, Zouzou *et al.* (2008) ont utilisé avec succès le milieu MS pour induire des cals chez le cotonnier. Les travaux de Koné (2003) et de Kouakou (2003) antérieur à ceux de Zouzou ont montré que les milieux MS additionné des vitamines B5 de Gamborg (1968) et de combinaison hormonale 2,4 D/KIN sont très favorables à l'induction et la prolifération de cals chez le cotonnier.

## **Stades de développement des embryons**

Les embryons somatiques présentent dès le début de leur formation, une structure bipolaire. Ils passent par différents stades d'évolution avant leur maturation. Plusieurs études ont montré que la forme torpédo ou cotylédonaire représente le stade embryogénique le plus évolué (Nomura & Komamine, 1995 ; Thiruwengadam *et al.*, 2006). Quatre stades ont été distingués au cours du développement des embryons (Figure 2) :

- Le stade globulaire qui se caractérise par une organisation concentrique conduisant à la mise en place d'une symétrie radiale de l'embryon.
- Le stade cordiforme représenté par le passage de la symétrie radiale à une symétrie bilatérale.
- Le stade torpille qui apparaît suite au développement des ébauches cotylédonaires de chaque côté du méristème apical. Cependant, l'embryon reste toujours petit à ce stade.
- Le stade torpédo ou cotylédonaire, au cours duquel les cotylédons croissent rapidement. L'axe embryonnaire autour duquel s'organise la symétrie bilatérale s'allonge et les tissus parenchymateux et vasculaires se différencient (Mishra *et al.*, 2012).



**Figure 2. Différents stades évolutifs des embryons somatique**

(Mishra *et al.*, 2012) A : Stade globulaire ; B : Stade cordiforme ; C-D : Stade cœur ; E-F : Stade torpédo/cotylédonaire ; 0,4 mm —

### **2.3. Facteurs influençant la culture *in vitro***

#### **2.3.1. Composition du milieu de culture**

##### **2.3.1.1. Type de milieu de culture**

Il existe plusieurs types de milieux en culture *in vitro* : Murashige & Skoog (1962), Gamborg *et al.* (1968), Schenck & Hildebrandt (1972), Kao & Michayluk (1975), Chu (N6) (1978), Lloyd & Mc Cown (1980). Chacun de ces milieux est spécifique à chaque groupe de plante. Cependant, le milieu Murashige & Skoog est sans aucun doute le plus utilisé. Car, il convient à un très grand nombre de plantes et est très riche en sel minéraux (Tableau I). Il est bénéfique à la culture et la prolifération de méristèmes et de tiges jusque-là réfractaire à la multiplication végétative *in vitro* (Murashig & Skoog, 1962). Chez le cotonnier, le milieu

Murashige & Skoog (MS) est le plus utilisé et permet d'obtenir de meilleurs résultats (Trolinder & Goodin, 1988 ; Kouakou, 2003, Koné, 2003 ; Zouzou *et al.*, 2008). Le milieu de culture peut accélérer ou inhiber la prolifération des cals selon sa composition et la concentration des différents éléments (Essozima *et al.*, 2014 ; Sekloka *et al.*, 2016). L'explant doit trouver dans le milieu de culture tout ce dont il a besoin pour survivre, se multiplier et éventuellement régénérer un nouvel individu (Rainville & Tremblay, 2014)

**Tableau I. Composition du milieu de base MS (Murashige et Skoog, 1962)**

<b>Composés</b>	<b>Concentrations (mg.L<sup>-1</sup>)</b>
<b>Macroéléments</b>	
Nitrate d'ammonium (NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> )	1650
Nitrate de potassium (KNO <sub>3</sub> )	1900
Chlorure de calcium (CaCl <sub>2</sub> ), 2H <sub>2</sub> O	440
Sulfate de magnésium (MgSO <sub>4</sub> ), 7H <sub>2</sub> O	370
Dihydrogénophosphate de sodium (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	170
<b>Microéléments</b>	
Sulfate de manganèse (MnSO <sub>4</sub> ), 4H <sub>2</sub> O	22,3
Sulfate de zinc (ZnSO <sub>4</sub> ), 7H <sub>2</sub> O	8,6
Acide borique (H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> )	6,2
Iodure de potassium (KI)	0,83
Sulfate de cuivre (CuSO <sub>4</sub> ), 5H <sub>2</sub> O	0,025
Molybdate de sodium (Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ), 2H <sub>2</sub> O	0,25
Chlorure de cobalte (CoCl <sub>2</sub> ), 6H <sub>2</sub> O	0,025
Sulfate de fer (FeSO <sub>4</sub> ), 7H <sub>2</sub> O	27,8
Acide éthylènediaminetétracétique sel disodique (Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O)	37,3

**Les vitamines** sont des composés organiques requis en quantités minimales en culture de tissus (Griffin, 1994). En culture *in vitro*, les vitamines essentielles sont la thiamine (vitamine B1), l'acide nicotinique, la pyridoxine (vitamine B6) et la myo-inositol qui jouent le rôle de coenzymes (Tableau II). Ces vitamines sont des composantes du milieu Murashige & Skoog (1962) utilisé dans la culture *in vitro* des végétaux (Kouadio, 2018). La thiamine

stimule la formation des cals embryogènes et la division cellulaire (Chee, 1995). La myo-inositol quant à elle est impliquée dans la formation des pousses (Azano *et al.*, 1996).

**Tableau II. Compositions vitaminiques B5 (Gamborg, 1965) additionnés aux milieux de cultures**

<b>Substances organiques</b>	<b>Vitamines B<sub>5</sub> (mg.L<sup>-1</sup>)</b>
Myo-inositol	100
Acide nicotinique	1
Pyridoxine HCl	1
Thiamine HCl	10

### 2.3.1.2. Régulateurs de croissance

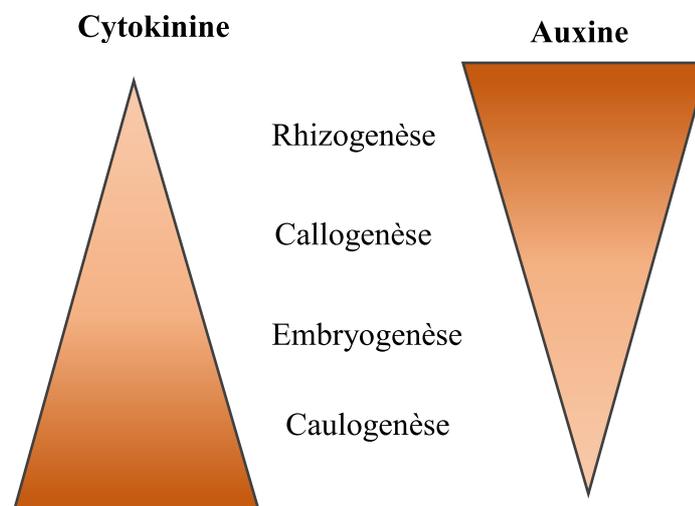
Un régulateur de croissance est une substance qui, suivant sa concentration absolue ou relative dans le milieu, peut supprimer, permettre ou modifier sous certaines conditions les processus de différenciation (Ghomari, 2016). Les régulateurs de croissance sont indispensables à la réussite de la culture *in vitro* des tissus. On les appelle aussi phytohormones ou hormones végétales ; ils peuvent être exogènes ou endogènes. Ce sont des molécules diffusibles qui stimulent l'acquisition du potentiel embryogène (Yapo, 2013). Les plus utilisés sont les auxines, les cytokinines et les gibbérellines.

**Les auxines** sont reconnues pour leur rôle dans l'embryogenèse. Elles sont utilisées à une concentration supérieure à celle retrouvée dans les conditions naturelles. La plus utilisée est le 2-4 Dichlorophénoxyacétate (2,4-D), qui est une auxine de synthèse. Chez le cacaoyer par exemple, une concentration de 18  $\mu\text{M}$  est nécessaire à l'induction des embryons somatiques (Fehér *et al.*, 2003). L'action des auxines est fonction de la concentration, du type de culture, d'organe et de cultivar. Chez le cotonnier, le 2,4-D à la concentration de 0,1  $\text{mg.L}^{-1}$  et l'acide naphthalène acétique ANA à la concentration de 5  $\text{mg.L}^{-1}$  ont permis d'induire des cals et des embryons somatiques (Koné, 2003 ; Wang *et al.*, 2006 ; Kouakou, 2009). Les travaux de Houndonougbo (1989) ont rapporté que l'acide indole-3 acétique (AIA), l'acide naphthalène acétique (ANA) et le 2,4-D induisent des cals chez la patate douce. Une autre hormone, l'Acide Aminobutyrique (ABA) sert de messenger chimique en réponses aux stress et stimule l'embryogenèse somatique (Agnès *et al.*, 2013).

**Les cytokinines** sont des adénines substituées dont on connaît deux composés endogènes : la Zéatine, l'Isopentényladénine (IPA). Elles sont aussi constituées de composés synthétiques dont les plus employés sont la Kinétine (6 furfuryl-aminopurine) et la

Benzyladénine (BAP) (6 benzyl-aminopurine) (Yapo, 2013). Les cytokinines sont produites préférentiellement dans la racine d'où elles migrent vers les différents organes (Figure 3). Elles stimulent la formation de bourgeon, mais s'opposent à la rhizogenèse, tout en favorisant la division et la croissance cellulaires (Figure 3) (Dorion, 2014 ; Kouadio, 2018). Elles ne sont efficaces qu'en coopération avec les auxines. Une étude menée sur le Pistachier (*Pistacia vera* L.) a montré la BAP à la concentration de 0,5 mg.L<sup>-1</sup> combinée à des fortes concentrations de ANA, entraîne un prolifération importante de cals (Chisari *et al.*, 2007). Chez le cotonnier, la kinetine à la concentration de 0,5 mg.L<sup>-1</sup> combiné à 0,1 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D induisait une forte callogenèse (Kouadio, 2004 ; Zouzou *et al.*, 2008 ; Kouakou, 2009) (Figure 3

**Les gibbérellines** ce sont des composés naturels appartenant au groupe des diterpénoïdes dont la formule comporte un squelette gibbane, capable d'augmenter la croissance des entre-nœuds aussi bien à la lumière qu'à l'obscurité. La première gibbérelline identifiée est l'acide gibbérellique ou GA<sub>3</sub> qui est la plus utilisée. Yapo *et al.* (2011), au cours d'une étude réalisée sur l'ananas (*Ananas comosus*) ont montré que l'addition de la GA<sub>3</sub> au milieu MS favorisait la germination des embryons. Chez le cotonnier, Pathi & Tuteja, (2013) ont allongé avec succès des pousses avec des concentrations allant de 0,1 à 2 mg.L<sup>-1</sup>.



**Figure 3. Influence de l'équilibre entre les auxines et les cytokinines sur l'organogénèse**

(Source : Skoog & Miller, 1957)

### 2.3.1.3. Géloses

Les géloses sont additionnées au milieu de culture et permettent l'obtention d'un milieu semi-solide ou solide dans lequel les explants peuvent être repiqués. La gélose à

l'avantage de retenir très peu les ions. Toutefois, les géloses fournissent un milieu de vie pauvre en oxygène lorsqu'elles sont utilisées à forte concentration. La qualité d'un milieu gélosé est donc dépendant d'une part de sa fermeté, indispensable au support de la plante et d'autre part de sa souplesse, qui facilite la diffusion des éléments nutritifs. La concentration utilisée varie selon le niveau de pureté de la gélose et de l'objectif de la culture. Les géloses les plus utilisés sont l'agar-agar, le phytagel, le gelrite (Essozima *et al.*, 2014).

#### **2.3.1.4. Hydrates de carbone**

Les sucres ou les hydrates de carbone jouent un rôle important en culture *in vitro*. Ils interviennent en tant que source d'énergie, de carbone et agent osmotique. Ils régulent également l'expression des gènes chez les végétaux. En cultures *in vitro*, les tissus sont généralement hétérotrophes compte tenu de l'absence ou de l'insuffisance de l'assimilation chlorophyllienne. Il est donc indispensable de leur apporter une source de carbone (sucres) via le milieu de culture (Kouadio, 2018). Une fois dans le milieu de culture, les sources de carbone exercent deux fonctions principales à savoir fournir d'une part l'énergie nécessaire pour la croissance des tissus et d'autre part assurer le maintien de la pression osmotique (Murphy, 1993). Cette pression osmotique accélère la prolifération cellulaire et la maturation des embryons. La majorité des plantes cultivées *in vitro* nécessitent une source de carbone pour leur croissance (Abeda, 2016). Il existe plusieurs sources de carbone. Le saccharose et le glucose ont été identifiés comme les meilleures sources de carbone pour la culture tissulaire chez un grand nombre de végétaux (Druart & Samyn, 1995). Dans la nature, les sucres sont photosynthétisés à partir du gaz carbonique atmosphérique et de l'eau du sol.

#### **2.3.1.5. Anti-oxydants**

Le brunissement enzymatique en culture *in vitro* est une réaction qui se manifeste par l'apparition d'une coloration brune qui commence généralement par l'explant, puis le milieu de culture. Ces colorations indésirables forment une barrière autour du tissu, ce qui empêche l'absorption de nutriments et entrave la croissance (Arbaoui *et al.*, 2018). Le brunissement intervient lorsque le matériel végétal est exposé à une situation de stress. Pour réduire le brunissement causé par l'oxydation des composés, certains anti-oxydants sont ajoutés au milieu de culture (Dublin, 1980). Il existe plusieurs types d'anti-oxydants. Ainsi, chez le bananier, Koné (2010) ont utilisé le charbon actif ( $2 \text{ g.L}^{-1}$ ) pour lutter contre le phénomène d'oxydation de milieu de culture. Chez le caféier, la cystéine a permis de prévenir le brunissement causé par les phénols (Dublin, 1980). Le chlorure de magnésium ( $\text{MgCl}_2$ ) est

souvent utilisé en culture du cotonnier pour réduire le brunissement causé par les polyphénols (Trolinder & Gooding, 1962 ; Zouzou *et al.*, 1997 ; Kouakou, 2003).

#### **2.3.1.6. Acides aminés**

L'apport d'acides aminés favorise la prolifération des tissus (Rainville & Tremblay, 2014). En effet, une fois additionnés aux milieux de culture, les acides aminés augmentent la quantité d'azote directement utilisable par les explants. En culture *in vitro*, les acides aminés jouent un rôle très important. Dans une étude réalisée sur l'ananas, Hamasaki *et al.* (2005) ont conclu que l'addition de 8 mM de glutamine au milieu d'induction de pousse augmente le pourcentage de régénération à près de 70 %. Aussi, lors des travaux réalisés sur le cotonnier, Wang *et al.* (2006) ont réalisé que le taux élevé de cals et d'embryons somatiques sont obtenus grâce au milieu MS additionné de 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de glutamine et de 0,5 mg.L<sup>-1</sup> d'asparagine. Chez l'ananas, la glutamine est l'acide aminé couramment utilisé pour la culture de tissus (Mercier et Kerbay, 1998 ; Hamasaki *et al.*, 2005).

##### **2.3.1.6.1. Hydrolysate de caséine**

L'hydrolysate de caséine est un ensemble de 20 acides aminés. Il est très riche en L-Glutamine qui constitue une importante source d'azote. De nombreux travaux ont montré le rôle déterminant de cet acide aminé en culture de tissu. Ainsi, selon Merkle *et al.* (1998), les milieux de culture additionnés de 1 mg.L<sup>-1</sup> d'hydrolysate de caséine ont permis d'induire des cals et des embryons somatiques chez *Liquidamber styraciflum*. Cependant, dans une étude réalisée sur *Momodia charautial*, Thinwengadam *et al.* (2006) ont montré que le milieu MS supplémenté de 2,4-D et de l'hydrolysate de caséine ne permettait pas l'induction d'embryons somatique.

##### **2.3.1.6.2. Glutamine et l'asparagine**

L'utilisation de la glutamine est fréquente en culture *in vitro* et joue le rôle source d'azote (Hamasaki *et al.*, 2005). Les travaux de Shetty & Kersie (1993) ont démontré que la glutamine peut être bénéfique à la culture *in vitro* pour augmenter le pourcentage de régénération des explants. Des milieux de culture supplémentés de glutamine entraînent une augmentation de poids de la matière sèche chez certaines espèces telles que les bromeliaceae (Mercier & Kerbay, 1998). Cependant selon Finer (1988), lorsque la glutamine est additionnée à l'asparagine, le taux d'induction d'embryons somatiques diminue. D'autre part, les concentrations trop élevées de cet acide aminé entraîne une inhibition de la croissance.

### **2.3.1.6.3. Glycine**

La glycine ou gycocolle est fréquemment utilisé en culture *in vitro* car elle fait partie de la composition du milieu MS. Selon Yemet *et al.* (2002) une importante prolifération des cals est enregistré lorsque le milieu MSB5 est additionné de 2 mg.L<sup>-1</sup> glycine. Aussi, dans une étude réalisée sur l'ananas (*Ananas comosus*), Yapo (2013) et Kouadio (2018) ont montré que la glycine exerce une influence sur la callogenèse de cette espèce. Chez *Eleusine indica*, l'effet bénéfique de la glycine sur la callogenèse de cette espèce a été signalé par Jheng *et al.* (2006).

## **2.3.2. Facteurs environnementaux**

### **2.3.2.1. Lumière et photopériode**

La lumière est un facteur déterminant en culture *in vitro*. Elle a une grande influence de par la durée d'exposition ou la photopériode. La longueur du jour qui affecte la vigueur, le développement des proliférations et la croissance des vitroplants pourrait aussi contribuer à la formation des cals. De façon générale, le début de la croissance nécessite une faible intensité lumineuse (500 à 1000 lux) avec 12 à 16 heures de photopériodes (Ghomari, 2016). Lorsqu'il s'agit de préparer la plantule au repotage en serre, il est souvent préférable d'augmenter l'intensité de la lumière (par exemple 10000 lux). Chez le cotonnier, une intensité lumineuse de 2000 lux est suffisante pour l'obtention de cals (Koné, 2003 ; Kouakou, 2009).

### **2.3.2.2. Température et hygrométrie**

La température de beaucoup de chambres de culture est constante de l'ordre de 22 à 25 °C. Mais, des études ont montré que de faibles températures comprises entre 15 à 20 °C stimulant la micro tubérisation chez la pomme de terre (Ghomari, 2016). Certains travaux ont montré que l'incubation des vitroplants à des températures non régulières, entraîne une irrégularité de l'évapotranspiration du plant, et par conséquent une diminution de sa croissance. L'hygrométrie doit être comprise entre 70-100 % dans la salle de culture. Cependant, il faut veiller à ne pas noyer les explants par un excès de condensation à la surface du milieu. Chez le cotonnier, la température pour une bonne croissance de culture se situe entre 27 ± 2 °C pour une hygrométrie de 70 % (Kouakou, 2009).

### **2.3.3. Facteurs liés à l'explant**

#### **2.3.3.1. Espèces et genres**

La réponse des plantes à l'embryogenèse somatique diffère beaucoup selon les genres, mais également selon les espèces à l'intérieur d'un même genre. Ainsi, les comparaisons faites entre espèces d'un même genre ont montré que l'épinette noire (*Picea mariana*) se prête mieux à la régénération *in vitro* que l'épinette blanche (*Picea glauca*) (Attrée *et al.*, 1990). Chez le cotonnier, Trolinder & Goodin, (1988) ; Zouzou *et al.* (1997) ont montré que la dépendance génotypique à la callogenèse et à la régénération *in vitro* limite fortement les performances de l'embryogenèse somatique pour l'amélioration variétale. La plupart des variétés de cotonnier sont récalcitrante à l'embryogenèse somatique car ils produisent des composés qui empêchent l'absorption des minéraux (Kouakou, 2003). Ainsi, le renouvellement du milieu est indispensable pour une bonne culture *in vitro* du cotonnier (Kouakou, 2009 ; 2010). Enfin, dans des travaux réalisés sur blé, Ayolié *et al.* (2007) ont observé que la callogenèse du Blé dur (*Triticum durum*) reste moins maîtrisée et dépend des variétés.

#### **2.3.3.2. Nature et état de l'explant**

L'âge de l'explant est d'une importance capitale en culture *in vitro*. Généralement, les explants les plus jeunes (embryons immatures, jeunes feuilles, méristèmes etc.) sont privilégiés. En effet, à l'état juvénile les explants offrent plus de possibilité de régénération (Saadi & Hamdani, 2007). Ainsi, comparant les résultats obtenus avec l'espèce *Picea mariana* selon le type d'explant mis en culture, Tautorus (1990) a observé que les embryons zygotiques immatures induisent un taux élevé de cals (65 %) par rapport aux embryons zygotiques matures (8 %). Chez la plupart des espèces, pour obtenir des structures embryogènes, il faut que l'explant utilisé soit très jeune, très proche de l'état embryonnaire tels que les parois de l'ovaire, les pièces inflorescentielles, les embryons immatures, les zones hypocotyle de la plantule, les bases cotylédonaire.

#### **2.3.3.3. Taille de l'explant**

La taille de l'explant est aussi un facteur important en culture *in vitro*. Plus la taille est importante et plus les équilibres endogènes sont déterminants et les conditions extérieures seront influentes (Ledwón & Gaj, 2011). La taille peut varier selon le type d'explant. Ainsi, si l'explant est de nature organisée, un ensemble assez complet sera nécessaire (soit un nœud, un apex, ou un bourgeon entier). Cependant, dans le cas d'une structure différenciée telle une

feuille, une tige, une racine ou une inflorescence, la taille des fragments doit être comprise entre 5 et 10 mm (Hannweg *et al.*, 1996). En ce qui concerne le cotonnier, la taille idéale de l'explant est de 5 mm (Kouakou, 2009 ; Koné, 2010).

#### **2.4. Avantages et inconvénients de la culture *in vitro***

Les avantages de la culture *in vitro* sont nombreux. La production de vitroplants pouvait se substituer à la méthode de microbouturage avec des avantages suivants :

- la possibilité de conservation de ressources végétales et produire une banque de géotypes et réaliser ainsi des plantations en dehors de la période de croissance (Dellaa, 2013);
- l'amélioration des conditions sanitaires par les techniques de cultures *in vitro* souvent associées à l'éradication des viroses (Rainville & Tremblay, 2014);
- le raccourcissement des cycles de développement ;
- la production de plants rapide et en masse, à n'importe quel moment de l'année ;
- la propagation végétative des espèces qui ne présentent pas ces capacités en conditions classiques ; obtention de plantes présentant toutes les mêmes caractéristiques : clones ;
- la culture *in vitro* permet la multiplication rapide, une production de matériel végétal sain à grande échelle dans un espace réduit (Kumar *et al.*, 2005).

Cette pratique n'est cependant pas sans inconvénients :

- beaucoup d'espèces sont réfractaires à la multiplication végétative ;
- la culture *in vitro* exige une main d'œuvre qualifiée ;
- certains accidents, non prévisibles au départ, peuvent intervenir en cours de culture *in vitro*, comme des malformations dues à un déséquilibre hormonal : la vitrification ;
- l'asepsie des explants : la présence de micro-organismes, bactéries, champignons, virus, qui, s'ils ne sont pas totalement éliminés, contaminent la culture et tuent les jeunes plantules ;
- le passage à des conditions de culture normale est parfois délicat. En effet, durant son séjour *in vitro*, la plante est à l'abri des stress ;

- la variation somaclonale : certains cas d'hyperfloraison, perte de sexualité chez certaines espèces, apparition d'organes anormaux. L'apparition d'anomalies génétiques (Rainville & Tremblay, 2014).

### 3. COMPOSÉS BIOCHIMIQUES INTERVENANT DANS LE PROCESSUS DE L'EMBRYOGENÈSE SOMATIQUE

Le processus de la callogenèse et l'embryogenèse somatique entraîne un métabolisme intense des composé biochimiques (Macheix *et al.*, 1990). Plusieurs composés sont impliqués dans le catabolisme ou la synthèse de ces substances. Les phénols, les protéines, les sucres et certaines enzymes sont fortement impliqués dans l'induction de structure embryogènes (Kouakou, 2009 ; Kouakou *et al.*, 2014). Nous présenterons quelques composés impliqués dans l'induction de l'embryogenèse somatique.

#### 3.1. Composés phénoliques

Les composés phénoliques ou polyphénols sont des substances chimiques représentant un groupe très hétérogène de métabolites secondaires, très largement répandus dans le règne végétal. Ils comprennent au moins un noyau aromatique et un ou plusieurs groupes hydroxyles phénoliques avec plus de 8000 structures phénoliques identifiées dans le règne végétal (Bruneton, 1999 ; Urquiaga & Leighton, 2000). Les composés phénoliques sont présents dans toutes les parties de la plante et jouent un rôle important dans la défense des plantes contre les agresseurs. Les principales sources sont les fruits, les légumes, les céréales et les fruits secs, mais également les boissons telles que le vin, le thé, le café, le cidre, et la bière. Les composés phénoliques ont aussi été identifiés pour leurs rôles déterminants au cours de l'embryogenèse somatique. En effet, Bouchelta *et al.* (2005) ont noté la présence des polyphénols dans les parois des cellules et une grande accumulation des composés phénoliques dans les cellules embryogènes de *Cryptomeria japonica* et *Phoenix dactylifera*. Il existe de nombreux polyphénols, parmi lesquels deux familles sont importantes chez les fruits tropicaux : les catécholamines synthétisées à partir de la tyrosine sont peu étudiées et les phénylpropanoïdes synthétisés à partir de phénylalanine via l'intervention de la phénylalanine ammonia-lyase (Rinaldo *et al.*, 2010). Les polyphénols sont caractérisés par la présence d'un noyau benzénique portant des groupements hydroxyles libres ou liés à un sucre. Ils résultent biogénétiquement de deux voies synthétiques principales qui sont la voie shikimate et la voie acétate (Lugasi *et al.*, 2003).

La voie la plus courante est celle qui, *via* le shikimate (acide shikimique), conduit à la formation des acides aminés aromatiques (phénylalanine et tyrosine) puis, par désamination de ces derniers, aux acides cinnamiques et à leurs nombreux dérivés : acides benzoïques, acétophénones, lignanes, lignines et coumarines (Hu *et al.*, 2009).

La voie de l'acétate qui conduit à la formation des polyacétates qui engendrent, par cyclisation (réaction de Claisen ou condensation aldolique), des composés souvent polycycliques : chromones, orcinols, isocoumarines, xanthones, et quinones (Lugasi *et al.*, 2003).

Les composés phénoliques jouent un rôle dans la résistance vasculaire. Elles peuvent avoir une fonction protectrice en réponse à diverses contraintes (Dixon & Paiva, 1995). La culture *in vitro* du cotonnier produit de nombreux composés biochimiques induisant le brunissement des milieux de culture et même des explants. Des études ont signalé l'augmentation de la teneur de ces composés au cours du processus de régénération de certaines espèces. Ainsi, Kouakou (2003) a montré chez le cotonnier que la teneur en composés phénoliques de la variété embryogène Coker est plus importante que celle des variétés considérées comme non embryogènes. L'acquisition des potentialités embryogènes aurait donc un lien avec l'accumulation de certains composés phénoliques et enzymatiques.

### **3.2. Protéines**

Les protéines sont constituées d'une très longue suite d'acides aminés dont le nombre et l'emplacement sont déterminés génétiquement pour chaque espèce animale ou végétale. Des études ont montré que les protéines jouent un rôle important dans la croissance et la prolifération des tissus cultivés *in vitro*. Selon Lege *et al.* (1995), la teneur en protéine des cellules embryogènes serait plus élevée que celle des cellules non embryogènes. L'accumulation des protéines est donc considérée comme un marqueur biochimique de l'embryogenèse somatique (Mordhorst *et al.*, 1994).

### **3.3. Phénylalanine ammonia-lyase (PAL)**

La phénylalanine ammonia-lyase (PAL) est une enzyme de la biosynthèse des composés phénoliques (Ke & Saltveit, 1989). Son activité permet de générer la cinnamate qui est la molécule de départ de nombreuses voies de biosynthèse des phénols. C'est certainement une des enzymes les plus étudiées du métabolisme phénolique pour ce qui est des aspects biochimiques et physiologiques (Kouakou, 2009). C'est la première enzyme impliquée dans la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes (N'goran, 2016). Selon Rao *et al.* (1990), l'activité de la PAL serait en rapport avec l'induction de structures embryogènes et pourrait donc être considéré comme des marqueurs de l'embryogenèse.

### **3.4. Tyrosine ammonia-lyase (TAL)**

La tyrosine ammonia-lyase (TAL) assure la désamination de la tyrosine en acide coumarique. En effet, comme la phénylalanine ammonia-lyase, c'est un précurseur des lignines et de nombreux composés phénoliques qui, d'après Morrelo *et al.* (2005), posséderaient une activité antifongique. La tyrosine ammonia-lyase, mise en évidence initialement chez les monocotylédones, présente un niveau d'activité plus ou moins semblable à celui de la phénylalanine ammonia-lyase (Wajahatullah *et al.*, 2003).

### **3.5. Gaïacol Peroxydases (GPx)**

Les peroxydases sont des enzymes de biosynthèse des lignines par polymérisation des unités constitutives (Kanazawa *et al.*, 2000). Ils catalysent l'oxydation de monophénols en monoquinones (Kouakou *et al.*, 2009). L'augmentation de l'activité peroxydasique en réponse à différents stress fait l'objet de nombreuses études (Kouakou, 2003 ; Chisari *et al.*, 2007). Les peroxydases renferment plusieurs isoenzymes qui jouent un rôle important dans l'induction d'embryons (Baaziz *et al.*, 1994).

### **3.6. Polyphénoloxydase (PPO)**

La polyphénoloxydase, largement répandues dans le règne végétal, est une oxydoréductase qui a fait l'objet de nombreuses études (Chisari *et al.*, 2007 ; Kouakou *et al.*, 2008). Ce sont des oxydoréductases capables de catalyser l'oxydation des O-diphénols en diquinones (Mayer, 1987). Le rôle physiologique des PPO est mal connu, cependant, leur présence dans les cellules embryogènes laisse penser qu'elles sont impliquées dans les processus d'induction d'embryons avec un taux plus élevé dans les cellules embryogènes que dans cellules non embryogènes (Baaziz *et al.*, 1994).

### **3.7. Ascorbate peroxydase et catalase**

L'acide ascorbique est un antioxydant phénolique. En présence d'acide ascorbique, les quinones peuvent être convertie en O-diphénols et libérer de l'acide dehydroxyascorbique ADHA. Ainsi une forte teneur en acide ascorbique peut prévenir l'apparition de symptômes de brunissements (Macheix *et al.*, 2005). Les enzymes telles que la catalase (Cat), l'ascorbate peroxydase (APx), ainsi que certaines molécules non enzymatiques telles que les vitamines A, C, E, le glutathion et les différents pigments (carotène, xéaxanthine, xanthophylle) participent à la détoxification des cellules en éliminant les espèces réactives de l'oxygène comme  $H_2$ ,  $O_2^-$ , HO (Latowski *et al.*, 2010 ; Foyer & Noctor, 2011).

# **DEUXIÈME PARTIE : MATÉRIEL ET MÉTHODES**

# 1. ÉTUDE DE L'EMBRYOGENÈSE SOMATIQUE INDIRECTE CHEZ LE COTONNIER

## 1.1. INDUCTION DE CALS CHEZ LE COTONNIER

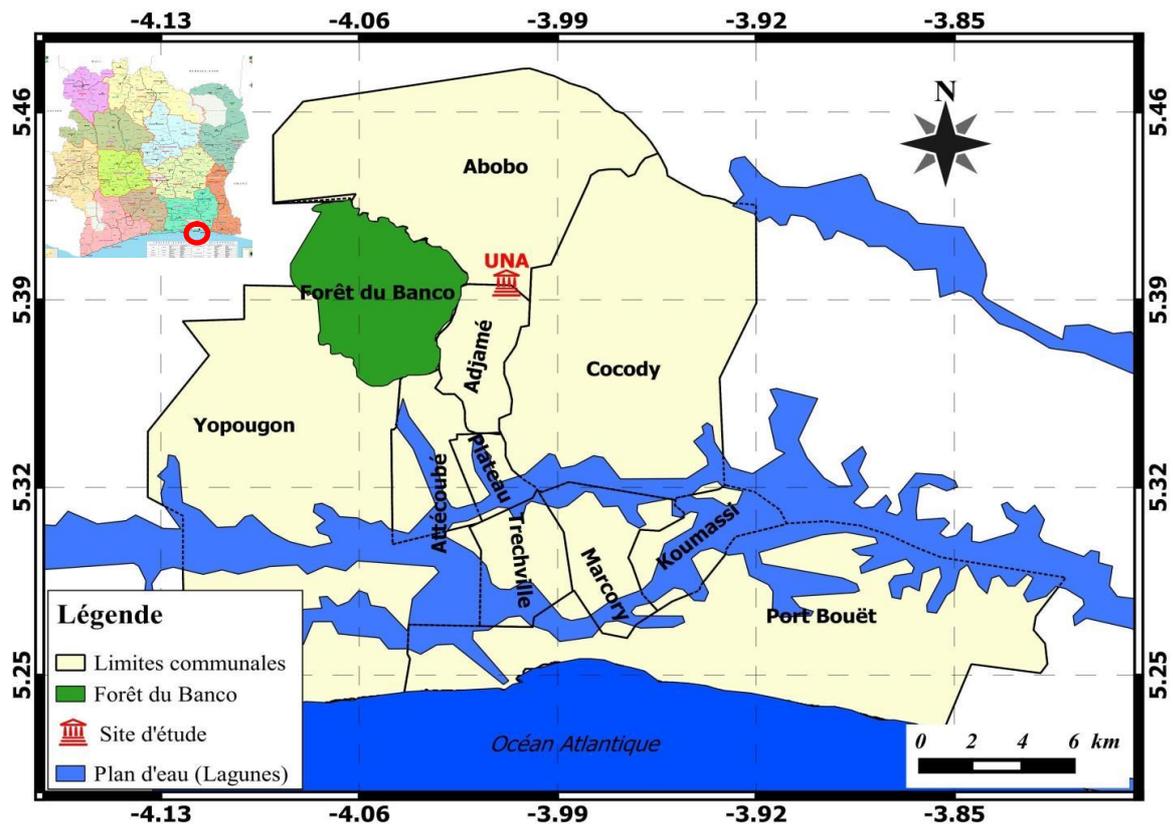
### 1.1.1. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé lors de cette étude est constitué de graines de cotonnier (*Gossypium hirsutum* L.). Ces graines sont issues de la variété Y331B-R5, et ont été fournies par la Compagnie Ivoirienne pour le Développement Textile (CIDT), Korhogo, Côte d'Ivoire.

### 1.1.2. Méthodes

#### 1.1.2.1. Site d'étude

Cette étude a été menée en deux étapes, une partie au laboratoire et l'autre au champ sur la parcelle expérimentale de l'Université Nangui Abrogoua (UNA) à Abidjan (Sud de la Côte d'Ivoire). Cette Université est localisée à l'intersection des communes d'Abobo (au Nord) et d'Adjamé (au Sud). À l'Ouest se trouve la forêt de banco et à l'Est la commune de cocody (Figure 4). Les coordonnées géographiques de ce site sont : 5°17' et 5°31' latitude Nord entre 3°45' et 4°22' de longitude Ouest (Koffi *et al.*, 2009). La relique forestière de cette université contient de nombreuses espèces végétales telles que *Chrysophyllum albidum* G. Don (Sapotaceae), *Synsepalum afzelii* (Engl.) T.D. Penn. (Sapotaceae), *Palisota hirsuta* (Thunb.) K. Schum. (Commelinaceae). Le sol du site est issu de formations sédimentaires, de type ferrallitique (Perraud, 1971). Ces formations sédimentaires présentent une texture argilo-sableuse favorable à la culture cotonnière. La pluviométrie et la température moyenne annuelle sont respectivement de 1642 mm et de 27,16 °C (SODEXAM, 2016).



**Figure 4. Carte administrative du district d'Abidjan situant le site expérimental de l'Université Nangui Abrogoua**

(Source : Koffi *et al.*, 2009)

#### 1.1.2.2. Delintage des graines

Les graines de cotonnier portant des fibres ou duvet ont été placées dans un bocal en verre. Puis, 30 mL d'acide sulfurique concentré ont été ajoutés. À l'aide d'une baguette, l'ensemble est mélangé jusqu'à la disparition totale des fibres. Les graines débarrassées des fibres ont été rincées abondamment à l'eau de robinet. Elles ont ensuite été placées dans un becher en présence d'eau, les graines qui flottent sont éliminées et le reste est séché à l'air libre. Elles constituent les graines de cotonnier qui seront utilisées pour les différentes expérimentations (Figure 5).



**Figure 5. Graines de cotonnier**

A : graines de coton portant les fibres ; B : graines de coton débarrassés des fibres (délintée)

### **1.1.2.3. Préparation des milieux et conditions de culture**

#### **1.1.2.3.1. Milieu de germination de graines**

La germination des graines a été effectuée selon la méthode de Kouakou (2003) sur  $\frac{1}{2}$  le milieu de base de Murashige & Skoog (MS) (1962). Ce milieu a été supplémenté de  $30 \text{ g.L}^{-1}$  de saccharose. Le pH du milieu a été ajusté à 5,8 avec de l'hydroxyde de sodium (NaOH) et/ou du chlorure d'hydrogène (HCl) à 1N. Le milieu de germination a été solidifié par addition de  $2,2 \text{ g.L}^{-1}$  de phytigel puis, porté à ébullition sur une plaque chauffante. Ensuite, le milieu a été transvasé dans des tubes à essai à raison de 30 mL de milieu par tube avant d'être stérilisé à l'autoclave pendant 20 min à  $121 \text{ }^\circ\text{C}$  sous une pression de 1 bar.

#### **1.1.2.3.2. Milieu d'induction de cals**

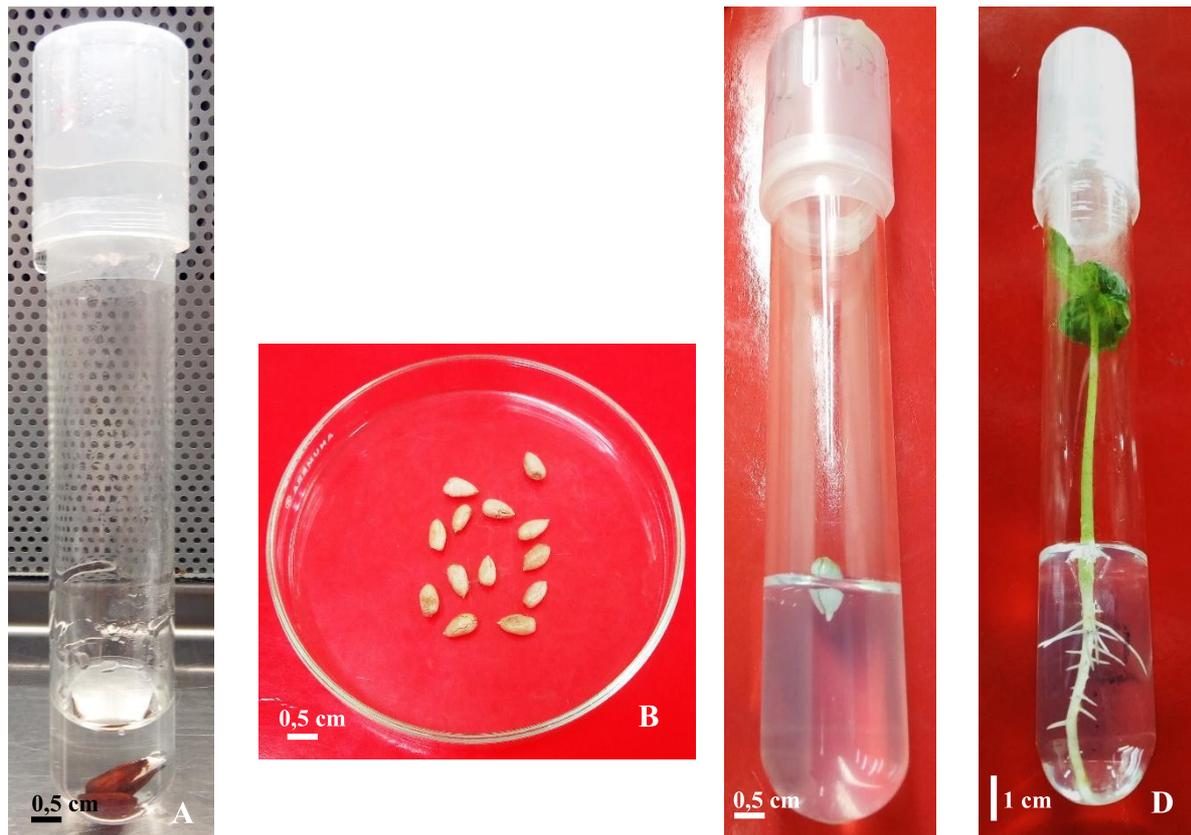
Le milieu Murashige & Skoog, (1962) (MS) a été utilisé comme milieu de base pour l'induction des cals. Il est fréquemment utilisé pour la culture *in vitro* du cotonnier (Trolinder & Goodin, 1962 ; Kouadio *et al.*, 2004 ; Konan, 2015). Ce milieu a été supplémenté de vitamine B5 (Gamborg *et al.*, 1968) et de  $30 \text{ g.L}^{-1}$  de glucose. Le pH a été ajusté à 5,8 avec du NaOH et/ou HCl à 1N. La solidification du milieu a été réalisée par addition de  $2,2 \text{ g.L}^{-1}$  de phytigel. Ensuite, après avoir été porté à ébullition sur une plaque chauffante, le milieu de callogenèse a été transvasé dans des bocaux de dimension  $6 \times 5,5$  (L x  $\varnothing$  en cm). La stérilisation du milieu a été réalisée comme précédemment.

#### **1.1.2.3.4. Conditions de culture**

Les cultures ont été placées dans une chambre de culture sur des étagères à une température de  $28 \pm 2$  °C et une hygrométrie de 70 % (humidité relative). La salle de culture est alimentée par des lampes blanches fluorescentes ayant une intensité lumineuse de 2000 lux, sous une photopériode de 12 h.

#### **1.1.2.4. Désinfection et germination *in vitro* des graines**

La germination des graines de cotonniers a été réalisée selon la méthode de Kouakou, (2003) modifiée. Les graines de cotonnier ont été désinfectées sous une hotte à flux laminaire par un trempage dans de l'alcool à 70 % pendant 1 minute, puis dans de l'hypochlorite de sodium à 2,4 % de chlore actif pendant 30 minutes. Elles ont été rincées trois fois à l'eau distillée stérile pendant 5 minutes. Les graines ont par la suite été imbibées dans des tubes à essai de dimension  $150 \times 22$  (L  $\times$   $\varnothing$  extérieur en mm) contenant 30 mL d'eau distillée stérile à raison d'une graine par tube et placées pendant 48 h à l'obscurité pour ramollir le tégument et stimuler la germination. Passé ce délai, à l'aide d'une pince préalablement stérilisée à l'autoclave, les graines dont les racicules pointent, ont été débarrassées de leurs téguments sous la hotte et mises en culture sur le milieu de germination précédemment préparé (Figure 6). Les tubes à essai contenant les graines ont été fermés, scellés avec du parafilm et incubés à l'obscurité pendant 48 heures dans la chambre de culture pour initier la germination. Puis, les cultures ont été placées dans la chambre de culture sur des étagères, sous 12 h de photopériode pendant sept jours.

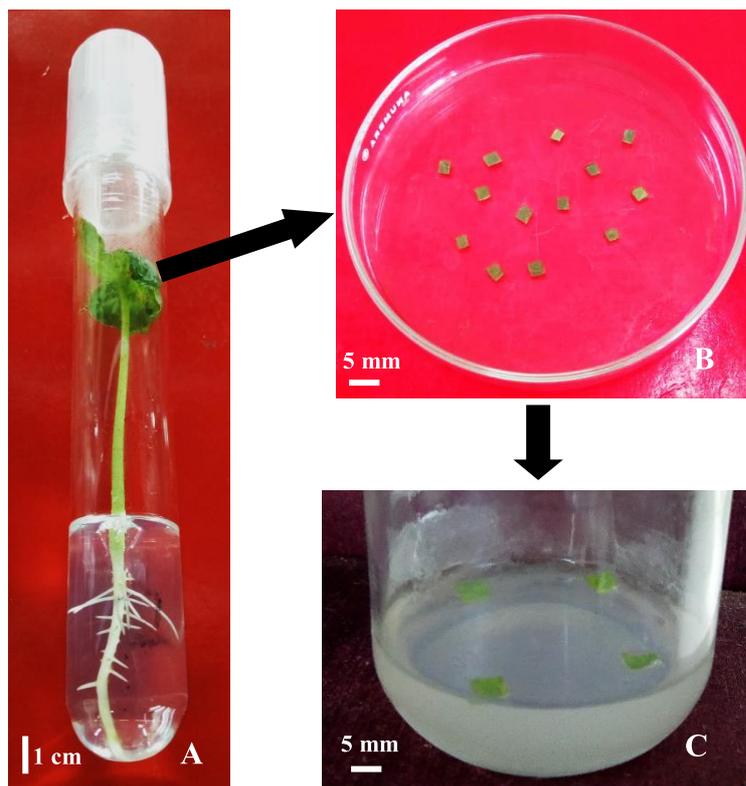


**Figure 6. Étapes de la germination *in vitro* des graines de cotonnier**

A : graine de cotonnier avec la radicule qui pointe après 48 h d'imbibition à l'obscurité; B : graines débarrassées des téguments ; C : graine sur milieu de germination, D : vitroplant de cotonnier âgés de sept jours.

#### **1.1.2.4.1. Induction et prolifération des cals**

Après une semaine de culture, les cotylédons d'environ 5 mm<sup>2</sup> des plantules obtenues dans l'étude précédente ont servi d'explant pour l'induction des cals (Figure 7). L'effet de différents milieux a été testé sur l'induction et la prolifération des cals chez le cotonnier.



**Figure 7. Procédé de culture des cotylédon de cotonnier sur milieu de callogenèse**

A : vitroplant de cotonnier ; B : explants de cotylédon de 5mm<sup>2</sup> dans une boîte de pétri ; C : explant de cotylédon de 5 mm<sup>2</sup> de côté sur le milieu de callogenèse

#### 1.1.2.4.2. Influence des sources de carbone sur la callogenèse

L'effet de quatre sources de carbones a été évalué sur l'induction des cals de cotonnier (Koné, 2003). La concentration des sources de carbone a été fixée à 30 g.L<sup>-1</sup> selon la méthode de Kouakou (2003). Le milieu MSB5 a été utilisé comme milieu de base au cours de cette étude. Il a été supplémenté de 0,1 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-Dichlorophénoxyacétique (2,4-D) et de 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de kinétine (KIN) Zouzou *et al.* (2008). Ensuite, sous une hotte à flux laminaire, les explants cotylédonaires ont été placés sur chacun des milieux testés à raison de quatre explants par bocal. Chaque expérience a été répétée huit fois. Une répétition est constituée par un bocal contenant quatre explants. Au total 32 explants cotylédonaires ont été utilisés. Après ensemencement, les bocaux contenant les explants ont été scellés avec du parafilm puis, incubés pendant quatre semaines dans la vitrothèque. Au terme des quatre semaines de culture, la source de carbone ayant induit les cals les plus friables (qui peuvent facilement se détacher) a été retenue. Puis, l'effet de quatre concentrations (20, 30, 40 et 50 g.L<sup>-1</sup>) de cette source de carbone a été testé sur la callogenèse dans les mêmes conditions que précédemment.

#### **1.1.2.4.3. Influence de la concentration de la meilleure source de carbone sur la callogenèse**

Quatre différentes concentrations (20, 30, 40 et 50 g.L<sup>-1</sup>) de la meilleure source de carbone ont été testées sur l'induction de cals comme précédemment. À l'issue de cette étude, la concentration ayant induit le meilleur taux de callogenèse a été retenue pour la suite des travaux.

#### **1.1.2.4.4. Influence des auxines sur la callogenèse**

Au cours de cette étude, trois auxines le 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D) ; l'acide naphthalène acétique (ANA), et l'acide indole butyrique (AIB) à différentes concentrations (0,1 ; 0,5 ; 1 et 1,5 mg.L<sup>-1</sup>) ont été additionnés au milieu MSB5 supplémenté de la meilleure source de carbone à la meilleure concentration pour induire la callogenèse chez le cotonnier. L'auxine ayant induit le plus grand taux de callogenèse a été retenu pour l'étude avec les cytokinines.

#### **1.1.2.4.5. Influence des cytokinines sur la callogenèse**

Le milieu MSB5 a été utilisé comme milieu de base. À ce milieu, trois cytokinines à savoir le benzylaminopurine (BAP), la kinétine (KIN) et le thidiazuron (TDZ) à différentes concentrations (0,1 ; 0,5 ; 1 et 1,5 mg.L<sup>-1</sup>) testé individuellement ont été supplémentés. Les milieux ont été additionnés de la meilleure source de carbone à la meilleure concentration pour induire la callogenèse.

#### **1.1.2.4.6. Influence des cytokinines en présence de 0,1 mg.L<sup>-1</sup> 2,4-D sur la callogenèse**

L'étude de l'influence des cytokinines en présence de 2,4-D a été effectuée avec les trois cytokinines dont le benzylaminopurine (BAP), la kinetine (KIN) et le thidiazuron (TDZ) à différentes concentrations (0,1 ; 0,5 ; 1 et 1,5 mg.L<sup>-1</sup>). Le milieu MSB5 a servi de milieu de base. Il a été supplémenté de la meilleure concentration de l'auxine et de la source de carbone retenues précédemment. Au bout de quatre semaines de culture, la combinaison hormonale ayant induit les cals les plus friables a été retenu comme meilleur milieu d'induction de cals (MMC) de cette étude.

#### **1.1.2.4.7. Influence du type d'explant sur la callogenèse chez le cotonnier**

Trois types d'explants ont été utilisé dans cette étude : l'hypocotyle (5 mm de long), la racine (5 mm de long) et le cotylédon (5 mm de côté). Chaque type d'explant a été placé sur le meilleur milieu de callogenèse (MMC). Chaque expérience a été répétée huit fois à raison

de quatre explants par bocal et par type d'explant. Au total 32 explants ont été utilisés par type d'explant.

#### **1.1.2.4.8. Influence de l'âge de l'explant sur la callogenèse**

Les vitroplants d'âge différents (quatre, sept, 10, 13 et 16 jours) ont été testés sur la callogenèse comme précédemment (*réf. 1.1.2.4.6*). L'explant ayant induit les meilleurs résultats au cours de l'expérience précédente a été conservée pour la suite des travaux.

#### **1.1.2.4.9. Influence de la taille de l'explant sur la callogenèse chez le cotonnier**

Les travaux portant sur la taille de l'explant ont été effectués avec le meilleur type d'explant retenu précédemment. Ainsi, différentes tailles (2,5 ; 5 ; 10, 12,5 et 15 mm) de cet explant ont été testées sur le meilleur milieu d'induction de cals (MMC).

#### **1.1.2.4.10. Influence de la position de l'explant sur la callogenèse chez le cotonnier**

Le meilleur explant a été sectionné en trois parties différentes que sont la partie basale, la partie médiane, et la partie proximale. Des segments de 5 mm de long ont été sectionnés sur ces différentes parties et mis en culture sur le MMC additionné de 0,75 g.L<sup>-1</sup> de chlorure de magnésium (MgCl<sub>2</sub>).

#### **1.1.2.4.11. Influence des anti-oxydants sur la callogenèse**

La culture de tissus *in vitro* du cotonnier entraîne une accumulation des composés phénoliques qui par la suite brunissent les milieux et parfois les tissus. Ainsi, afin de réduire le brunissement des cals, trois anti-oxydants ont été supplémentés au milieu de culture. L'étude des anti-oxydants a été réalisé selon la méthode El-Yacoubi *et al.* (2010) modifié et adapté à notre matériel végétal. Pour ce faire, chlorure de magnésium (MgCl<sub>2</sub>), l'acide ascorbique (Ac Asc) et la cystéine (Cyst) ont été ajouté au meilleur milieu de callogenèse (MMC) à différentes concentrations (0,25 ; 0,75 et 1 g.L<sup>-1</sup>) pour tester leur effet sur la callogenèse.

#### **1.1.2.4.12. Étude du taux de prolifération (TProl)**

Après quatre semaines de culture, les cals sains et sans nécroses ont été repiqués sur milieu de callogenèse neuf avec des subcultures mensuelles (S1, S2 et S3). Ces subcultures permettent aux cals de continuer leur croissance. Les cals ont été pesés après chaque subculture et le taux de prolifération (%) a été déterminé.

#### 1.1.2.4.13. Évaluation de la callogénèse

La callogénèse a été évaluée après quatre semaines de culture. Plusieurs paramètres ont été évalués :

##### ➤ Temps de débourrement des explants

Le temps de débourrement est le temps mis par les explants (cellules différenciés) depuis la mise en culture sur le milieu de callogénèse pour entamer leur dédifférenciation (cellules indifférenciées). Il est noté TD et s'exprime en nombre de jours (j).

##### ➤ Taux d'induction des cals

L'évaluation de la callogénèse a été effectuée par le calcul du taux d'induction des cals (TI). Ce qui correspond au nombre d'explants ayant induit des cals (NEC) sur le nombre total d'explants mis (NTE) sur le milieu de callogénèse, multiplié par 100.

$$TI = \frac{NEC}{NTE} \times 100$$

TI : Taux Induction des cals

NEC : Nombre d'Explant ayant induit des Cals

NTE : Nombre Total d'Explants mis en culture

##### ➤ Poids des cals frais et secs

Le poids des cals frais (PF) formés a été déterminé en séparant le cal de l'explant, puis en pesant à l'aide d'une balance « Mettler Toledo » de précision  $10^{-4}$  g. Puis, les cals frais ont été placés à l'étuve à 60 °C et pesés régulièrement jusqu'à l'obtention d'un poids constant correspondant au poids des cals secs (PS).

##### ➤ Taux de prolifération de cals

- $T_{Prol} = \frac{m - m_0}{m_0} \times 100$

T<sub>Prol</sub> = taux de prolifération des cals

m<sub>0</sub> = masse des cals avant la culture

m = masse des cals après quatre semaines de culture

### ➤ **Texture et couleur des cals**

La texture est l'aspect des cals au toucher. Cet aspect varie selon le matériel végétal et aussi selon les milieux de culture. Ainsi, les cals peuvent être très friables, friables, peu friables ou parfois compacts. La couleur des cals a été observée à l'œil nu.

#### **1.1.2.5. Analyses statistiques**

L'effet de quatre sources de carbones (glucose, fructose, saccharose et maltose), des régulateurs de croissance, des antioxydants et de l'explant a été évalué à travers le taux d'induction, les poids de matière fraîche et sèche, le taux de prolifération, la texture, et la couleur des cals après chaque expérience réalisée. Les valeurs exprimées en pourcentage ont été soumises à une transformation angulaire arcsin ( $\sqrt{x}$ ) avant l'analyse. Les analyses statistiques ont été effectuées avec le logiciel Statistica 7.1. Des analyses de variances (ANOVA) à un critère de classification (sucres et concentration de sucre) et à deux critères de classification (hormones et antioxydants) ont été effectuées sur les valeurs moyennes des paramètres étudiés. Lorsqu'une différence significative a été observée, le test de Newman-Keuls au seuil de 5 % a été utilisé pour séparer les moyennes.

## **1.2. INDUCTION D'EMBRYON CHEZ LE COTONNIER**

### **1.2.1. Matériel végétal**

Le matériel végétal utilisé au cours de cette étude a été constitué de cals provenant de la première étude. Ces cals sains ont été nommés A.

### **1.2.2. Méthodes**

#### **1.2.2.1. Induction de cellules embryogènes**

L'induction d'embryons somatique a été réalisée en deux étapes. Dans un premier temps, deux subcultures de quatre semaines chacune ont été réalisées sur le meilleur milieu de callogenèse (MMC) pour sélectionner les cellules viables. Les cals friables obtenus (B1) ont été placés sur milieu d'induction d'embryon (MIE) pendant quatre semaines avec renouvellement du milieu chaque deux semaines. Le MIE est constitué du milieu MS additionné de vitamine B5 (MSB5) dans lequel la composition des macroéléments a été modifiée par le retrait du Nitrate d'ammonium ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) et le dédoublement de la concentration du Nitrate de potassium ( $\text{KNO}_3$ ) (Trolinder & Goodin, 1988 ; Kumar *et al.*, 2013). L'induction d'embryon a été réalisée selon la méthode de Kouadio (2018). Environ 1000 mg de cals friables et sans nécrose ont été pesés dans des tubes à centrifuger stériles sous une hotte. Les cals ont été mis en culture dans des bocaux contenant 30 mL de MIE à raison de deux explants par bocal. Les bocaux contenant les explants ont été fermés, scellés avec du parafilm, puis incubés dans la chambre de culture. La salle de culture est thermo-régulée ( $28 \pm 2$  °C) sous une photopériode de 12 h, avec un éclairage de 2000 lux fourni par des lampes blanches fluorescentes. Après quatre semaines de culture, la présence d'indices de structures embryogènes ou proembryons a été recherchée. Les proembryons sont représentés par des cellules arrondis, à paroi épaisse, avec des contours réguliers, et un cytoplasme dense (Nomura & Koumamine, 1995). Ensuite, un test de viabilité des proembryons a été réalisé avec une solution de bleu de trypan à 0,2 %.

##### **1.2.2.1.1. Influence de la source de carbone sur l'induction de cellules embryogènes**

Le milieu utilisé pour cette étude est le milieu MIE auquel, quatre sources de carbone le glucose, le fructose, le maltose, et le saccharose ( $30 \text{ g.L}^{-1}$ ) ont été additionnés séparément. Aucune hormone de croissance n'a été ajoutée au milieu de culture. Un milieu témoin a été préparé avec les macros et les microéléments sans aucune source de carbone. La source de carbone ayant induit le plus grand nombre d'embryons a été retenu.

#### **1.2.2.1.2. Influence de la concentration de la source de carbone**

Quatre concentrations (20, 30, 40 et 50 g.L<sup>-1</sup>) de la meilleure source de carbone ont été ajoutées au milieu MIE pour tester leur influence sur l'embryogenèse somatique. Ces différents milieux ont été nommés G20, G30, G40 et G50 respectivement pour 20, 30, 40 et 50 g.L<sup>-1</sup> de source de carbone. Les milieux ont été préparés comme précédemment décrit. La concentration de la meilleure source de carbone, ayant induit le plus fort taux d'embryons a été retenu.

#### **1.2.2.1.3. Influence du régime hormonal sur l'induction de structures embryogènes**

La préparation du milieu a été effectuée avec le milieu MIE. Les milieux ont été supplémentés de la meilleure concentration de la source de carbone et de différentes combinaisons hormonales indiquées comme suit :

H<sub>1</sub> : MIE + 2 mg.L<sup>-1</sup> ANA + 0,5 mg.L<sup>-1</sup> KIN

H<sub>2</sub> : MIE + 2 mg.L<sup>-1</sup> ANA + 0,1 mg.L<sup>-1</sup> 2,4-D

H<sub>3</sub> : MIE + 0,1 mg.L<sup>-1</sup> 2,4-D + 0,5 mg.L<sup>-1</sup> KIN

H<sub>4</sub> : MIE + 0,1 mg.L<sup>-1</sup> 2,4-D + 0,5 mg.L<sup>-1</sup> KIN + 0,1 Zéatine

H<sub>5</sub> : MIE + 0,1 mg.L<sup>-1</sup> AIA + 0,1 mg.L<sup>-1</sup> 2,4-D

Un test témoin a été réalisé sans aucune hormone.

#### **1.2.2.1.4. Influence des acides aminés sur l'induction de cellules embryogènes**

L'effet des acides aminés sur l'induction de cellules embryogènes a été testé sur le même milieu de base que précédemment sans hormone et additionné de la meilleure concentration de la source de carbone (MIE<sub>2</sub>). Le milieu MIE<sub>2</sub> a été supplémenté de la glutamine, de l'asparagine, de l'hydrolysate de caséine, et de la glycine seul ou en combinaison afin d'induire des embryons. Dans le test témoins, aucun acide aminé n'a été ajouté. Les différents acides aminés ont été ajoutés au milieu de culture comme suit :

Aa<sub>1</sub> : MIE<sub>2</sub> + 0,5 mg.L<sup>-1</sup> glutamine

Aa<sub>2</sub> : MIE<sub>2</sub> + 0,5 mg.L<sup>-1</sup> glutamine + 0,2 mg.L<sup>-1</sup> asparagine

Aa<sub>3</sub> : MIE<sub>2</sub> + 0,5 mg.L<sup>-1</sup> glutamine + 0,2 mg.L<sup>-1</sup> hydrolysate de caséine

Aa<sub>4</sub> : MIE<sub>2</sub> + 0,5 mg.L<sup>-1</sup> glutamine + 0,2 mg.L<sup>-1</sup> asparagine + 2 mg.L<sup>-1</sup> glycine

Aa<sub>5</sub> : MIE<sub>2</sub> + 0,5 mg.L<sup>-1</sup> glutamine + 0,2 mg.L<sup>-1</sup> hydrolysate de caséine + 2 mg.L<sup>-1</sup> glycine

### **1.2.2.1.5. Effet comparative de l'influence de la composition du milieu de culture sur l'induction de cellules embryogènes**

Au niveau des différents paramètres étudiés, le milieu permettant d'obtenir les meilleures inductions d'embryon somatique ont été retenues. Ensuite, une analyse comparative de ces milieux a été effectuée afin de voir leur influence sur l'induction de structure embryogène. Ainsi, les cals friables ont été placés à nouveau sur les milieux MIE + 30 g.L<sup>-1</sup> de glucose (G30), MIE + 30 g.L<sup>-1</sup> de glucose + 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de glutamine (Aa<sub>1</sub>) et le milieu MIE + 30 g.L<sup>-1</sup> de glucose + 0,1 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D + 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de KIN (H<sub>3</sub>). Les cultures ont été conservées dans la salle de culture dans les mêmes conditions pendant quatre semaines.

### **1.2.2.2. Observations microscopiques des cellules embryogènes**

Après quatre semaines de culture, les structures embryogènes ont été observées pour chaque traitement effectué. L'observation microscopique des structures embryogènes a été faite à l'aide du microscope optique DC5.5V/200 mA Lamp : LED (white). Pour ce faire, 0,2 g de cals issus des milieux d'induction d'embryon a été prélevée dans chaque bocal et placée dans un tube à essai contenant 5 mL d'eau distillée. L'ensemble a été homogénéisé à l'aide d'un vortex. L'observation microscopique a été réalisée avec une goutte de cette solution montée entre lame et lamelle. Les observations microscopiques ont été faites au grossissement 400 (Gx400). Au cours de ces observations, la forme des structures embryogènes (allongé, ronde, ovale), ainsi que leur consistance (cytoplasme dense ou aéré) ont été recherchées. Au total, huit observations ont été réalisées pour cette caractérisation morphologique pour chaque traitement.

### **1.2.2.3. Étude de la viabilité des structures embryogènes**

#### **1.2.2.3.1. Coloration des cellules**

La coloration des cellules a été réalisée avec une solution de bleu de trypan (0,2 %) selon la méthode de Sumantran (2011). Il s'agit d'une méthode de comptage par exclusion mettant en évidence exclusivement les cellules mortes dont les membranes plasmiques sont perméables à ce colorant contrairement aux cellules vivantes qui le repousse. Elle permet d'apprécier la viabilité des cellules en colorant les cellules mortes en bleu. Pour la coloration, 5 mg de cals embryogènes ont été pesés et placés dans 5 mL d'eau distillée. La solution a d'abord été délicatement agitée pour obtenir une solution homogène. Ensuite, 5 mL de la solution de bleu de trypan à 0,2 % ont été ajoutés à la suspension obtenue. Le mélange obtenu

a été homogénéisé à l'aide d'un vortex et incubé pendant 5 minutes. Après trois rinçages successifs à l'eau distillée sur papier filtre, une pincette de cal a été montée dans une goutte d'eau distillée entre lame et lamelle. Les observations ont été réalisées au moyen du microscope DC5.5V/200 mA, au grossissement (Gx400).

Chaque expérience a été répétée huit fois et les cellules viables ont été dénombrées. Les cellules colorées en bleu sont les cellules mortes et celles qui ne sont pas colorées en bleu sont vivantes.

#### **1.2.2.3.2. Maturation et germination des embryons.**

Après l'induction d'embryons, ceux portant des nodules ont été repiqués sur le meilleur milieu d'induction d'embryon pendant quatre semaines à l'obscurité afin de provoquer la maturation des embryons. À la fin de la maturation, les embryons ont été transférés sur milieu neuf pendant quatre autres semaines pour initier leur germination. Pour chaque test, une subculture a été réalisée chaque deux semaines sur un nouveau milieu d'induction d'embryon.

#### **1.2.2.3.3. Évaluation de l'embryogenèse somatique**

L'embryogenèse somatique a été évaluée en dénombrant les cellules embryogènes au microscope selon la méthode de Duval *et al.* (2005). Le taux d'induction de cellules embryogènes (TICE) a été évalué :

$$\text{TICE} = \frac{\text{NCE}}{\text{NTC}} \times 100$$

TICE : Taux d'Induction de Cellule Embryogènes  
NCE : Nombre de Cellule Embryogène  
NTC : Nombre Total de Cellule observé

L'index embryogénique (IE) qui correspond au taux d'induction de cellules embryogènes divisé par 100.

Le Nombre de Cellules Viables (NCV) et le Nombre de Cellules Non Viables (NCNV) a été dénombré. Le dénombrement se fait par comptage après la coloration au bleu de trypan sur une larve de Malassez.

#### **1.2.2.4. Analyses statistiques**

L'effet des différents milieux de cultures testés sur l'induction de cellules embryogènes a été évalué à travers le taux d'induction, le nombre de cellules viables et non viables des cellules embryogènes. Les taux exprimés en pourcentage ont été soumis à une transformation angulaire arcsin ( $\sqrt{x}$ ) avant l'analyse. Les analyses statistiques ont été réalisées

avec le logiciel Statistica 7.1. Des analyses de variances à un et à deux critères de classification ont été effectuées sur les valeurs moyennes des paramètres mesurés. Lorsqu'une différence significative a été révélée entre deux moyennes, le test de Newman-Keuls au seuil de 5 % a été utilisé pour classer les moyennes.

## **2. ÉTUDE DE QUELQUES COMPOSÉS BIOCHIMIQUES INTERVENANT DANS LE PROCESSUS DE L'EMBRYOGENÈSE SOMATIQUE**

### **2.1. Matériel et méthodes**

#### **2.1.1. Matériel végétal**

Le matériel végétal utilisé au cours de cette étude a été constitué des cals embryogènes et non embryogènes issus des études précédentes.

#### **2.1.2. Méthodes**

##### **2.1.2.1. Extraction et dosage des composés phénoliques**

L'extraction des composés phénoliques a été réalisée selon la méthode de Kouakou *et al.* (2009). Un échantillon de 500 mg de cals embryogènes et non embryogènes ont été placé dans 10 mL de méthanol pure (96 %). L'ensemble a été incubé à l'obscurité pendant 18 h temps nécessaire pour l'extraction des composés phénoliques à 4 °C. Après une centrifugation à 2000 tours/min pendant 10 min, le surnageant a constitué l'extrait phénolique (EP) brut à analyser.

Le dosage des composés phénoliques a été réalisé selon la méthode de Singh. (2000). Ainsi, 0,5 mL du réactif de Folin-Ciocateu à 0,5 N ont été ajoutés à 0,9 mL d'eau distillée. Le tout a été additionné de 0,1 mL d'extrait phénolique. Après agitation à la température ambiante, 1,5 mL de carbonate de sodium à 17 % et 6 mL d'eau distillée ont été ajoutés à la solution. Les mélanges obtenus ont été incubés pendant 35 minutes. L'intensité de la coloration proportionnelle à la concentration en polyphénols a été suivie au spectrophotomètre à 765 nm. Lors du dosage, un témoin a été réalisé et l'extrait phénolique a été remplacé par de l'eau distillée. Le taux de phénols totaux est déterminé à l'aide d'une courbe étalon ( $y = 0,586x + 0,053$  ;  $R^2 = 0,999$  où  $y$  est l'absorbance et  $x$  est la concentration de l'acide gallique) réalisée avec différentes concentrations d'une solution mère d'acide gallique (200 µg/mL). Les teneurs en phénols ont été exprimées en microgramme par gramme de matière fraîche (µg/g de MF).

### **2.1.2.1.1. Étude des composés par Chromatographie Liquide Ultra Haute Performance (UHPLC)**

Cette étude est très importante car les modifications biochimiques qui apparaissent pourraient être corrélées à une augmentation du "pool" des composés solubles et à une dégradation enzymatique de certains composés. Au cours de cette étude, nous avons fait une étude qualitative des composés phénoliques, suivie l'évolution de l'activité de deux enzymes de biosynthèse (PAL, TAL), de deux enzymes de dégradations (PPO, GPx) et de deux enzymes anti-oxydantes (Cat, APx).

#### **- Extraction et purification des composés phénoliques**

L'extraction des composés a été réalisée suivant la méthode de Rodriguez-Delgado *et al.* (2001) modifiée par Kouakou *et al.* (2009). À cet effet, 100 mg de cals lyophilisés ont été placés dans un tube contenant 10 mL de méthanol 96 %. Le mélange a d'abord été placé à 4 °C pendant 12 h. Après une sonication de 5 min dans l'ultrason (FAME, Emmi-12HC), le mélange a été centrifugé à 5000 tours/min (centrifugeuse Sigma 3-18KS) pendant 10 min. Ensuite, 4 mL du surnageant ont été évaporés au Speed Vac (Savant, USA). Le résidu sec obtenu a été dissout dans 1 mL de méthanol 30 % (v/v) puis placé sur une mini-colonne de silice greffée C18 (Sep pack®; Macherey-Nagel, Düren, German) dans le système de recharge appelé Supelco Visiprep™. Les mini-colonnes de silice ont été au préalable équilibrées par un lavage successif au méthanol 100 % (2 mL), puis au méthanol 50 % (2 mL) et enfin à l'eau distillée (6 mL). Après dépôt de l'extrait méthanolique, un lavage avec 2 mL d'eau distillée a été effectué puis les composés phénoliques ont été élués avec 4 mL de méthanol 90 % (v/v). L'éluat obtenu a été évaporé au Speed Vac et le résidu sec obtenu a été repris dans 1 mL de méthanol 50 % (v/v) puis filtré à travers une membrane millipore (0,22 µm). L'extrait hydrométhanolique obtenu constitue l'extrait purifié de composés phénoliques (composés phénolique purifiés).

#### **- Conditions d'analyse**

Les analyses ont été réalisées selon la méthode de Verdu (2013) à l'aide du système Chromatographie Liquide Ultra Haute Performance (UHPLC) (agilent 1100 séries UV-Visible UHPLC Système, Germany). Il s'agit d'une technique dotée d'une ultra sensibilité qui permet une analyse plus fine, en raison de sa haute résolution, de son excellente reproductibilité et de l'exactitude de sa quantification. C'est une technique utilisée pour la séparation et la quantification des différents composés phénoliques. Une partie aliquote de la solution méthanolique est injectée en Chromatographie Liquide Ultra Haute Performance (UHPLC). L'analyse des échantillons a été réalisée sur deux chaînes UHPLC couplées; la

première chaîne est de type Agilent LC (1100 series, UV-Visible UHPLC System, Germany), équipée d'un dégazeur (G1322A), d'un injecteur automatique, d'une pompe binaire à haute pression et d'un compartiment de colonne thermique (G1316A). La deuxième chaîne est de type Agilent série LC 1200 et comprend une pompe quaternaire (G1311A) qui est reliée à un détecteur à barrette d'iode (G1315A). L'UHPLC est piloté par un ordinateur d'exploitation WinXPSP3 et la visualisation des chromatogrammes est gérée par le logiciel de chromatographie. Elle a permis de purifier et de mettre en évidence la structure des composés phénoliques isolés. Tout le système UHPLC est enfin couplé à un spectromètre de résonance magnétique nucléaire (RMN) (Bruker Avance III) dont la fréquence de fonctionnement est de 600 MHz pour un proton. La séparation est effectuée sur une colonne de silice C18 Agilent analytique (Zorbax Eclipse XDB-C18, 150 x 2,1 mm : 1,8 µm). L'élution a été réalisée avec un gradient binaire composé d'un :

- solvant A : eau purifiée acidifiée par l'acide trifluoroacétique (TFA) (99,90/0,10 ; v/v)
- solvant B : acétonitrile 100 %.

La détection des chromatogrammes a été réalisée à 280 nm, avec un débit de 0,8 mL/min. Les composés phénoliques utilisés comme témoins dans cette étude ont été sélectionnés en fonction de leur disponibilité dans le commerce et de leur présence éventuelle chez le cotonnier. La numérotation de ces composés phénoliques a été faite de façon aléatoire, et se présente comme suit : acide ellagique, acide gallique, acide gentisique, acide 3-hydroxybenzoïque, acide 4-hydroxybenzoïque, acide protocatéchique, acide salicylique, acide syringique, acide vanillique, acide vératrique, acide caféique, acide férulique, acide *o*-coumarique, acide *p*-coumarique, acide sinapique, acide *E*-cinnamique, acide *E*-2-méthoxycinnamique, Kaempférol, catéchine, épicatechine, génistéine, naringénine, quercétine, quercitrine, rutine, *E*-resvératrol, picéatannol et ptérostilbène.

#### - **Séparation et identification des composés phénoliques**

La séparation des composés phénoliques a été réalisée sous une pression de 550 à 1000 bars. L'extrait hydrométhanolique a été dilué avec de l'eau distillée filtrée (50/50, v/v). Environ 10 µL de filtrat ont été directement injectés en UHPLC avec un débit de 1,3 mL/min et la détection des chromatogrammes a été faite à 280 nm.

Une bibliothèque de référence de composés phénoliques a été préalablement réalisée avec des composés purifiés ou disponibles dans le commerce et identifiés par résonance magnétique nucléaire (RMN). Cette banque contient les temps de rétention et les spectres RMN de ces composés. Le temps de rétentions et/ou les spectres RMN des chromatogrammes ont été ensuite comparés à ceux de la bibliothèque de références pour leur identification.

### **2.1.2.2. Extraction et dosage des sucres totaux**

L'extraction des sucres totaux a été réalisée comme précédemment (extraction des composés phénoliques). Le dosage des sucres totaux a été réalisé selon la méthode de Dubois (1956) modifiée et adaptée à notre matériel végétal. Une solution de 1 mL d'acide sulfurique concentré ( $H_2SO_4$ ) a permis de rompre les liaisons osidiques entre le D-glucose et le D-fructose mettant en solution tous les sucres présents qui ont été par la suite révélés par le phénol. Pour le dosage, 0,2 mL de phénol 5 % et 0,2 mL d'extrait brute (E.B) ont été prélevés et placés dans un tube à essai. Le mélange réactionnel a été complété à 1 mL avec de l'eau distillée auquel 1 mL d'acide sulfurique concentré (97 %) a été ajouté. La solution a été incubée pendant 5 min au bain bouillant, puis refroidie à l'obscurité pendant 30 min. L'intensité de la coloration produite par la réaction a été mesurée au spectrophotomètre (Shimadzu Spectrophotometer UV-120-02, Kyoto, Japon) à la longueur d'onde de 490 nm contre un témoin ne contenant pas de sucre. La densité optique a été convertie en quantité de sucres totaux ( $\mu g/g$  de cals frais) grâce à une droite d'étalonnage (0,01 à 0,1 mg/mL) construite à partir d'une solution de glucose (1mg/mL).

### **2.1.2.3. Extraction et dosage des protéines**

L'extraction et le dosage des protéines ont été réalisés selon la méthode de Bradford (1976). Cette méthode a été modifiée et adaptée à notre matériel végétal. L'extraction des protéines a été réalisée à froid (4 °C). À cet effet, 0,5 g de cals frais ont été broyés en présence de 0,05 g de PVP. Le broyage a été réalisé en présence de 10 mL de solution tampon phosphate de sodium 0,1 M pH (7,8). Le broyat ainsi obtenu a été centrifugé à 5000 tours/min pendant 20 min, et le surnageant obtenu constitue l'extrait brut.

Le dosage des protéines a été réalisé avec 5,1 mL de milieu réactionnel. Ce milieu contient 0,1 mL d'extrait brut et 5 mL de solution de bleu de Coomassie (réactif). La préparation de la solution de bleu de Coomassie a été réalisée selon la méthode suivante : 0,2 g de bleu de Coomassie à dissoudre dans 10 mL d'éthanol 95 % auquel 20 mL d'acide orthophosphorique ont été ajoutés, puis le volume final a été ajusté à 200 mL avec de l'eau distillée. Le mélange réactionnel a été incubé dans un bain de glace à l'obscurité pendant 30 min. Ensuite, la teneur en protéine a été suivie au spectrophotomètre à 595 nm. Dans le tube témoin, l'extrait a été remplacé par le tampon phosphate. La solution de Sérum Albumine Bovin (SAB) (250  $\mu g/mL$ ) a servi de solution de protéine de référence. Le taux de protéine a

été déterminé à l'aide de la courbe d'étalon, et a été exprimée en microgramme par gramme de matière fraîche ( $\mu\text{g/g}$  de cals frais).

#### **2.1.2.4. Extraction et purification des enzymes**

L'extraction des enzymes a été réalisée selon la méthode de Kouakou (2003) à froid (4 °C) afin de ralentir l'activité enzymatique. Ainsi, 500 mg de cals frais ont été broyés dans 5 mL du tampon phosphate 0,1 M en présence de 0,05 g de PVP. Ce qui permet de fixer les composés phénoliques sur des substrats. Au cours du broyat, 0,1 mL d'une solution composée de 5 % de polyéthylèneglycol 6000 (PEG 6000) est utilisée pour fixer les polyphénols, de 0,25 % de thiosulfate de sodium afin de protéger les sites enzymatiques, de 15 % de glycérol pour la stabilité des systèmes enzymatiques, de l'EDTA 1 mM pour éviter l'action inhibitrice des ions métalliques, et enfin de 15 mM de mercaptoéthanol comme composés réducteurs pour prévenir les oxydations enzymatiques. Après centrifugation, à 5000 tours/min pendant 20 min, le surnageant obtenu a constitué l'extrait brut d'enzymes.

La purification des extraits enzymatiques a lieu sur le DOWEX. Le Dowex est une résine échangeuse d'ion qui capte les particules de charges positives. La plupart des inhibiteurs des enzymes que nous voulons doser, sont de nature ionique. Le DOWEX est homogénéisé dans l'extrait enzymatique. Après une incubation de 30 min au froid, on effectue une centrifugation à 5000 trs/min pendant 10 min. Le surnageant constitue l'extrait enzymatique purifié.

##### **2.1.2.4.1. Dosage des polyphénoloxydases**

Le dosage des polyphénoloxydase (PPO) a été réalisé selon la méthode de Zhou *et al.* (2003) modifiée et adaptée à notre matériel végétal. Lors du dosage, un volume réactionnel de 3 mL composé de 0,2 mL d'extrait enzymatique, de 1 mL de Pyrocatechol, et de 1,8 mL de tampon phosphate citrate 0,1 M pH 6,5 a été utilisé. L'oxydation du Pyrocatechol a été suivie au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 500 nm. L'activité des PPO a été exprimée en activité enzymatique par gramme de matière fraîche (nkat/min/g de cal frais) en considérant que le coefficient d'extinction molaire du produit formé est égal à  $1400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

##### **2.1.2.4.2. Dosage des peroxydases**

L'activité de la gaïacol peroxydasique (GPx) a été réalisée selon la méthode de Santimone (1973) modifiée et adaptée à notre matériel végétal. Le phosphate de sodium (0,1 M) au pH de 7,5 a été utilisé comme tampon phosphate. Lors du dosage, 0,1 mL de l'extrait

enzymatique a été prélevé et mis dans des tubes à essai. À cet extrait, 2,9 mL d'un substrat composé d'une solution de gaïacol  $10^{-2}$  M et d'eau oxygénée ( $H_2O_2$ )  $10^{-2}$  M (v/v) ont été ajoutées. Le mélange réactionnel a été agité, puis incubé à l'obscurité pendant 10 min. Dans cette expérience, l'incubation des échantillons à l'obscurité empêche la destruction partielle par la lumière des produits d'oxydation formés par le gaïacol en présence de l'eau oxygénée. Lors de l'addition de l'extrait enzymatique au substrat, une minute d'intervalle a été laissée entre chaque tube. L'oxydation du gaïacol a été suivie au spectrophotomètre à 470 nm et a été exprimée en activité enzymatique par gramme de matière fraîche (nkat/min/g de cal frais). Un témoin a été réalisé dans lequel le substrat a été remplacé par le tampon phosphate de sodium 0,1 M pH 7,5.

#### **2.1.2.4.3. Dosage de la phénylalanine ammonia-lyase et de la tyrosine ammonia-lyase**

Le dosage de la phénylalanine ammonia-lyase (PAL) et de la tyrosine ammonia-lyase (TAL) a été réalisé selon la méthode de Regnier (1994) modifiée et adaptée à notre matériel végétal. Le tampon de base utilisé a été le borate de sodium 0,2 M à pH 8,8. Le dosage a été réalisé avec 0,1 mL d'extrait enzymatique, 1 mL de phénylalanine 0,1 M pour la PAL, 1 mL de tyrosine 0,1 M pour la TAL et 1,9 mL de tampon borate de sodium 0,2 M. Le mélange réactionnel a été incubé à la température ambiante pendant 30 min et l'activité de la PAL et de la TAL a été suivie au spectrophotomètre à 290 nm. Cette activité est directement proportionnelle à la quantité d'acide cinnamique et d'acide p-coumarique formé.

Les activités de la PAL et de la TAL ont été exprimées en activité enzymatique par gramme de matières fraîches (nkat/min/g de cal frais), en considérant que le coefficient d'extinction molaire de l'acide cinnamique formé est égal à  $19600\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$  et celui de l'acide p-coumarique est égal à  $17600\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ .

#### **2.1.2.4.4. Dosage de l'ascorbate peroxydase et de la catalase**

L'extraction de la catalase et de l'ascorbate peroxydase a été effectuées comme précédemment. L'activité de la catalase et celle de l'ascorbate peroxydase a été déterminées selon la méthode de Zhou *et al.* (2003). Celle-ci a été modifiée et adaptée à notre matériel végétal. Le dosage de l'ascorbate peroxydase a été réalisé avec 3 mL de volume réactionnel comprenant 0,1 mL d'extrait enzymatique et 2,9 mL de solution ascorbique. L'activité de l'ascorbate peroxydase a été suivie au spectrophotomètre à 290 nm contre un blanc réalisé avec le tampon tris-HCL. L'activité a été exprimée en nkat/min/ g de matière fraîche.

Le dosage de la catalase a été réalisé avec le même milieu réactionnel dont 0,1 mL d'extrait enzymatique, 1 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, et 1,9 mL de tampon Tris-HCl. Un essai témoin a été réalisé où le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a été remplacé par le tampon Tris-HCl. L'activité de la catalase a été suivie au spectrophotomètre à 240 nm et exprimée en nkat/min/ g de matière fraîche. Le coefficient d'extinction molaire du produit formé à la longueur d'onde de 240 nm est égal à  $36.10^{-6} \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

#### **2.1.2.5. Analyses statistiques**

Les teneurs en phénols totaux, protéines, sucres totaux et en substances enzymatiques (polyphénoloxydase, peroxydase, phénylalanine ammonia-lyase, tyrosine ammonia-lyase, ascorbate peroxydase et catalase) ont été évaluées dans les calcs embryogènes et non embryogènes de cotonnier. Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel Statistica 7.1. Des analyses de variances à un critère de classification ont été effectuées sur les moyennes des différents paramètres. En cas de différence significative entre deux moyennes, le test de Newman-Keuls au seuil de 5 % a été utilisé pour le classement des moyennes.

### 3. MICROPROPAGATION CHEZ LE COTONNIER

#### 3.1. Matériel et méthodes

##### 3.1.1. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé lors de cette étude a été constitué de bourgeons terminaux de vitroplants de cotonnier âgés de 15 jours et d'embryons issus de la graine imbibée.

##### 3.1.2. Méthodes

###### 3.1.2.1. Préparation des milieux de culture

###### 3.1.2.1.1. Milieu de germination

L'initiation des pousses a été effectuée sur le milieu base Murashige & Skoog (MS) (1962) additionnées de 30 g.L<sup>-1</sup> de saccharose. Le milieu de germination a été préparé dans les mêmes conditions que précédemment (*réf. induction de cals*).

###### 3.1.2.1.2. Influence du benzylaminopurine (BAP) et de la Kinétine (KIN) sur l'induction de bourgeon

La préparation du milieu d'induction de bourgeon (MIB) a été réalisée à partir du milieu Murashige et Skoog (1962) (MS) supplémenté des vitamines MS. Ce milieu est couramment utilisé pour la multiplication végétative chez le cotonnier (Saeed *et al.*, 2004 ; Khatoon *et al.*, 2014). Le milieu a été additionné de 30 g.L<sup>-1</sup> de saccharose, de 0,75 g.L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>. Ensuite, la BAP et la KIN ont été ajoutés aux milieux MIB seul ou en combinaison à concentration égale (Tableau III). Les bourgeons terminaux des vitroplants âgés de 15 jours et des embryons immatures prélevés sur les graines imbibées pendant 48 h dans de l'eau distillée stérile ont été placés sur MIB. L'ensemble a été incubé pendant quatre semaines dans la salle de culture.

**Tableau III. Milieu d'induction de bourgeons**

	Concentrations de cytokinines (mg.L <sup>-1</sup> )				
<b>BAP</b>	0	0,1	0,5	1	1,5
<b>Kin</b>	0	0,1	0,5	1	1,5
<b>BAP/KIN</b>	0	0,1	0,5	1	1,5

### **3.1.2.1.3. Influence de la gibbérelline (GA<sub>3</sub>) sur l'élongation des pousses**

Les pousses obtenues après quatre semaines de cultures sont placées sur le milieu d'élongation afin d'accroître leur taille selon la méthode de Pathi & Tuteja (2013).

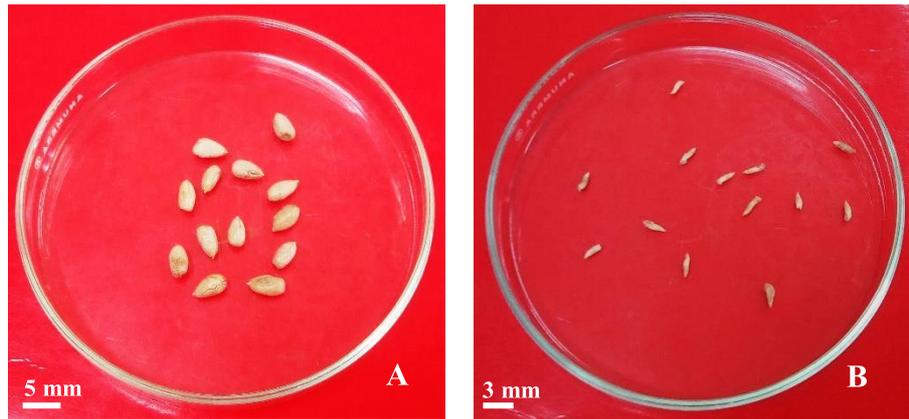
Le milieu d'élongation des pousses (MEP) a été constitué du milieu MS avec les vitamines MS (Murashige & Skoog, 1962), supplémenté de 30 g.L<sup>-1</sup> de saccharose et de quatre concentrations (0 ; 0,1 ; 0,5 ; 1 et 1,5 mg.L<sup>-1</sup>) de GA<sub>3</sub> ajoutées individuellement. L'incubation des cultures a duré quatre semaines dans la salle de culture.

### **3.1.2.1.4. Influence de trois auxines sur l'enracinement des pousses**

Après 4 semaines sur le milieu d'élongation, les pousses allongées ont été placées sur le milieu d'enracinement des pousses (MEnP) afin d'induire des racines selon la méthode de Afolabi-Balogun *et al.* (2015) modifiée et adaptée à notre matériel végétal. Le MEnP a été constitué du milieu MS avec les vitamines MS (Murashige & Skoog, 1962), supplémenté de 30 g.L<sup>-1</sup> saccharose auquel trois auxines (2,4-D ; AIA et AIB) à différentes concentrations (0 ; 0,5 ; 1 ; 1,5 et 2 mg.L<sup>-1</sup>) ont été ajoutées individuellement. L'incubation a duré quatre semaines dans la salle de culture.

### **3.1.2.2. Désinfection et obtention des bourgeons**

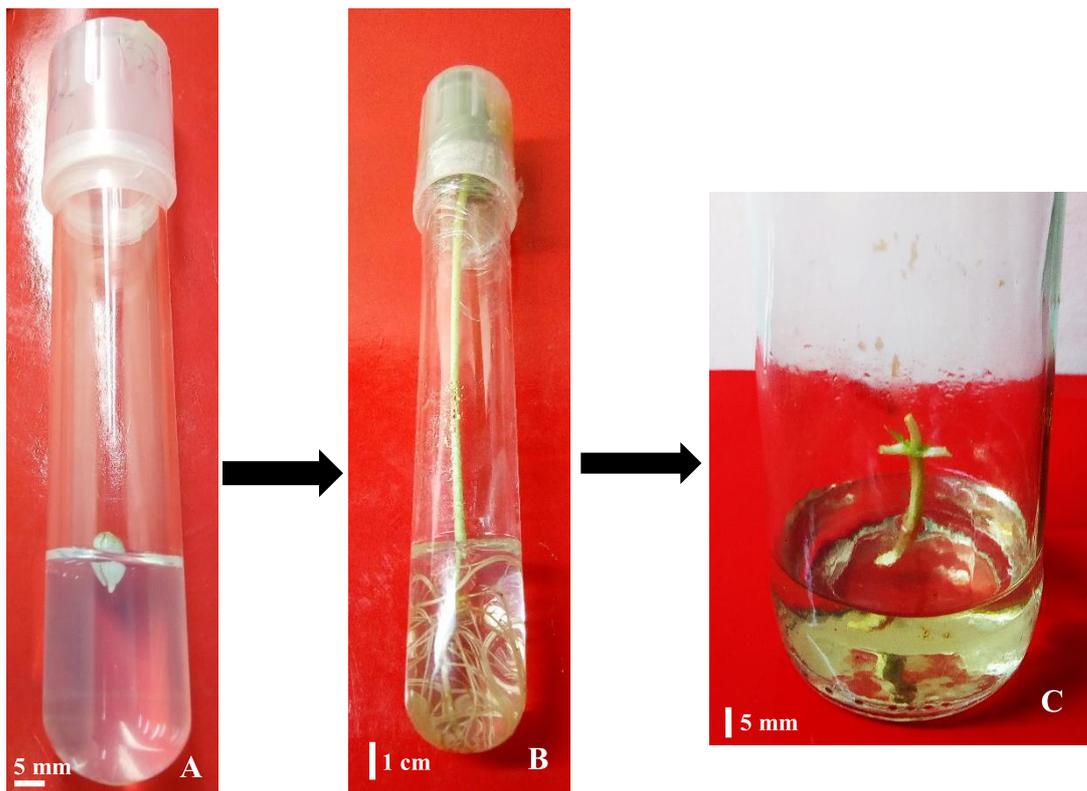
Les graines de cotonnier ont été désinfectées et mis en germination (*réf 1.1.2.3.*). Deux semaines après la germination, les bourgeons terminaux des vitroplants ont servi d'explant. En ce qui concerne les embryons, après 48 h d'imbibition à l'obscurité, sous une hotte à flux laminaire, les graines dont la radicule pointe ont été débarrassées des téguments, puis des cotylédons à l'aide d'une pince stérile afin de retirer les embryons (Figure 8).



**Figure 8. Graines et embryons de cotonnier.**

A : graine débarrassées des téguments ; B : embryons immature de cotonnier

Les bourgeons terminaux ont ensuite été placés sur le MIB (Figure 9) afin d'induire des pousses.



**Figure 9. Obtention et mise en culture de bourgeons terminaux de vitroplants de cotonnier**

A : graine de cotonniers sur milieu de germination ; B : vitroplant de cotonniers âgés de deux semaines ; C : Bourgeon terminal de vitroplant sur milieu d'induction de pousses.

### 3.1.2.3. Induction de bourgeons à partir des embryons immatures

L'induction des pousses à partir des embryons immatures a été réalisée selon la méthode de Pathi & Tuteja (2013) sous une hotte à flux laminaire. À cet effet, les embryons précédemment obtenus ont été directement mis en culture sur les milieux d'induction de pousses préparés (Figure 10). Les bocaux ont été fermés, puis scellés avec du parafilm. Les bocaux contenant les explants ont été disposés de manière aléatoire dans la salle de culture pendant quatre semaines. Pour chaque traitement (milieu de culture) 60 explants ont été utilisés.



**Figure 10. Mise en culture des embryons immatures sur milieu d'induction de pousses**

A : graines de cotonniers avec les radicules qui pointent ; B : graines de cotonniers débarrassés des téguments ; C : embryons immature de cotonniers sur milieu d'induction de pousses.

### 3.1.2.4. Multiplication et élongation des plantules obtenues

Les pousses issues de la culture des bourgeons terminaux et des embryons immatures ont été découpées en segments uni-nodaux ou bi-nodaux de 1,5 cm de long et placés chacun sur le même milieu que celui des explants primaires additionnés de quatre concentrations de GA3 (0 ; 0,1 ; 0,5 ; 1 et 1,5 mg.L<sup>-1</sup>) les conditions de culture restant identiques. Les

repiquages ont été effectués toutes les quatre semaines, pendant deux mois. Après deux mois de culture, les différents paramètres ont été évalués.

### **3.1.2.5. Enracinement des pousses obtenues**

Les pousses allongées ont été mises en culture sur un milieu d'enracinement afin d'induire les racines. L'enracinement des pousses a été réalisé sous une hotte à flux laminaire à l'aide de matériel préalablement stérilisé. Les jeunes plants ont été retirés du milieu à l'aide d'une pince, débarrassés des feuilles mortes et mises en culture sur le milieu d'enracinement. Le milieu d'enracinement a été constitué du milieu MS avec les vitamines MS additionné de 30 g.L<sup>-1</sup> saccharose et de quatre concentrations de 2,4-D, d'AIA et de AIB (0,5 ; 1 ; 1,5 et 2 mg.L<sup>-1</sup>) testées individuellement. Les plants ont été incubés dans la salle de culture pendant quatre semaines.

Toutes les cultures ont été réalisées dans la salle de culture dans les mêmes conditions que précédemment (*conf. 1*)

### **3.1.2.6. Acclimatation des plants de cotonnier régénérés**

#### **3.1.2.6.1. Sevrage**

Après l'induction, la multiplication, l'élongation, et l'enracinement des pousses obtenues, la dernière étape est l'acclimatation. L'acclimatation des plants a été réalisée sur un substrat composé de sol pris sur la parcelle expérimentale de l'Université Nangui Abrogoua et soigneusement mélangé à du compost (fiente de poulet, sable et sciure de bois) dans les proportions (1:1 v/v). Ce substrat a été stérilisé à l'autoclave à une température de 121 °C sous une pression de 1 Bar pendant 20 min. Le substrat stérilisé a été distribué dans des pots perforés à la base (5 trous/pots). L'acclimatation a consisté à retirer les vitroplants ayant une longueur de 5 à 7 cm du milieu gélosés à l'aide d'une pince en évitant d'endommager le système racinaire. Les racines des plants ont été ensuite abondamment lavées à l'eau distillée stérile pour éliminer la gélose à la base des vitroplants, puis mises en culture sur le substrat contenu dans des pots. Le dispositif expérimental mis en place est un bloc complètement aléatoire constitué de quatre essais. Les plantules ont ensuite été placées dans des bacs recouverts d'un support en plastique transparent dans la salle de culture à 28 ± 2 °C sous une photopériode de 12 h. Les plantules ont été arrosées régulièrement tous les trois jours avec 5 mL d'eau distillée stérile. Elles ont séjourné dans la salle de culture pendant trois semaines. Le couvert en plastique a été retiré au fur et à mesure jusqu'à l'ouverture totale la troisième

semaine (c'est la pré-acclimatation). A la fin de cette étape, le taux de survie des vitroplants a été calculé selon la formule suivante :

$$TS = \frac{NVS}{NVA} \times 100$$

NVS = Nombre de vitroplants ayant survécu après acclimatation  
NVA = Nombre de vitroplants acclimatés

### 3.1.2.6.2. Élevage

Les plantules pré-acclimatées ont été transférées dans des sachets en polyéthylène perforés de largeur 10 cm et de longueur 20 cm. La perforation sur les sachets permet d'éviter l'excès d'eau et l'asphyxie des racines. Ces sachets ont été préalablement remplis avec les substrats d'acclimatation. Les sachets contenant les plants ont été déposés dans une serre. Dans cette seconde phase de l'acclimatation, les soins apportés aux plants sont limités à l'arrosage à raison de 50 mL d'eau de robinet par plant par semaine. Le dispositif expérimental mis en place est un bloc complètement aléatoire constitué de quatre essais. Après quatre semaines d'acclimatation sous serre, le taux de survie a été évalué. Le nombre de feuilles et de racines ont été compté et le Taux de Survie (TS) des plants acclimatés a été calculé selon la formule ci-dessous :

$$TS = \frac{NVS}{NVA} \times 100$$

NVS = Nombre de vitroplants ayant survécu après acclimatation  
NVA = Nombre de vitroplants acclimatés

### 3.1.2.7. Analyses statistiques

L'effet de deux cytokinines (BAP, KIN) ; de la GA<sub>3</sub> ; de trois auxines (2,4-D, AIA et AIB) a été testé sur le bourgeonnement, l'élongation et l'enracinement des explants de cotonnier, respectivement. Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel Statistica 7.1. Des analyses de variances (ANOVA 2) à deux critères de classifications (2 niveaux de cytokinines x 6 niveaux de concentrations) ; (5 niveaux de GA<sub>3</sub> x 2 niveaux d'explants) ; (3 niveaux d'auxines x 5 niveaux de concentrations) ont été effectuées sur les valeurs moyennes des paramètres mesurés. Ensuite, le test de Newman-Keuls au seuil de 5 % a été utilisé pour le classement des moyennes après que l'ANOVA ait relevé l'existence de différences significatives ( $p \leq 0,05$ ).

Quant à l'acclimatation des vitroplants, les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Statistica 7.1 selon la procédure ANOVA à un critère de classification des

moyennes du nombre et du taux de survie des explants pré-acclimatés ; du nombre de feuilles, de racines et du taux de survie des plants acclimatés. Les données exprimées en pourcentage ont subi une transformation angulaire arcsin ( $\sqrt{x}$ ) avant l'analyse de variances. Lorsqu'une différence significative a été révélée entre les moyennes pour un paramètre donné, le test de Newman-Keuls au seuil de 5 % a été réalisé pour séparer les moyennes.

# **TROISIÈME PARTIE : RÉSULTATS ET DISCUSSION**

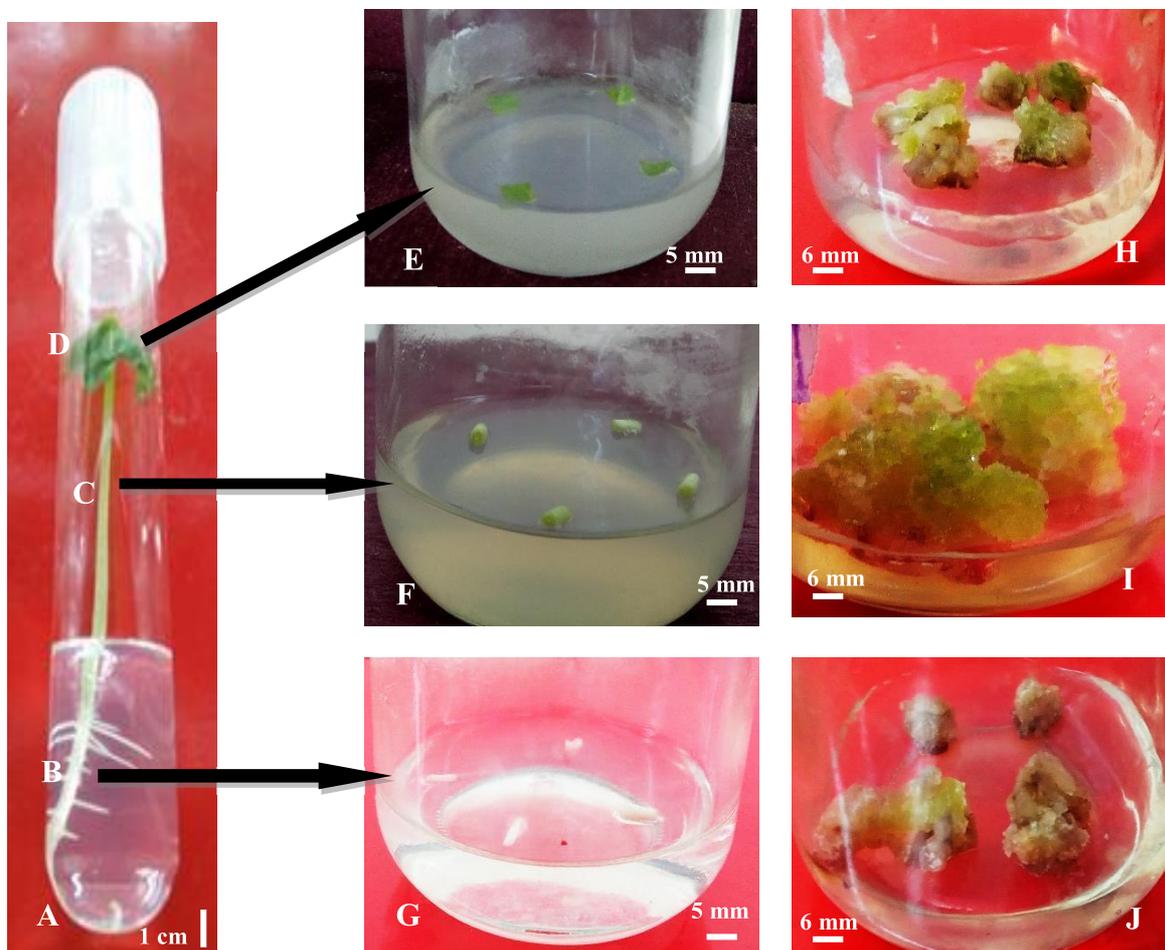
# 1. ÉVALUATION DE L'EMBRYOGENÈSE SOMATIQUE

## 1.1. RÉSULTATS

### 1.1.1. INDUCTION DE CALS CHEZ LE COTONNIER

#### 1.1.1.1. Obtention des vitroplants et initiation des cals

Une semaine après la mise en culture, des vitroplants d'environ 10 cm de long ont été obtenus (Figure 11). Ils comportent des racines, une tige ou hypocotyle et des feuilles ou cotylédon. Les différentes parties du vitroplant ont été mis en culture à raison de quatre explants par bocal. Après une incubation de quatre semaines dans la chambre de culture, on obtient les cals présentés sur les images (H, I et J).



**Figure 11. Initiation de cal à partir d'explants de vitroplant âgé de sept jours**

A : vitroplants âgés de sept jours, B : racine ; C : hypocotyle ; D : cotylédons ; E : explants de cotylédon de 5 mm<sup>2</sup> sur milieu de callogenèse ; F : explant d'hypocotyle de 5 mm sur milieu de callogenèse ; G : explants de racine de 5 mm sur milieu de callogenèse, H : cals issus de cotylédon, I : cals issus l'hypocotyle, J : cals issus de racine

### **1.1.1.2. Influence de la source de carbone sur la callogenèse les cotylédons de cotonnier**

Les résultats de l'effet des sources de carbone sur l'induction des cals sont consignés dans le tableau IV. Ils montrent que la réponse des explants à l'initiation des cals a été significativement influencée par la source de carbone ( $p < 0,001$ ). Ainsi, le milieu de culture supplémenté de glucose a induit des cals au bout du septième jour de culture alors que les milieux de culture supplémentés des autres sources de carbone initient des cals à partir du quinzième jour (15 jours). Le saccharose quant à lui a induit tardivement les cals (20 jours).

Concernant le taux d'induction de cals, les résultats ont montré que les quatre sources de carbone ont induits des cals. La source de carbone a influencée différemment le pourcentage d'induction des cals. Le plus faible taux d'induction a été observé avec le saccharose (27,32 %). Il a été suivi du maltose (41,16 %) et du fructose (50,13 %). Le glucose a induit le plus fort taux d'induction de cals (64,05 %).

Les résultats montrent aussi que la source de carbone a significativement influencé le poids de matière fraîche des cals. Le poids le plus élevé de cals frais a été enregistré sur le milieu contenant le glucose (17,25 mg). Le saccharose a affiché le plus faible poids de matière fraîche (3,68 mg).

La source de carbone a également influencé le poids de la matière sèche des cals. Le poids le plus important de cals sec a été obtenu avec le glucose (2,87 mg). Alors que le saccharose a enregistré le poids de cals sec le plus faible (0,05 mg).

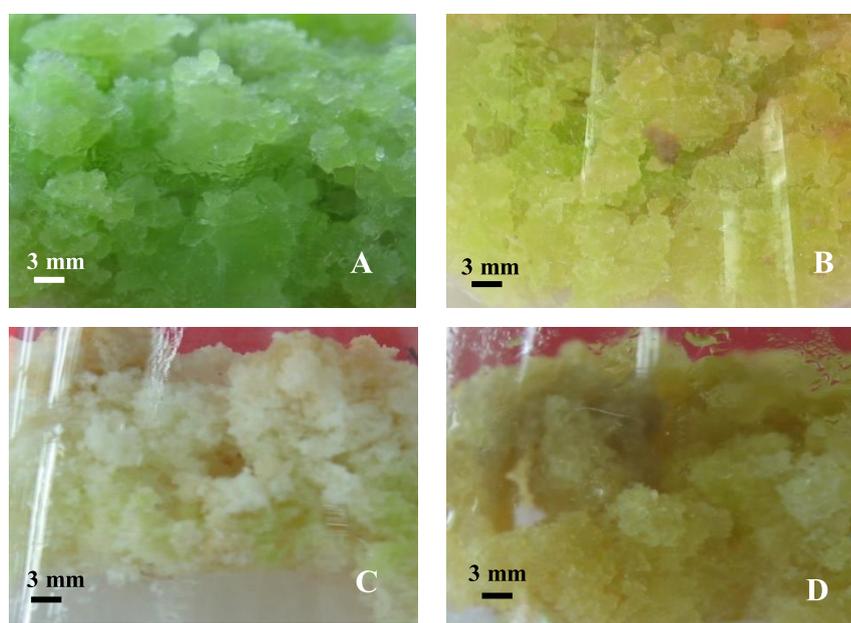
Les résultats du taux de prolifération ont montré que ce paramètre a significativement été influencé par la source de carbone. Les cals prolifèrent plus rapidement sur le milieu contenant le glucose (95,31 %) alors que la prolifération est plus lente sur le milieu contenant le saccharose (25,12 %). La coloration des cals varie du blanc au brun en passant par le banc verdâtre. Tous les cals sont friables quel que soit la source de carbone utilisé (Figure 12).

Les résultats ont montré que le glucose a été plus efficace pour induire les cals chez le cotonnier. Il a donc été retenu pour la suite des expériences.

**Tableau IV. Influence de la source de carbone sur la callogenèse des cotylédons de cotonnier**

Sucre (30 g L <sup>-1</sup> )	TD (j)	TI (%)	PF (mg ± s)	PS(mg ± s)	TProl (%)	Coul	Text	IF
Glucose	7	64,05 ± 4,25 a	17,25 ± 4,90 a	2,87 ± 0,76 a	95,31 ± 8,13 a	vert	friable	+++++
Saccharose	20	27,32 ± 4,86 d	3,68 ± 1,08 b	0,05 ± 0,01 c	25,12 ± 5,04 c	jaune	friable	++++
Fructose	15	50,13 ± 5,05 b	10,11 ± 3,05 ab	1,76 ± 0,38 b	38,26 ± 7,29 b	blanc	friable	++++
Maltose	15	41,16 ± 4,61 c	4,59 ± 1,33 b	0,46 ± 0,15 bc	30,70 ± 7,45 b	brun	friable	++++

Dans une même colonne, les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes (Test de Newman-Keuls au seuil 5 %). Toutes les sources de carbone ont été utilisées à 30 g.L<sup>-1</sup> ; Gluc : glucose ; Sac : saccharose ; Fruc : fructose ; Mal : maltose ; TD : temps de débourement ; j : jour ; TI : Taux d'induction ; PF : poids frais ; PS : poids sec ; T Prol : taux de prolifération ; coul : Couleur ; Test : Texture ; IF : Indice de Friabilité ; +++++ : très friable ; ++++ : friable



**Figure 12. Cals issus de cotylédon de cotonnier sur milieu supplémenté de quatre sources de carbone après la troisième subculture.**

A: cals induits sur milieu supplémenté de glucose; B: cals induits sur milieu supplémenté de saccharose; C: cals induits sur milieu supplémenté de fructose; D: cals induits sur milieu supplémenté de maltose

### 1.1.1.3 Influence de la concentration du glucose sur l'induction des cals

Les résultats des tests réalisés avec les concentrations du glucose sont présentés dans le tableau V. L'analyse de la variance a révélé une variation significative du taux d'induction, de prolifération et des poids de matière fraîche et sèche en fonction des concentrations de glucose ( $P \leq 0,05$ ). Les cals ont déboué à partir du cinquième jour pour les concentrations de 40 et 50 g.L<sup>-1</sup> alors que la concentration de 20 g.L<sup>-1</sup> a induit les cals au 10<sup>ème</sup> jour.

Les tests ont également montré que le taux d'induction des cals a été significativement influencé par la concentration du glucose. Le taux d'induction le plus élevé a été enregistré avec 50 g.L<sup>-1</sup> (75,25 %). Les concentrations de 40 et 30 g.L<sup>-1</sup> de glucose ont affiché un taux induction de 66,17 et 62,07 % de cals, respectivement. Le plus faible taux d'induction de cals a été enregistré à la concentration 20 g.L<sup>-1</sup> (47,5 %).

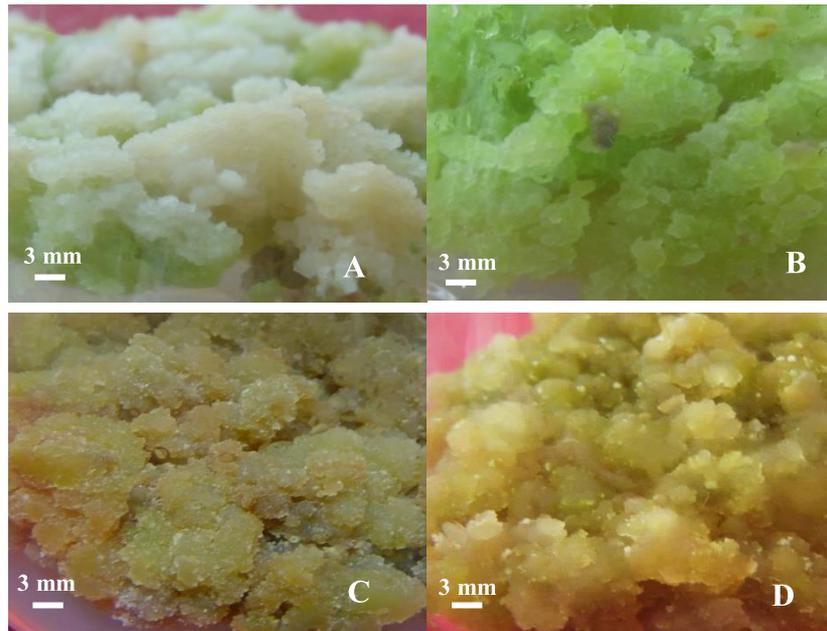
Les poids des cals frais et secs, ainsi que le taux de prolifération des cals, ont été significativement influencé par la concentration de glucose. Les valeurs les plus élevés ont été enregistrées avec la concentration de 50 g.L<sup>-1</sup> (18,95 ; 2,29 mg et 77,37 %, respectivement). La concentration de 20 g.L<sup>-1</sup> a enregistré les plus faibles valeurs (3,95 ; 0,65 mg et 32,89 %, respectivement pour le poids des cals frais, secs et le taux de prolifération). Les résultats montrent également que les fortes concentrations (40 et 50 g.L<sup>-1</sup>) ont induit des cals de coloration brune, alors que la concentration de 20 g.L<sup>-1</sup> a donné des cals blancs. Quant à la concentration 30 g.L<sup>-1</sup>, elle a induit des cals de couleur verte. Par ailleurs, les résultats montrent que la friabilité des cals diminue avec l'augmentation de la concentration du glucose (Figure 13).

Le glucose à la concentration de 30 g L<sup>-1</sup> ayant induit les cals les plus les friables a été retenue pour la suite des expériences.

**Tableau V. Influence de la concentration de glucose sur la callogenèse des cotylédons de cotonnier**

Glucose (g.L <sup>-1</sup> )	TD (J)	TI (%)	PF (mg)	PS (mg)	T Prol (%)	Coul	Text	IF
20	10	47,5 ± 2,5 c	3,95 ± 1,08 d	0,65 ± 0,21 c	32,89 ± 7,75 c	blanc	fr	++++
30	7	62,07 ± 2,2 b	15,22 ± 4,39c	1,39 ± 0,66 b	51,67 ± 9,04 ab	vert	fr	+++++
40	5	66,17 ± 2,3 b	17,11 ± 4,36 ab	1,42 ± 0,42 b	63,01 ± 9,32 ab	brun	Peu fr	+
50	5	75,25 ± 0,0 a	18,95 ± 5,47 a	2,29 ± 0,69 a	77,37 ± 9,11a	brun	Peu fr	+

Dans une même colonne, les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes (Test de Newman-Keuls au seuil 5 %) ; TD : Temps de Débourement ; TI : Taux d'Induction ; PF : Poids Frais ; PS : Poids Sec ; T Prol : Taux de Prolifération ; Coul : Couleur ; Text : texture ; IF : Indice de Friabilité ; +++++ : Très Friable ; ++++ : Friable ; + : non friable ou pâteux.



**Figure 13. Cals induits à partir de différentes concentrations de glucose**

A : milieu additionné de 20 g.L<sup>-1</sup> de glucose ; B : milieu additionné de 30 g.L<sup>-1</sup> de glucose ; C : milieu additionné de 40 g.L<sup>-1</sup> de glucose ; D : milieu additionné de 50 g.L<sup>-1</sup> de glucose

#### **1.1.1.4. Influence des auxines et de leur concentration sur la callogenèse des cotylédons de cotonniers**

L'effet des auxines (2,4-D, ANA et AIB) aux concentrations respectives (0,1 ; 0,5 ; 1 et 1,5 mg.L<sup>-1</sup>) sur la callogenèse du cotonnier a été étudié. Les résultats ont révélé que les auxines influencent l'induction des cals. En effet, les faibles doses de 2,4-D (0,1 et 0,5 mg.L<sup>-1</sup>) ont induit de très forts taux de cals (70,0 et 40,25 %, respectivement) (Tableau VI). Contrairement au 2,4-D, c'est la concentration élevée d'AIB (1,5 mg.L<sup>-1</sup>) qui a induit des cals. En présence d'ANA, il n'y a pas de formation de cals

L'analyse du poids des cals frais a montré que le 2,4-D à la concentration de 0,1 mg.L<sup>-1</sup> a donné le poids le plus élevé (2,8 mg), suivi de l'AIB à la concentration de 1,5 mg L<sup>-1</sup> (2,13 mg) puis du 2,4-D à la concentration de 0,5 mg.L<sup>-1</sup> (1,81 mg). Les résultats du poids de cals secs ont montré que le 2,4-D à la concentration de 0,1 mg.L<sup>-1</sup> a enregistré le poids le plus élevé (0,66 mg).

Par ailleurs, les résultats révèlent que l'AIB à 1,5 mg L<sup>-1</sup> a induit le plus fort taux de prolifération (70,2 %). Les plus faibles taux de prolifération ont été enregistrés sur les milieux additionnés de 0,5 et 0,1 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D (22,21 et 21,27 %, respectivement). Tous les cals

obtenus sont de coloration blanche. Le 2,4-D a donné des cals friables, alors que l'AIB a donné des cals compacts.

Les résultats ont montré que le 2,4-D à la concentration de 0,1 mg.L<sup>-1</sup> a induit des cals friables avec des poids de matières sèches les plus élevés. Cette hormone a donc été retenue pour la suite des expériences.

**Tableau VI. Effet des auxines sur la callogenèse des cotylédons de cotonnier**

Auxines (mg.L <sup>-1</sup> )	TD (j)	TI (%)	PF (mg ± s)	PS (mg ± s)	T Prol (%)	Coul	Text	IF	
2,4-D	0,1	8	70,0± 1,84a	2,8 ± 0,66a	0,66 ± 0,2a	21,27± 4,58b	blanc	Fr	+++
	0,5	8	40,25±0,96b	1,81± 0,59ab	0,23±0,08 bc	22,21± 5,42b	blanc	Fr	+++
	1	-	0 ± 0d	0 ± 0c	0 ± 0c	0 ± 0c	-	-	-
	1,5	-	0 ± 0d	0 ± 0c	0 ± 0c	0 ± 0c	-	-	-
ANA	0,1	-	0 ± 0d	0 ± 0c	0 ± 0c	0 ± 0c	-	-	-
	0,5	-	0 ± 0d	0 ± 0c	0 ± 0c	0 ± 0c	-	-	-
	1	-	0 ± 0d	0 ± 0c	0 ± 0c	0 ± 0c	-	-	-
	1,5	-	0 ± 0d	0 ± 0c	0 ± 0c	0 ± 0c	-	-	-
AIB	0,1	-	0 ± 0d	0 ± 0c	0 ± 0c	0 ± 0c	-	-	-
	0,5	-	0 ± 0d	0 ± 0c	0 ± 0c	0 ± 0c	-	-	-
	1	-	0 ± 0d	0 ± 0c	0 ± 0c	0 ± 0c	-	-	-
	1,5	8	19,41 ± 1,2c	2,13± 0,65bc	0,32 ± 0,08b	70,2± 10,47a	blanc	Comp	+

Dans une même colonne, les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes (Test de Newman-Keuls au seuil 5 %) ; 2,4-D : Dichlorophénoxyacétique ; ANA : Acide nephtalène acétique ; AIB : Acide indolebutyrique ; TD : temps de débourrement ; j : jour ; TI : Taux d'induction ; PF : poids frais ; PS : poids sec ; T Prol : taux de prolifération ; Coul : Couleur ; Text : Texture ; IF : Indice de Friabilité ; +++: peu firable ; + : compact.

### 1.1.1.5. Influence des cytokinines sur la callogenèse des feuilles de cottonniers

Les résultats de l'influence de trois cytokinines (BAP, KIN et TDZ) sur la callogenèse sont consignés dans le tableau VII et rapportent un effet significatif des cytokinines sur l'induction de cals chez le cotonnier. La TDZ a été la plus efficace avec un taux d'induction de 67,75 et 69,05 % aux concentrations 1 et 1,5 mg.L<sup>-1</sup>, respectivement. Les faibles concentrations de TDZ (0,1 et 0,5 mg.L<sup>-1</sup>) n'ont eu aucun effet sur l'induction de cals. Les résultats montrent aussi qu'avec la KIN, seule la concentration de 0,5 mg.L<sup>-1</sup> a induit des cals avec un taux d'induction de 23,75 %. Quant à la BAP, elle a été sans effet sur la callogenèse chez le cotonnier quel que soit la concentration testée.

L'analyse de variance a montré que les poids des cals frais et secs ont significativement été influencés par les auxines et leurs concentrations. Ainsi, les poids des cals frais et secs les plus élevés ont été enregistrés sur les milieux contenant 1,5 et 1 mg.L<sup>-1</sup> de

TDZ (7,53 et 1,79 mg) ; (6,51 et 1,53 mg, respectivement). La KIN a induit les plus faibles poids de cals frais et secs à la concentration 0,5 mg.L<sup>-1</sup> (0,42 et 0,06 mg, respectivement).

Les cals ont proliféré plus rapidement sur les milieux contenant la TDZ (78,07 et 71,53 %, respectivement pour les concentrations de 1 et 1,5 mg.L<sup>-1</sup>). La KIN a donné des cals de couleur blanche et peu friables, alors que les cals obtenu avec la TDZ sont blanc verdâtre pour la concentration de 1 mg.L<sup>-1</sup> ; blanc jaunâtre pour 1,5 mg.L<sup>-1</sup> et de texture compacts.

**Tableau VII. Effet des cytokinines et de leur concentration sur la callogenèse des cotylédons de cotonniers**

Cytokinine (mg.L <sup>-1</sup> )	TD (J)	TI(%)	PF (mg ± s)	PS (mg ± s)	T Prol (%)	Coul	Text	IF	
<b>BAP</b>	0,1	-	0 ± 0c	0 ± 0b	0 ± 0b	0 ± 0c	-	-	
	0,5	-	0 ± 0c	0 ± 0b	0 ± 0b	0 ± 0c	-	-	
	1	-	0 ± 0c	0 ± 0b	0 ± 0b	0 ± 0c	-	-	
	1,5	-	0 ± 0c	0 ± 0b	0 ± 0b	0 ± 0c	-	-	
<b>KIN</b>	0,1	-	0 ± 0c	0 ± 0b	0 ± 0b	0 ± 0c	-	-	
	0,5	21	23,75±8,27 b	0,42 ± 0,2b	0,06 ± 0,03b	13,93 ± 6,13b	blanc	Pfr	+++
	1	-	0 ± 0c	0 ± 0b	0 ± 0b	0 ± 0c	-	-	
	1,5	-	0 ± 0c	0 ± 0b	0 ± 0b	0 ± 0c	-	-	
<b>TDZ</b>	0,1	-	0 ± 0c	0 ± 0b	0 ± 0b	0 ± 0c	-	-	
	0,5	-	0 ± 0c	0 ± 0b	0 ± 0b	0 ± 0c	-	-	
	1	17	67,75±2,34a	6,51 ± 2,25a	1,53 ± 0,62a	78,07 ± 4,33a	Jn-bl	comp	+
	1,5	17	69,05 ± 2,3a	7,53 ± 2,59a	1,79 ± 0,56a	71,53 ± 6,70a	blanc	comp	+

Dans une même colonne, les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes (Test de Newman-Keuls au seuil 5 %) ; BAP : Benzylaminopurine ; KIN : Kinétine ; TDZ : Thidiazuron ; TD : temps de débourrement ; j : jour ; TI : Taux d'induction ; PF : poids de cal frais ; PS : poids de cal sec ; T Prol : taux de prolifération ; Coul : Couleur ; Text : Texture ; IF : Indice de Friabilité ; ++ : Pfr : peu friable ; + : compact ; Jn-bl : Jaune blanchâtre

#### 1.1.1.6. Influence du régime hormonal sur l'induction des cals des cotylédons de cotonniers

Les résultats de l'effet de l'interaction entre le 2,4-D et les cytokinines (BAP, KIN et TDZ) sur la callogenèse chez le cotonnier sont présentés dans le tableau VIII. Ils montrent que la combinaison cytokinine/auxine influence significativement l'induction des cals ( $p < 0,001$ ). L'analyse des variances a montré que toutes les combinaisons hormonales testées ont induit des cals. Cependant, la combinaison 0,1 mg.L<sup>-1</sup> 2,4-D + 0,5 mg.L<sup>-1</sup> KIN a enregistré le taux d'induction le plus élevé (75,52 %). De plus, les cals obtenus avec cette combinaison sont de colorations vertes et friables favorables à l'induction d'embryons somatiques (Figure 14). L'association 2,4-D/TDZ a induit des cals dont le taux d'induction varie de 29,73 à 45 %

suivant les concentrations testées. Les cals obtenus avec cette combinaison ont une structure pâteuse défavorable à l'induction d'embryons somatiques. Par ailleurs, les résultats montrent que la combinaison 2,4-D/BAP a induit des cals compacts avec des formations racinaires.

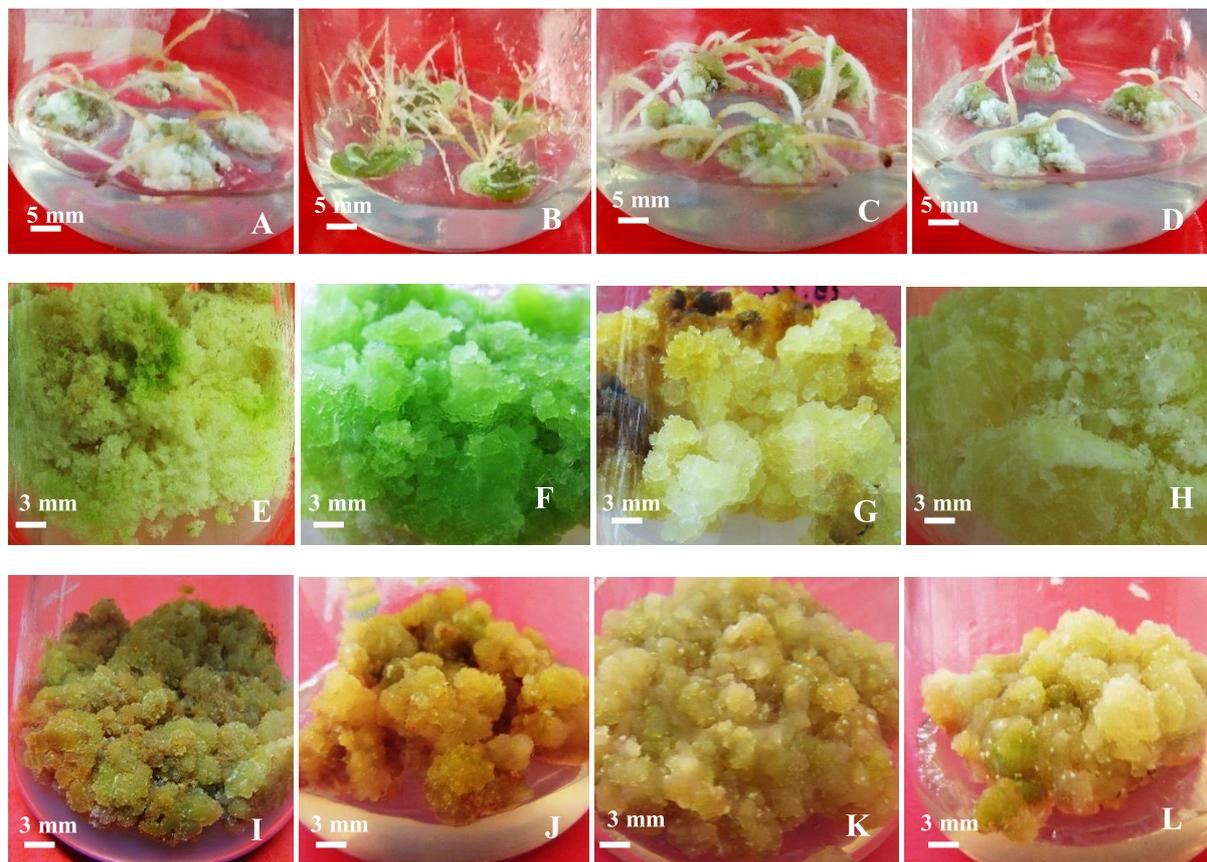
La combinaison 2,4-D/KIN à la concentration 0,1 et 0,5 mg.L<sup>-1</sup> ayant induit les cals les plus friables, favorables à l'embryogenèse somatique a été retenu pour la suite des travaux.

**Tableau VIII. Effet des cytokinine en présence de 0,1 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D sur l'induction des cals**

2,4-D (mg L <sup>-1</sup> )	Cytokines (mg.L <sup>-1</sup> )	TD (J)	TI(%)	PF (mg ± s)	PS (mg ± s)	T Prol (%)	NR	Coul	Text	IF	
0,1	BAP	0,1	17	45,00± 8,66 b	0,23 ± 0,06 e	0,02 ± 0,00 e	0,25 ± 0,04 g	12,66 ± 0,51 a	blanc	Compact	+
		0,5	17	35,00± 5,10 c	0,66 ± 0,25 cd	0,18 ± 0,08 c	11,29 ± 1,85 f	14,00 ± 0,72 a	blanc	Compact	+
		1,0	17	14,47 ± 0,10 e	1,10 ± 0,5 c	0,23 ± 0,05 c	26,66 ± 1,70 d	11,00 ± 1,78 a	blanc	Compact	+
		1,5	17	24,65 ± 4,17 d	1,58 ± 0,76 b	0,13 ± 0,06 b	19,85 ± 1,5 e	06,33 ± 0,45 b	blanc	Compact	+
	KIN	0,1	10	41,66 ± 3,33 b	0,45 ± 0,16 e	0,45 ± 0,06 b	0,04 ± 0,01 g	00 ± 00	bl-v	peu-fr	+++
		0,5	7	75,52 ± 7,23 a	15,63 ± 4,61 a	1,79 ± 0,06 a	83,72 ± 2,25 a	00 ± 00	vert	très-fr	+++++
		1,0	11	35,00± 5,10 c	0,98 ± 0,05 c	0,08 ± 0,01 e	32,21 ± 1,46 c	00 ± 00	bl-jn	peu-fr	+++
		1,5	10	40,00± 5,05 b	1,93 ± 0,42 b	0,36 ± 0,14 bc	34,15 ± 2,77 c	00 ± 00	jn-v	peu-fr	+++
	TDZ	0,1	8	40,00 ± 5,15 b	0,38 ± 0,11 e	0,03 ± 0,01 e	0,03 ± 0,00 de	00 ± 00	brun	pâteux	++
		0,5	8	45,00 ± 7,11 b	0,53 ± 0,08 d	0,11 ± 0,70 d	26,41 ± 1,70 d	00 ± 00	jaune	pâteux	++
		1,0	8	29,73 ± 6,26 d	0,85 ± 0,05 c	0,07 ± 0,01 e	45,30±2,20b	00 ± 00	jaune	pâteux	++
		1,5	8	35,00± 5,20 c	1,35 ± 0,32 b	0,50± 0,04 b	38,45 ± 1,32 b	00 ± 00	jaune	pâteux	++

Dans une même colonne, les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes (Test de Newman-Keuls au seuil 5 %) ; 2,4-D :

Dichlorophénoxyacétique ; BAP : Benzylaminopurine ; KIN : Kinétine ; TDZ : Thidiazuron ; TD : temps de débourrement ; j : jour ; TI : Taux d'induction ; PF : poids frais ; PS : poids sec ; T Prol : taux de prolifération ; Coul : Couleur ; Text : Texture ; IF : Indice de Friabilité ; +++++: Très Firable, +++ : Peu Friable ; + : compact ; ++ : pateux, NR: Nombre de Racine; bl-v: blanc-verdatre; bl-jn: blanc-jaunatre; jn-v: jaune-verdatre ;



**Figure 14. Effet des cytokinines en présence de 0,1 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D sur l'induction des cals**

A: 0.1 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D + 0.1 mg L<sup>-1</sup> BAP; B :0.1 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D + 0.5 mg L<sup>-1</sup> BAP; C: 0.1 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D + 1 mg L<sup>-1</sup> BAP; D: 0.1 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D + 1.5 mg L<sup>-1</sup> BAP; E: 0.1 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D + 0.1 mg L<sup>-1</sup> KIN; F: 0.1 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D + 0.5 mg L<sup>-1</sup> KIN; G: 0.1 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D + 1 mg L<sup>-1</sup> KIN; H: 0.1 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D + 1.5 mg L<sup>-1</sup> KIN; I: 0.1 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D + 0.1 mg L<sup>-1</sup> TDZ; J: 0.1 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D + 0.5 mg L<sup>-1</sup> TDZ; K: 0.1 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D + 1 mg L<sup>-1</sup> TDZ, L: 0.1 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D + 1.5 mg L<sup>-1</sup> TDZ.

#### 1.1.1.7. Influence du type d'explants sur l'induction de cals chez le cotonnier

L'analyse du tableau IX montre que le type d'explant a un effet significatif ( $P < 0,001$ ) sur l'induction des cals chez le cotonnier. Ainsi, le temps de débourrement a varié selon le type d'explant. L'hypocotyle a induit précocement des cals (sept jours), suivi du cotylédon (15 jours) et de la racine (21 jours).

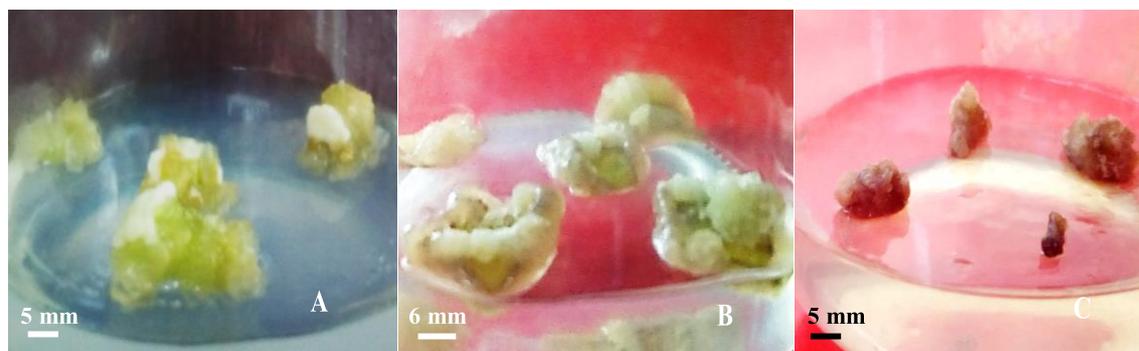
De même, le taux d'induction le plus élevé de cals a été enregistré avec l'hypocotyle (82,93 %), il est suivi du cotylédon (68,75 %) et de la racine (37,5 %). Les résultats montrent également que les poids de matière fraîche (24,41 mg), de matière sèche (1,98 mg) et le taux de prolifération (70,93 %) les plus élevés a été obtenus avec l'hypocotyle. Les cals obtenus sont tous friables avec une couleur qui varie du brun au vert blanchâtre (Figure 15).

Les résultats de cette étude montrent que l'hypocotyle est le meilleur explant pour l'induction des cals chez le cotonnier. L'hypocotyle a donc été retenu pour la suite des expériences.

**Tableau IX. Effet du type d'explants sur la callogenèse chez le cotonnier**

Expl	TD (j)	TI (%)	PF (mg)	PS (mg)	T Prol (%)	Coul	Text	IF
Rac	21	37,5±2,91c	10,72±2,04b	0,35±0,09c	21,73±4,35c	brun	friable	++++
Hyp	7	82,93±1,74a	24,41±3,67a	0,98±0,18a	70,93±9,14a	Vert	friable	+++++
Coty	15	68,75±3,26b	12,8 ± 2,17b	0,59±0,08b	55,14±7,64b	blanc	friable	+++++

Dans une même colonne, les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes (Test de Newman-Keuls au seuil 5 %) ; Rac : Racine ; Hyp : Hypocotyle ; Coty : Cotylédon ; TD : temps de débourement ; j : jour ; TI : Taux d'induction ; PF : poids frais ; PS : poids sec ; T Prol : taux de prolifération ; Coul : Couleur ; Text : Texture ; IF : Indice de Friabilité ; +++++ : Très Friable ; ++++ : Friable



**Figure 15. Induction de cals à partir des explants de cotonnier**

A : hypocotyle ; B : cotylédon, C : racine

#### 1.1.1.8. Influence de l'âge de l'explant sur l'induction et la prolifération des cals

L'analyse du tableau X montre que l'âge des explants influence significativement ( $p < 0,001$ ) le taux d'initiation des cals. Ce taux varie de 20,94 à 72,62 %. Le taux le plus élevé a été obtenu avec les explants âgés de sept (72,62 %) et quatre (54,05 %) jours. Les plus faibles taux d'induction ont été enregistrés chez les explants âgés de 13 et 16 jours (23,53 et 20,94 %, respectivement). Les résultats montrent également que le temps nécessaire pour entamer la dédifférenciation (temps de débourement) varie selon l'âge des explants.

Les poids des cals frais et secs ont également été influencés ( $p < 0,05$ ) par l'âge des explants. Les poids des cals frais (17,59 mg) et des cals secs (2,56 mg) les plus importants ont été obtenus avec les explants de sept jours. Les explants de âgés 16 jours ont enregistré les

plus faibles poids de la matière 3,55 et 0,36 mg, respectivement pour les poids des cals frais et secs).

Les résultats de l'analyse ont montré que la prolifération cellulaire a aussi été influencé ( $p < 0,001$ ) par l'âge des explants. Ainsi, le taux de prolifération le plus élevé a été obtenu avec les explants âgés de sept jours (82,46 %). Le plus faible taux a été enregistré avec les explants âgés de 16 jours (17,93 %).

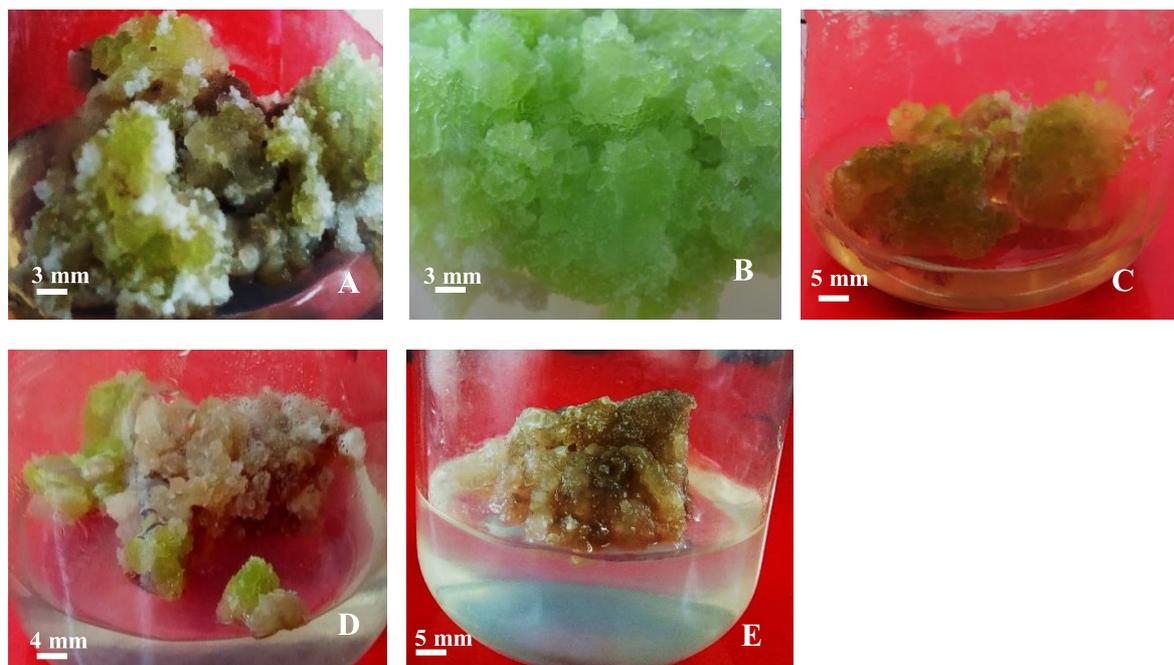
Les explants âgés de quatre à 10 jours ont induit des cals friables, tandis que ceux âgés de 13 et 16 jours ont induit des cals de texture pâteuse. La coloration des cals varie du vert-blanchâtre au brun (Figure 16).

Les explants âgés de sept jours ont induit les taux d'induction et le poids de matière sèche les plus élevés. Ils ont donc été retenus pour la suite des expériences.

**Tableau X. Influence de l'âge de l'explant sur l'induction et la prolifération des cals**

Âge (J)	TD (j)	TI (%)	PF (mg)	PS (mg)	T Prol (%)	Coul	Text	IF
4	5	54,05±3,65a	14,17±3,75ab	1,48±0,36a	62,12±10,22ab	Vert-bl	friable	++++
7	7	72,621±2,99b	17,59± 3,78a	2,56±0,38b	82,46± 97,16a	Vert	friable	+++++
10	9	36,19± 2,64c	7,47± 1,59bc	0,63±0,15c	54,88± 8,38ab	Vert br	friable	++++
13	13	23,53±2,3d	5,03±1,29c	0,51±0,16c	41,79±9,74b	Bl br	pâteux	++
16	15	20,94±2,3d	3,55±0,84c	0,36±0,10c	17,93±3,28c	Br	pâteux	++

Dans une même colonne, les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes (Test de Newman-Keuls au seuil 5 %); TD : temps de débourrement ; j : jour ; TI : Taux d'induction ; PF : poids frais ; PS : poids sec ; T Prol : taux de prolifération ; Coul : Couleur ; Text : Texture ; IF : Indice de Friabilité ; ++++ : friable ; +++++ : Très Friable ; ++ : peu friable ou pâteux.



**Figure 16. Cals de cotonniers obtenus à partir d'explants d'âge différents après la troisième subculture**

A : explant âgé de quatre jours, B : explant âgé de sept jours, C : explant âgé de 10 jours, D : explant âgé de 13 jours, E : explant âgé de 16 jours

#### 1.1.1.9. Influence de la taille de l'explant sur la calculture

L'analyse des résultats a révélé que la réponse à la callogenèse, varie selon la taille de l'explant. Les explants de petite taille (2,5 et 5 mm), induisent des cals au septième et neuvième jours, alors que chez les explants de taille plus grande, la dédifférenciation débute au 11<sup>ème</sup> jours (Tableau XI).

L'analyse statistique des résultats a montré que la taille de l'explant a un effet significatif ( $p < 0,001$ ) sur initiation et la prolifération cellulaire. Ainsi, les tests réalisés sur le taux d'induction callogénique ont montré que les explants de 5 mm de long ont présenté le taux d'induction le plus élevé (78,3 %). Les explants de 15 mm ont induit le plus faible taux (35 %).

Les résultats montrent aussi que le poids de matière fraîche et sèche des cals a également été sous l'influence de la taille de l'explant. Les poids les plus élevés de matière fraîche (19,24 mg) et de matière sèche (2,27 mg) des cals ont été enregistrés avec les explants de 5 mm de long. Ils sont suivis des explants de 2,5 mm (11,08 mg pour les poids des cals frais et 1,69 mg pour le poids des cals secs).

L'analyse des tests réalisés avec la prolifération cellulaire a montré un effet significatif de la taille de l'explant sur la prolifération des cals. Les taux les plus élevés (80,3 et 55,97 %) ont été enregistrés avec les explants de 5 et 2,5 mm, respectivement. Le plus faible taux de prolifération (25,72 %) a été enregistré avec les explants de 15 mm.

La coloration des cals varie selon la taille des explants. Les explants de 2,5 et 15 mm de longueur produisent des cals de couleur brune, ceux de 5 mm sont vert. Lorsque les explants mesurent 10 et 12,5 mm la couleur des cals varie du vert blanchâtre au vert brunâtre.

La friabilité des cals diminue avec l'augmentation de la taille. Les cals obtenus avec les explants de 12,5 et 15 mm ont une texture pâteuse, alors que ceux obtenus avec les explants de 2,5 ; 5 et 10 mm sont tous friables.

Les résultats ont montré que les explants de 5 mm de longueur ont été plus favorables à la callogenèse chez le cotonnier. Cette taille a donc été retenue pour la suite des expériences.

**Tableau XI. Influence de la taille de l'explant sur l'induction des cals**

0	TD (j)	TI (%)	PF (mg)	PS (mg)	T Prol (%)	Coul	Text	IF
2,5	9	41,29±33,78c	11,08±1,67c	1,69 ±0,28b	55,97 ±9,84b	brun	friable	++++
5	7	78,3 ± 7,93a	19,24±4,57a	2,27 ±0,60a	80,3 ± 3,91a	vert	Très fri	+++++
10	11	51,2 9±2,92b	4,22±0,98bc	0,45 ±0,17c	46,63±8,24bc	vert-bl	friable	++++
12,5	11	37,5 ± 2,26c	4,72±1,29bc	0,52 ±0,17c	39,18 ±6,94bc	vert-br	pâteux	++
15	11	35 ± 2,13c	2,14 ±0,41c	0,23± 0,10c	25,72 ± 4,79 c	brun	pâteux	++

Dans une même colonne, les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes (Test de Newman-Keuls au seuil 5 %); TD : temps de débourement ; j : jour ; TI : Taux d'induction ; PF : poids frais ; PS : poids sec ; T Prol : taux de prolifération ; Coul : Couleur ; Text : Texture ; IF : Indice de Friabilité ; +++++ : très friable ; ++++ : friable ; ++ : peu friable ou pâteux

#### 1.1.1.10. Influence de la position de l'explant sur l'induction des cals chez le cotonnier

L'effet de la position de l'explant sur l'induction des cals a montré que la position de l'explant a eu un effet significatif ( $p < 0,001$ ) sur le taux d'induction (Tableau XII). En effet, tous les explants ont induit des cals. Cependant, les explants situés à la base ont enregistré le plus fort taux d'induction (75,52 %). Ils sont suivis des explants de la partie proximale (60,0 %). Les cals issus de la partie médiane ont induit le taux le plus faible (56,60 %).

Les résultats ont aussi révélé que le poids des cals frais a significativement été influencé par la position de l'explant. Le poids le plus élevé (21,18 mg) des cals frais a été enregistré avec les explants situés à la base. Ensuite viennent les explants de la partie médiane

(11,60 mg) et enfin ceux de la partie proximale ont produit le plus faible poids des cals frais (9,03 mg).

Le poids des cals sec varie entre 0,46 et 2,3 mg. Les explants issus de la base ont enregistré le poids de cals sec le plus important (2,3 mg), alors que ceux issus de la partie proximale ont affiché le poids de la matière sèche le plus faible (0,46 mg).

Le taux de prolifération a significativement été influencé de la position de l'explant ( $p < 0,001$ ). Ce taux est très important pour les explants provenant de la base (82,7 %) et diminue au fur et à mesure que l'on avance vers la partie proximale (63,51 et 49,86 %, respectivement pour la partie médiane et la proximale). Tous les cals obtenus sont friables et présentent une coloration verte.

**Tableau XII. Influence de la position de l'explant sur la callogenèse chez le cotonnier**

Position	TD (j)	TI (%)	PF (mg)	PS (mg)	T Prol (%)	Coul	Text	IF
<b>Prox</b>	9	60,0± 1,05b	9,03 ± 1,03b	0,46±0,18b	49,86 ± 2,46c	Vert	friable	++++
<b>Médiane</b>	7	56,60±1,01b	11,60± 1,55b	0,79±0,37b	63,51±4,16b	Vert	friable	++++
<b>Base</b>	4	75,52±3,18a	21,18±3,92a	2,30±0,67a	82,70 ± 1,63a	Vert	friable	++++

Dans une même colonne, les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes (Test de Newman-Keuls au seuil 5 %); TD : temps de débourement ; j : jour ; TI : Taux d'induction ; PF : poids frais ; PS : poids sec ; T Prol : taux de prolifération ; Coul : Couleur ; Text : Texture; IF : Indice de Friabilité ; ++++ : friable

#### 1.1.1.11. Influence des anti-oxydants sur l'induction et le brunissement des cals

L'analyse du Tableau XIII montre que les anti-oxydants, ainsi que leur concentration exercent un effet hautement significatif ( $p < 0,001$ ) sur l'induction et le brunissement des cals. Le temps nécessaire pour induire les cals se situe entre quatre et sept jours pour tous les anti-oxydants testés à l'exception du  $MgCl_2$  à la concentration de  $0,25 \text{ g.L}^{-1}$  qui induit des cals au 15<sup>ème</sup> jours. Les taux d'induction les plus importants (75,52 %) a été enregistré avec le  $MgCl_2$  ( $0,75 \text{ g.L}^{-1}$ ). L'acide ascorbique et la cystéine à la concentration  $1 \text{ g.L}^{-1}$  ont induit les plus faibles taux (15,27 et 17,43 %, respectivement).

Les résultats montrent également que le poids des cals frais a été influencé par le type et la concentration de l'anti-oxydant. En effet, le  $MgCl_2$  à la concentration de  $0,75 \text{ g.L}^{-1}$  a enregistré le poids de cals frais le plus élevé (20,72 mg). Cet anti-oxydant est suivi de la cystéine  $0,75 \text{ g.L}^{-1}$  (8,17 mg). Les plus faibles poids de cals frais ont été observés avec l'acide ascorbique à la concentration de  $0,25 \text{ g.L}^{-1}$  avec 0,18 mg.

L'analyse du poids de calcs secs a révélé que le  $MgCl_2$  à la concentration de  $0,75 \text{ g.L}^{-1}$  a induit le poids de calcs sec le plus important (2,54 mg). Le poids de calcs sec le plus faible a été obtenu avec l'acide ascorbique à la concentration de  $0,25 \text{ g.L}^{-1}$  (0,05 mg).

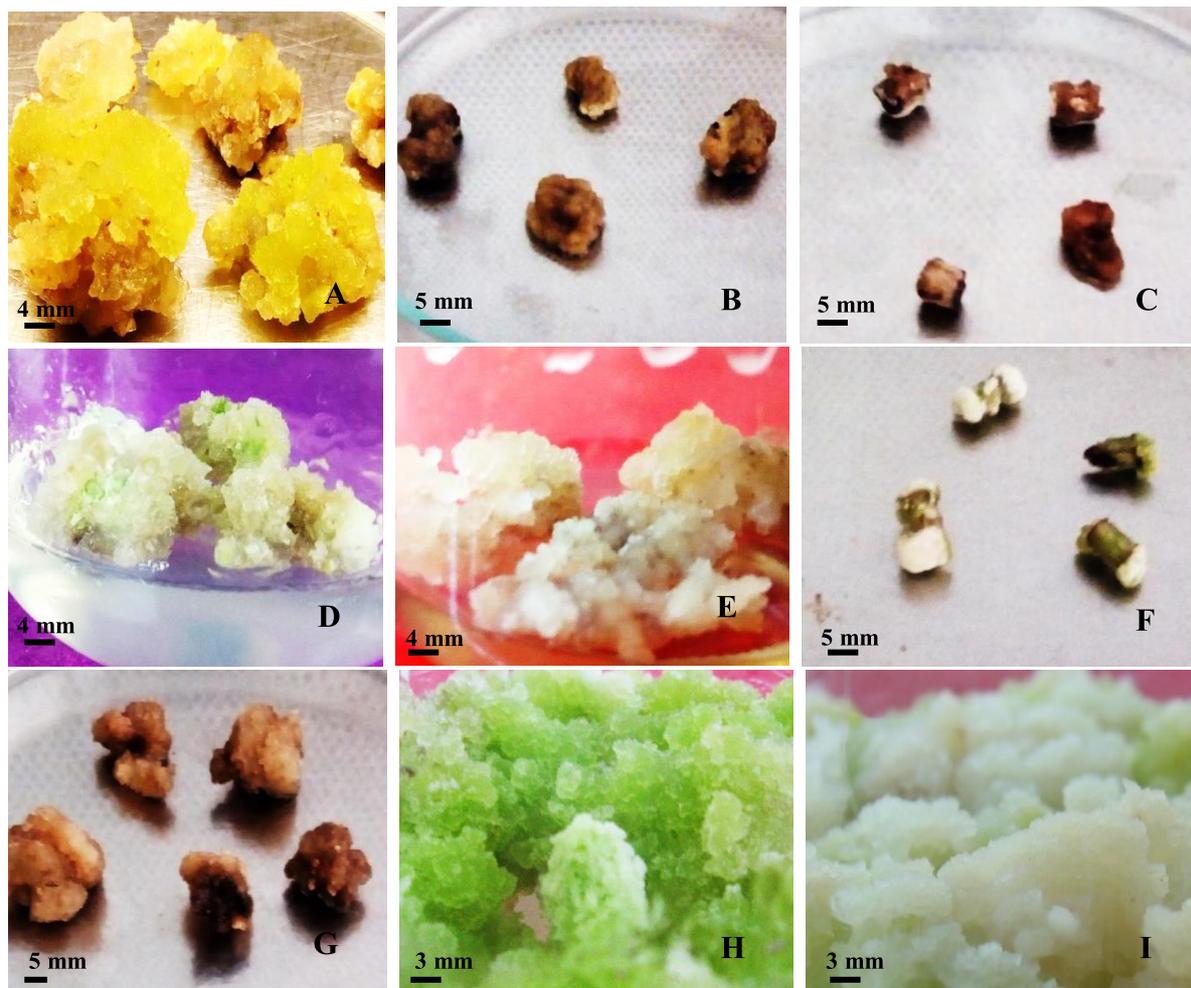
Les tests statistiques réalisés sur l'intensité de prolifération cellulaire ont montré que les anti-oxydants exercent un effet significatif sur ce paramètre (Figure 17). Ainsi, le plus fort taux de prolifération (77,32 %) a été enregistré avec le  $MgCl_2$  à la concentration de  $0,75 \text{ g.L}^{-1}$ . Les plus faibles taux de prolifération (24,47 et 19,47 %) ont été obtenus avec l'acide ascorbique et la cystéine à la concentration de  $1 \text{ g.L}^{-1}$ .

Les résultats ont révélé que certains anti-oxydants sont capables de réduire brunissement des calcs (Figure 17). Le  $MgCl_2$  à la concentration  $0,75 \text{ g.L}^{-1}$  a été plus efficace pour réduire le brunissement des calcs et a enregistré le poids de matière sèche le plus élevé. Il a donc été retenu pour la suite des expériences.

**Tableau XIII. Effet des anti-oxydants sur l'induction et le brunissement des calcs.**

Anti-Oxy	Conc ( $\text{g.L}^{-1}$ )	TD (j)	TI (%)	PF (mg)	PS (mg)	T Prol (%)	Coul	Text	IF
	<b>0,25</b>	4	66,46±1,30ab	0,18± 1,21c	0,05± 0,03c	58,66±0,54a	jaune	pâteux	++
<b>Ac</b>	<b>0,75</b>	7	33,75 ± 0,95c	0,68± 0,06c	0,13± 0,06c	56,06 ± 0,42a	blanc	pâteux	++
<b>Asc</b>	<b>1</b>	-	15,27± 0,1d	0,51 ± 0,03c	0,09 ± 0,02c	24,47± 0,1b	brun	pâteux	++
	<b>0,25</b>	15	56,46 ± 0,53b	0,97± 0,39c	0,12± 0,06c	42,65± 0,11ab	brun	Peu fr	+++
<b>Mg</b>	<b>0,75</b>	7	75,52 ± 2,03a	20,72±4,22a	2,54± 0,45a	77,32±2,76a	vert	Très fr	+++++
<b>Cl<sub>2</sub></b>	<b>1</b>	5	71,52 ± 2,03a	1,45 ± 0,59c	0,26± 0,12c	59,11± 0,56a	blanc	Peu fr	+++
	<b>0,25</b>	4	62,80 ± 1,03b	3,19±0,16bc	0,60± 0,02c	51,72±0,549ab	blvert	pâteux	++
<b>Cyst</b>	<b>0,75</b>	4	55,52 ± 2,03a	8,17 ± 0,01b	1,47±0,43b	52,89± 0,56ab	blanc	pâteux	++
	<b>1</b>	-	17,43± 0,1d	0,64 ± 0,07c	0,06 ± 0,03c	19,47± 0,1b	vert	pâteux	++

Dans une même colonne, les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes (Test de Newman-Keuls au seuil 5 %); Anti-oxy : antioxydant ; Ac Asc : acide ascorbique ;  $MgCl_2$  : Chlorure de magnésium ; Cyst : cystéine ; TD : temps de débourement ; j : jour ; TI : Taux d'induction ; PF : poids frais ; PS : poids sec ; T Prol : taux de prolifération ; Coul : Couleur ; Text : Texture ; IF : Indice de Friabilité ; fr : friable ; +++ : peu friable; +++++ : très friable ; ++ : pâteux.



**Figure 17. Cals de cotonnier induit sur milieu MSB5 supplémenté des anti-oxydants**

A : Acide ascorbique  $0,25 \text{ g L}^{-1}$ , B : Acide ascorbique  $0,75 \text{ g L}^{-1}$ , C : Acide ascorbique  $1 \text{ g L}^{-1}$ ; D : Cystéine  $0,25 \text{ g L}^{-1}$ , E : Cystéine  $0,75 \text{ g L}^{-1}$ , F : Cystéine  $1 \text{ g L}^{-1}$ ; G :  $\text{MgCl}_2$   $0,25 \text{ g L}^{-1}$ , H :  $\text{MgCl}_2$   $0,75 \text{ g L}^{-1}$ , I :  $\text{MgCl}_2$   $1 \text{ g L}^{-1}$

## 1.1.2. INDUCTION DE CELLULES EMBRYOGÈNES À PARTIR DE CALS DE COTONNIER

### 1.1.2.1. Influence de la source de carbone sur l'induction de cellules embryogènes

Les résultats de l'effet de la source de carbone sur l'induction de cellules embryogènes montrent que la source de carbone a significativement influencé ( $p < 0,05$ ) le taux d'induction de cellules embryogènes (Tableau XIV). Ainsi, le glucose a induit le taux le plus élevé d'embryons (64,58 %) contrairement au maltose qui a enregistré le plus faible taux d'embryons (29,94 %).

Les résultats du test de viabilité réalisé avec la solution du bleu de trypan après chaque culture a révélé que le milieu supplémenté de glucose a enregistré le plus fort taux de viabilité des embryons induits (Annexe 1 et 2). Le glucose a donc été retenu comme meilleur source de carbone en vue d'évaluer l'effet de sa concentration sur l'embryogenèse somatique.

Les tests réalisés avec différentes concentrations de glucose montrent que la concentration de 30 g.L<sup>-1</sup> de glucose a permis d'obtenir l'index embryogénique le plus élevé (0,67) suivi des concentrations de 40 g.L<sup>-1</sup> (0,51) et 50 g.L<sup>-1</sup> (0,47). La concentration de 20 g.L<sup>-1</sup> a enregistré le plus faible taux d'induction avec un index embryogénique de 0,39. La concentration de 30 g.L<sup>-1</sup> de glucose a été retenue pour la suite des travaux. (Tableau XV).

**Tableau XIV. Évaluation de l'effet de la source de carbone sur l'induction de cellules embryogènes**

Source de carbone (g.L <sup>-1</sup> )	Paramètres		
	Taux d'induction de cellules embryogènes (TIE %)	Nombre de cellules viables	Nombre de cellules non viables
<b>Témoin</b>	00 ± 00 d	5,9 ± 00 d	94,9 ± 0,21 a
<b>Maltose</b>	29,94 ± 0,02 c	37,01 ± 0,04 c	62,99 ± 0,13 b
<b>Saccharose</b>	46,74 ± 0,07 b	46,6 ± 0,07 c	53,4 ± 0,08 c
<b>Fructose</b>	30,40 ± 0,03 c	60,3 ± 0,12 b	39,7 ± 0,04 c
<b>Glucose</b>	64,58 ± 0,15 a	85,9 ± 0,19 a	14,1 ± 0,01 d

Dans une même colonne, les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes (Test de Newman-Keuls au seuil 5 %).

**Tableau XV. Évaluation de l'effet de la concentration du glucose sur l'induction de cellules embryogènes**

Concentration de glucose (g.L <sup>-1</sup> )	Paramètres	
	Index embryogénique	Taux d'induction de cellules embryogènes
Témoin	00 ± 00 d	00 ± 00 d
20	0,39 ± 0,001c	39,06 ± 0,03 c
30	0,67 ± 0,007 a	67,34 ± 0,17 a
40	0,51 ± 0,003 b	51,47 ± 0,1 b
50	0,47 ± 0,002 c	47,54 ± 0,06 b

Dans une même colonne, les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes (Test de Newman-Keuls 5 %).

### 1.1.2.2. Influence des acides aminés sur l'induction de cellules embryogènes

L'analyse du tableau XVI montre que les acides aminés ont un effet significatif ( $p < 0,003$ ) sur le taux d'induction de cellules embryogènes, le nombre de cellules viables, non viables et l'index embryogénique.

Ainsi, le milieu Aa<sub>1</sub> (MIE + 30 g.L<sup>-1</sup> glucose + 0,5 mg.L<sup>-1</sup> glutamine) a induit le taux de cellules embryogènes le plus élevé (47,31 %). Il est suivi du milieu Aa<sub>5</sub> (MIE + 30 g.L<sup>-1</sup> glucose + 0,5 mg.L<sup>-1</sup> glutamine + 0,2 g.L<sup>-1</sup> hydrolysate de caséine + 2 mg.L<sup>-1</sup> glycine) avec 37,26 %. Aucune cellule embryogènes n'a été observée sur le milieu témoin.

L'étude de l'index embryogénique a montré que le milieu Aa<sub>1</sub> contenant la glutamine a enregistré l'index embryogénique le plus élevé (0,47), suivi du milieu Aa<sub>5</sub> (0,37). Le plus faible index embryogénique a été enregistré avec le milieu Aa<sub>3</sub> (0,21).

Les tests réalisés avec la solution de bleu de trypan ont montré que le milieu Aa<sub>1</sub> a induit le nombre le plus élevé de cellules viables (81,35). En ce qui concerne les cellules non viables, le milieu témoin a induit le nombre le plus important de cellule non viables (Annexe 3).

**Tableau XVI. Influence des acides aminés sur l'induction de cellules embryogènes chez le cotonnier**

Acides Aminés	Paramètres			
	Index embryogénique	Taux d'induction de cellules embryogènes	Nombre de cellules viables	Nombre de cellules non viables
<b>Témoin</b>	00 ± 00 d	00 ± 00 d	04 ± 0,00 d	96,01 ± 0,23 a
<b>Aa1</b>	0,47 ± 0,003 a	47,31 ± 0,07 a	81,35 ± 0,17 a	18,65 ± 0,04 d
<b>Aa2</b>	0,27 ± 0,001 c	27,28 ± 0,02 c	31,88 ± 0,03 c	68,12 ± 0,14 b
<b>Aa3</b>	0,21 ± 0,001 c	21,47 ± 0,02 c	27,86 ± 0,02 c	72,14 ± 0,15 b
<b>Aa4</b>	0,25 ± 0,001 c	25,91 ± 0,02 c	37,51 ± 0,04 c	62,49 ± 0,13 b
<b>Aa5</b>	0,37 ± 0,002 b	37,26 ± 0,03 b	66,25 ± 0,13 b	33,75 ± 0,04 c

Dans une même colonne, les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes (Test de Newman-Keuls au seuil 5 %) ; Aa1 : MIE + 30 g.L<sup>-1</sup> glucose + 0,5 mg.L<sup>-1</sup> glutamine ; Aa2 : MIE + 30 g.L<sup>-1</sup> glucose + 0,5 mg.L<sup>-1</sup> glutamine + 0,2 mg.L<sup>-1</sup> asparagine ; Aa3 : MIE + 30 g.L<sup>-1</sup> glucose + 0,5 mg.L<sup>-1</sup> glutamine + 0,2 mg.L<sup>-1</sup> hydrolysate de caséine ; Aa4 : MIE + 30 g.L<sup>-1</sup> glucose + 0,5 mg.L<sup>-1</sup> glutamine + 0,2 mg.L<sup>-1</sup> asparagine + 2 mg.L<sup>-1</sup> glycine ; Aa5 : MIE + 30 g.L<sup>-1</sup> glucose + 0,5 mg.L<sup>-1</sup> glutamine + 0,2 g.L<sup>-1</sup> hydrolysate de caséine + 2 mg.L<sup>-1</sup> glycine.

### 1.1.2.3. Influence de la combinaison hormonale sur l'induction de cellules embryogènes

L'influence de la combinaison hormonale sur l'induction de cellules embryogènes a été testée. Les résultats montrent que la combinaison hormonale influence significativement le taux d'induction, l'index embryogénique le nombre de cellules viables et non viables (Tableau XVII).

En effet, le milieu H<sub>3</sub> (MIE + 30 g.L<sup>-1</sup> glucose + 0,1 mg.L<sup>-1</sup> 2,4-D + 0,5 mg.L<sup>-1</sup> KIN) a induit le plus fort taux d'embryons (74,52 %). Le milieu H<sub>2</sub> (MIE + 30 g.L<sup>-1</sup> glucose + 2 mg.L<sup>-1</sup> ANA + 0,1 mg.L<sup>-1</sup> 2,4-D) a induit le taux le plus faible de cellules embryogènes (26,94 %). De même, l'index embryogénique le plus élevé a été enregistré sur un milieu H<sub>3</sub> contenant (0,74) et le plus faible l'index embryogénique est obtenu sur le milieu H<sub>2</sub> contenant (MIE + 30 g.L<sup>-1</sup> glucose + 2 mg.L<sup>-1</sup> ANA + 0,1 mg.L<sup>-1</sup> 2,4-D) (0,26).

Aucune cellule embryogènes n'a été observée sur le milieu témoin. Le plus grand nombre de cellules viables a été induit sur le milieu H<sub>3</sub> contenant (MIE + 30 g.L<sup>-1</sup> glucose + 0,1 mg.L<sup>-1</sup> 2,4-D + 0,5 mg.L<sup>-1</sup> KIN) (88,79).

**Tableau XVII. Effet de la combinaison hormonal sur l'induction de cellules embryogènes**

Combinaison hormonale	Paramètres			
	Index embryogénique	Taux d'induction de cellules embryogènes	Nombre de cellules viables	Nombre de cellules non viables
Témoin	00 ± 00 d	00 ± 00 d	06 ± 0,001 d	94 ± 0,25 a
H <sub>1</sub>	0,42 ± 0,006 b	42,57 ± 3,15 b	59,66 ± 0,09 b	40,34 ± 0,05 c
H <sub>2</sub>	0,26 ± 0,001c	26,94 ± 2,39 c	36,42 ± 0,04 c	63,58 ± 0,14 b
H <sub>3</sub>	0,74 ± 0,08 a	74,52 ± 1,49 a	88,79 ± 0,2 a	11,21 ± 0,01d
H <sub>4</sub>	0,43 ± 0,004 b	43,89 ± 2,66 b	64,78 ± 0,13 b	35,22 ± 0,04 c
H <sub>5</sub>	0,37 ± 0,001 b	37,10 ± 3,20 b	58,9 ± 0,09 b	41,1 ± 0,08 c

Dans une même colonne, les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes (Test de Newman-Keuls au seuil 5 %) ; H<sub>1</sub> : MIE + 30 g.L<sup>-1</sup> glucose + 2 mg.L<sup>-1</sup> ANA + 0,5 mg.L<sup>-1</sup> KIN ; H<sub>2</sub> : MIE + 30 g.L<sup>-1</sup> glucose + 2 mg.L<sup>-1</sup> ANA + 0,1 mg.L<sup>-1</sup> 2,4-D ; H<sub>3</sub> : MIE + 30 g.L<sup>-1</sup> glucose + 0,1 mg.L<sup>-1</sup> 2,4-D + 0,5 mg.L<sup>-1</sup> KIN ; H<sub>4</sub> : MIE + 30 g.L<sup>-1</sup> glucose + 0,1 mg.L<sup>-1</sup> 2,4-D + 0,5 mg.L<sup>-1</sup> KIN + 0,1 mg.L<sup>-1</sup> Zéatine ; H<sub>5</sub> : MIE + 30 g.L<sup>-1</sup> glucose + 0,1 mg.L<sup>-1</sup> AIA + 0,1 mg.L<sup>-1</sup> 2,4-D.

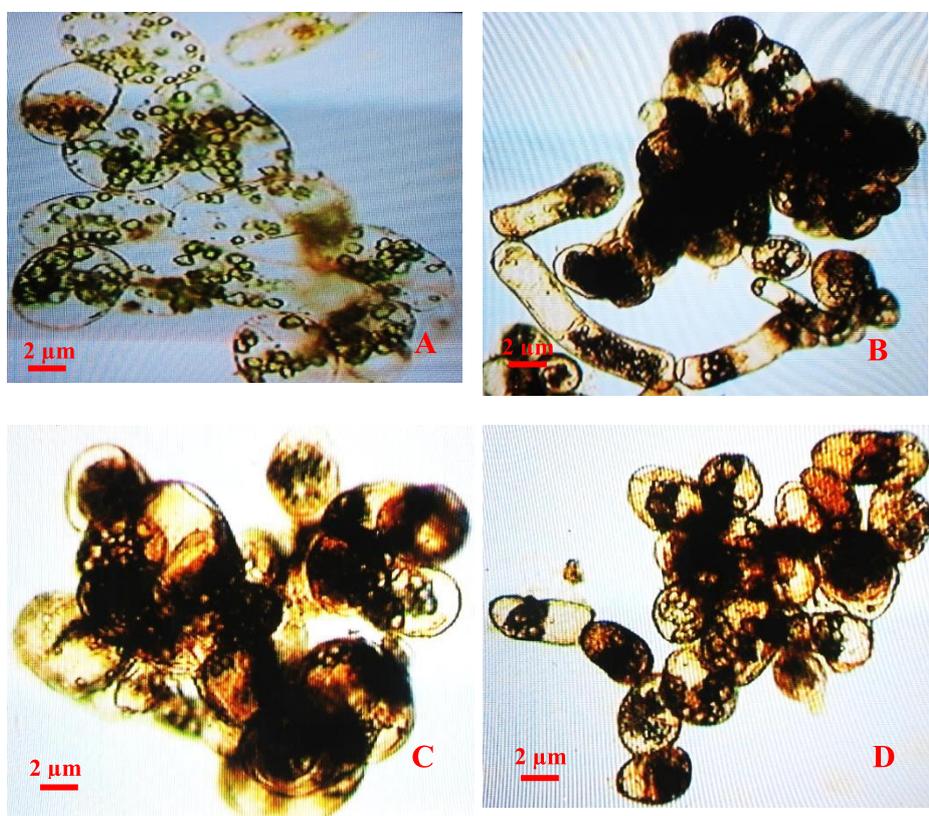
#### 1.1.2.4. Étude comparative des meilleurs milieux d'embryogenèse sur l'induction de structures embryogènes.

Les milieux d'induction d'embryon ayant permis d'obtenir le plus nombres de structures embryogènes ont été comparé entre eux. Les résultats ont montré que parmi les trois milieux retenus, certains sont plus embryogènes que d'autres. En effet, le milieu H<sub>3</sub> (MIE + 30 g.L<sup>-1</sup> de glucose + 0,1 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D + 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de KIN) a permis d'obtenir les plus grandes valeurs quel que soit le paramètre étudié avec 75,66 % ; 78,79 et 14,33 pour le taux d'induction de cellules embryogènes, le nombre de cellules viables et non viables, respectivement. Le milieu H<sub>3</sub> est suivi du milieu G30 (MIE + 30 g.L<sup>-1</sup> de glucose) qui induit 64,51 % pour le taux d'induction et 70,41 cellules viables (Tableau XVIII). Le milieu Aa<sub>1</sub> (MIE + 30 g.L<sup>-1</sup> de glucose + 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de glutamine) a induit le plus faible nombre de cellules embryogènes (45,52 %). Un témoin a été réalisé sur le milieu MSB5 + 30 g.L<sup>-1</sup> de glucose sans hormone ni acide aminé (Figure 18).

**Tableau XVIII. Étude comparative de l'influence des meilleurs milieux d'induction de structures embryogènes**

Milieux	Paramètres			
	Index embryogénique	Taux d'induction de cellules embryogènes	Nombre de cellules viables	Nombre de cellules non viables
<b>G30</b>	0,64 ± 0,006 b	64,51 ± 0,13 b	70,41 ± 0,16 b	17,22 ± 0,03 b
<b>Aa<sub>1</sub></b>	0,43 ± 0,004 c	45,52 ± 0,08 c	61,35 ± 0,14 c	27,35 ± 0,06 a
<b>H<sub>3</sub></b>	0,75 ± 0,06 a	75,66 ± 0,39 a	78,79 ± 0,24 a	14,33 ± 0,08 c

Dans une même colonne, les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes (Test de Newman-Keuls au seuil 5 %) ; G30 : MIE + 30 g.L<sup>-1</sup> glucose ; Aa<sub>1</sub> : MIE + 30 g.L<sup>-1</sup> glucose + 0,5 mg.L<sup>-1</sup> glutamine ; H<sub>3</sub> : MIE + 30 g.L<sup>-1</sup> glucose + 0,1 mg.L<sup>-1</sup> 2,4-D + 0,5 mg.L<sup>-1</sup> KIN.

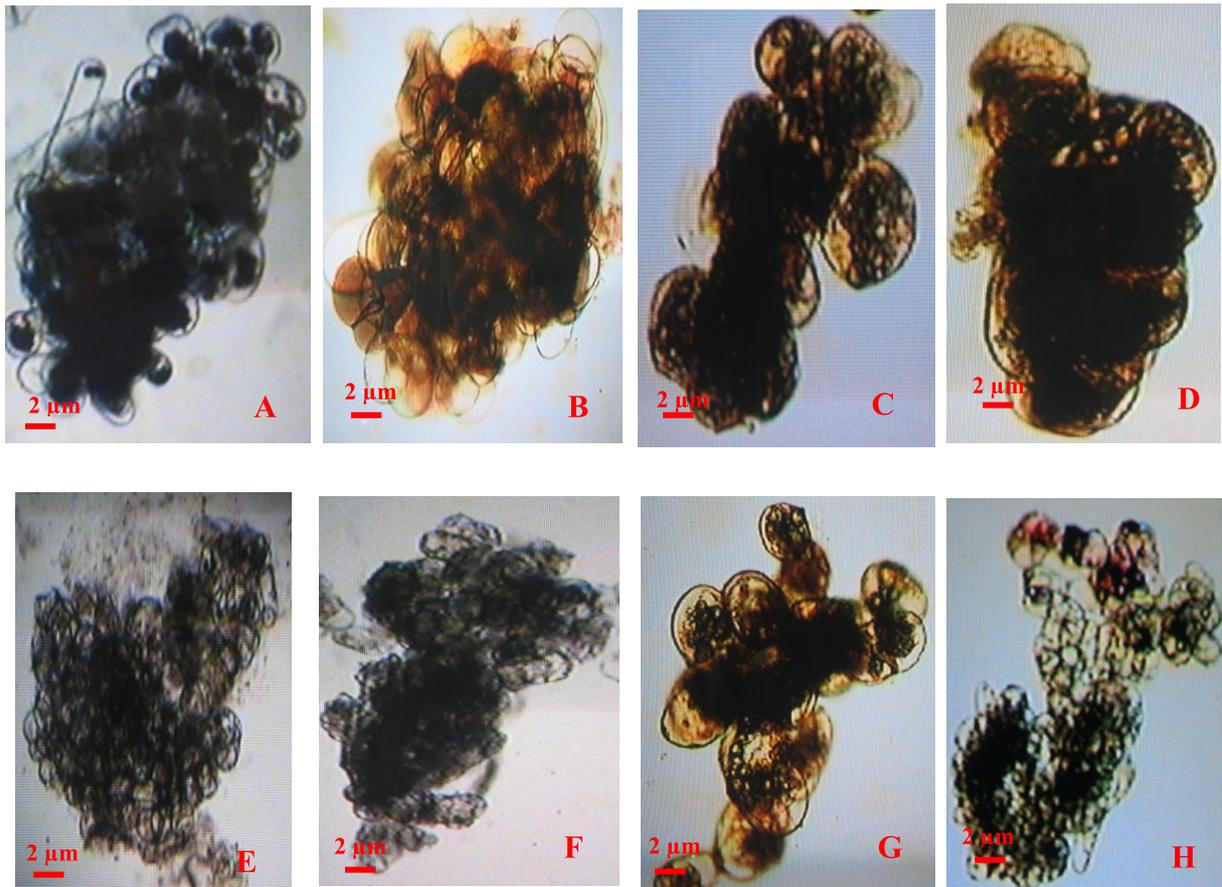


**Figure 18. Embryon de cotonnier induit sur différents milieux**

A : Témoin cellules non embryogènes ; B : MIE + 30 g.L<sup>-1</sup> glucose ; C : MIE +30 g.L<sup>-1</sup> glucose + 0,5 mg.L<sup>-1</sup> glutamine ; D : MIE + 30 g.L<sup>-1</sup> glucose + 0,1 mg.L<sup>-1</sup> 2,4-D + 0,5 mg.L<sup>-1</sup> KIN ; GX400

#### 1.1.2.4. Évaluation de la maturation et de la germination des embryons

Les résultats de la maturation des embryons révèlent que les embryons évoluent progressivement avec apparition de certains stades de l'embryogenèse somatique (Figure 19). La mise en culture sur le milieu de germination a révélé que ces embryons n'ont pas germés mais, étaient bien vivant d'après les tests réalisés avec le bleu de trypan (Annexe 4).



**Figure 19. Stades d'évolution des embryons somatiques sur le milieu de maturation**

A-B : embryon au stade globulaire ; C-D : embryon au stade cordiforme ; E-F : Stade cœur ; G-H : embryon au stade torpédo/cotylédonaire ; GX400

## 1.2. DISCUSSION

### Influence de la composition du milieu de culture sur la callogenèse

#### Source de carbone et concentrations de glucose

La réussite de la culture *in vitro* d'une espèce végétale est influencée par plusieurs facteurs dont les minéraux, les phytohormones, les glucides et la nature de l'explant (Kromer & Gamian, 2000; De Neto & Otoni, 2003). La callogenèse revêt une grande importance car le cal est un matériel idéal pour d'autres vitrocultures (Cao *et al.*, 2008). Dans cette étude, l'influence de la composition du milieu de culture sur l'induction des cals a été testée. Les résultats ont montré que la source de carbone exerce un effet significatif sur la callogenèse. Le temps de débourement a été plus rapide avec le glucose que les autres sources de carbone. Cette rapidité de la réponse des explants à la callogenèse sur le milieu contenant le glucose s'expliquerait par le fait que le glucose représenterait la forme la plus simple sous laquelle le sucre est assimilable par les végétaux (Richter, 1993). De plus, le glucose intervient dans le mécanisme de la photosynthèse. Des résultats similaires ont été obtenus par plusieurs auteurs au cours de leur études sur le cotonnier (Zouzou *et al.*, 2008) ; et l'ananas (Kouadio, 2018). Les autres sources de carbone doivent d'abord être transformés ou hydrolysés avant leur assimilation ce qui justifie les faibles taux d'inductions observés.

Au niveau des taux d'induction, le glucose s'est avéré plus bénéfique à l'induction des cals. Les meilleurs poids de matière sèche et fraîche ont également été observés avec le glucose. Ces résultats confirment ceux de Zouzou *et al.* (1997) selon lesquels, le glucose serait la forme la plus assimilable des sources de carbone mais produirait de fortes quantités d'énergie, entraînant une augmentation de la pression osmotique dans le milieu de culture. Sous l'effet de l'osmose, les minéraux passent des cellules les plus concentrées vers les moins concentrées (Richter, 1993). Le saccharose a induit les plus faibles valeurs pour tous les paramètres étudiés. Cela pourrait s'expliquer par le fait qu'en milieux acides (pH 5,8) il y a l'hydrolyse du saccharose en glucose et en fructose. Par conséquent, au cours de leur assimilation par les cellules végétales, il aurait une compétition entre ces sucres. Ces résultats sont en accord avec ceux de N'cho (2008). Cet auteur a montré que le saccharose a un effet défavorable sur la callogenèse du cotonnier et que cet effet est lié à l'absence ou la faible dégradation des enzymes. Contrairement à notre étude, les travaux de Kouadio *et al.* (2018) ont montré que le saccharose a un effet bénéfique sur la callogenèse chez l'ananas par rapport aux autres sucres. Cette différence d'action observée laisse suggérer que l'effet des hydrates de carbone est fonction du matériel végétal mis en culture. Chez le pois chiche par exemple Hakam *et al.* (2014) ont montré que le maltose est plus favorable à la prolifération des cals.

Par ailleurs, l'étude de la concentration de glucose a montré que les concentrations élevées de glucose ont induit les taux les plus importants. En effet, selon des études, les fortes concentrations de glucose augmentent la pression osmotique entraînant ainsi un stress osmotique. Ce stress favoriserait l'absorption des minéraux par les explants, d'où la prolifération rapide des cellules (Buffard-Morel, 1968 ; Rabéchault *et al.*, 1974). Aux concentrations de 20 et 30 g.L<sup>-1</sup>, les cals obtenus sont friables, de couleur blanchâtre et vert brunâtre favorable à l'embryogenèse somatique. Nos résultats sont en accord avec ceux de Trolinder & Goodin (1988) ; Kouakou (2003) ; Houalata *et al.* (2003) ; Fotso *et al.* (2003), qui ont montré que le glucose à la concentration de 30 g.L<sup>-1</sup> favorise l'induction de cals friables. La concentration de 30 g.L<sup>-1</sup> de glucose est plus favorable à la callogenèse chez le cotonnier.

### **Effet des hormones et de leurs concentrations**

La callogenèse chez le cotonnier comme chez plusieurs autres espèces est sous l'influence de la source de carbone et du type d'explant, mais aussi du type et de la concentration des hormones utilisés (Ren *et al.*, 2010). Le test réalisé avec les auxines a montré que le 2,4-D stimule la callogenèse à faible concentrations (0,1 et 0,5 mg.L<sup>-1</sup>), alors que les concentrations les plus élevées se sont avérées inhibitrices. Cela pourrait s'expliquer par le fait que parmi les auxines de synthèse, le 2,4-D est une auxine forte. Ainsi, les faibles concentrations seraient suffisantes pour entraîner une division accélérée des cellules alors que les doses élevées stimuleraient la production de substance inhibitrice (Naz & Khatoon, 2014).

D'autre part, l'action des auxines étant d'augmenter l'élasticité de la paroi cellulaire grâce à leur action sur une pompe située au niveau de la paroi cellulosique, va entraîner la sécrétion des protons qui brisent les liaisons de la paroi cellulaire pour la rendre élastique entraînant une division active des cellules. Ces résultats sont conformes à ceux de Naz & Khatoon (2014) qui ont montré chez l'*Achyranthes aspera* que les faibles concentrations de 2,4-D stimulent la callogenèse. L'ANA s'est révélée défavorable à la callogenèse chez le cotonnier quel que soit la concentration testée. Cela serait dû à la spécificité de réponse des explants en fonction de l'hormone. Nos résultats sont en désaccord avec les travaux de Koné (2010) qui a montré que l'ANA est bénéfique à l'induction des cals chez le voanzou (*Vigna subterranea*). Ce qui confirme la spécificité de réponse des espèces en fonction des hormones.

Cette étude a également montré que certaines cytokinines sont capables d'induire la callogenèse. La KIN à la concentration de 0,5 mg.L<sup>-1</sup> et les fortes concentrations de TDZ (1 et 1,5 mg.L<sup>-1</sup>) ont permis d'obtenir de cals. Cela serait due au fait que la principale action des cytokinines est de favoriser la division cellulaire c'est-à-dire la mitose des cellules végétales. Cette action augmenterait la synthèse des acides nucléiques et protéiques, entraînant la division cellulaire (Naz & Khatoon 2014). En effet, selon plusieurs auteurs dont Houndonougbo (1989), Savita *et al.* (2010) et Ramdan *et al.* (2014), les cytokinines exercent un effet positif sur la sensibilité des certaines cellules dites compétentes au cours de la callogenèse entraînant une division active de celles-ci. Les résultats ont également montré que les taux d'induction les plus importants ont été observés avec la TDZ. Cependant, les cals obtenus avec cette hormone sont compacts donc défavorables à l'embryogenèse somatique. Ce test montre clairement que la concentration de 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de KIN est plus bénéfique à la callogenèse.

L'effet de la combinaison hormonale sur la callogenèse a été étudié. Les résultats ont montré que la combinaison hormonale favorise l'induction et la prolifération cellulaire. Le taux d'induction augmente significativement lorsque le milieu de culture est additionné de 2,4-D et KIN aux concentrations de (0,1 et 0,5 mg.L<sup>-1</sup>). De plus, les cals obtenus avec cette combinaison sont friables et de coloration verte, favorables l'embryogenèse somatique. Cela pourrait s'expliquer par le fait que le 2,4-D étant une auxine forte, lorsqu'il est utilisé à faible dose associé à des concentrations plus ou moins élevé de KIN entraîne une importante production de cal. Ces résultats confirment ceux de Zouzou *et al.* (2008) qui ont observé que les faibles concentrations de 2,4-D additionnées aux fortes concentrations de KIN stimulent la callogenèse chez le cotonnier. La BAP qui seule s'est révélé défavorable à la callogenèse a induit des cals en présence de 2,4-D. Cette combinaison a également stimulé la formation des racines. En effet selon Abdellatef & Khalafallah (2008), les auxines utilisées seules ou en combinaison stimulent la rhizogenèse. Au cours de cette étude, nous avons observé que lorsque la TDZ est additionnée au 2,4-D, elle induit des cals de textures pâteuses. Cela s'expliquerait par le fait qu'il existerait dans la composition de cette cytokinine une auxine endogène. Ainsi, l'ajout du 2,4-D entraînerait un excès d'auxine dans le milieu de culture qui favoriserait une forte absorption d'eau et de minéraux induisant des cals de texture pâteuse. L'action de phytohormones semble être spécifique à chaque espèce. Ainsi, Zatimeh *et al.* (2017) ont testé avec succès la combinaison 2,4-D/TDZ sur la callogenèse du *Peganum harmala* et ont obtenu un taux de callogenèse de 100 %. Plusieurs auteurs ont montré le rôle

primordiale du 2,4-D sur la callogenèse chez le cotonnier (Naz & Khatoon, 2014 ; Davidonis & Hamilton, 1983; Wang *et al.*, 2004; Cao *et al.*, 2008). Au niveau de la combinaison hormonale, l'association 2,4-D/KIN aux concentrations de 0,1 et 0,5 mg.L<sup>-1</sup> favorise l'induction et la prolifération des cals chez le cotonnier.

### **Effet de la nature et du type d'explant**

L'influence du type d'explants (racine, hypocotyle et cotylédon) sur la calculture a montré que l'hypocotyle a enregistré le taux le plus important quel que soit le paramètre étudié. La source de l'explant et probablement sa structure anatomique semble jouer un rôle important dans l'induction des cals chez le cotonnier. Cette spécificité des explants pourrait s'expliquer par une réactivité ou une sensibilité différentielle des tissus au milieu de culture. Ces résultats confirment ceux de Zhang *et al.* (2001) et Kouakou *et al.* (2014) selon lesquels chez le cotonnier, l'hypocotyle induit le taux le plus important de cals contrairement à la racine et au cotylédon. Chez l'ananas (*Ananas comosus*) par contre, les feuilles sont plus favorables à l'induction de cals (Kouadio, 2018). Ces différences de réponses selon le type d'explant d'une même espèce ont également été observées chez d'autres espèces végétales telles que *Triticum aestivum* et *Theobroma cacao*. Chez *Theobroma cacao*, les travaux d'Ishii *et al.* (2004) ont montré que le type d'explant a un effet significatif sur l'induction des cals.

L'étude de l'âge de l'explant a montré que les jeunes explants (quatre et sept jours) ont été plus favorables à la callogenèse. Cela pourrait s'expliquer par le fait que les méristèmes sont situés dans l'apex des plantes c'est à dire dans les cellules les plus jeunes. Selon des études, l'état juvénile offre plus de possibilité de régénération car, les divisions cellulaires y sont plus actives (Saadi & Hamdani, 2007). De plus, Kawtar *et al.* (2015) ont mentionné que la capacité des explants à induire des cals diffère suivant le génotype et le stade de prélèvement. Les explants âgés de quatre jours ont non seulement débouffé les premiers, mais sont passés par une organogenèse avant d'entamer leur dédifférenciation. Cette aptitude à l'organogenèse s'expliquerait par le fait que les cellules étant très jeunes, elles continueraient leur croissance les premiers jours après leur mise en culture avant de se dédifférencier. Chez le blé (*Triticum aestivum*) Mzouri & Amssa (2002) ont obtenu des cals dès le troisième jour avec des embryons immatures. Ils ont ainsi montré que la capacité à la callogenèse est plus améliorée lorsque les explants sont des embryons immatures. Cette aptitude à la callogenèse des cellules jeunes pourrait s'expliquer par la fragilité de leurs structures membranaires qui favoriseraient la pénétration des hormones et des éléments minéraux. Les explants âgés de sept jours se sont révélés plus favorables à la callogenèse. Ces explants ont enregistré les valeurs le plus élevées pour tous les paramètres étudiés. Tautorius (1990) a montré que les

explants plus jeunes sont plus favorables à la régénération *in vitro* parce que les divisions cellulaires y sont plus importantes.

Les résultats ont aussi montré que les explants les plus âgés (16 jours) ont été défavorables à la callogenèse. Cela s'expliquerait par le fait qu'après 16 jours les tissus des vitroplants étant plus différenciés, les divisions cellulaires y sont moins intenses. De plus, les explants âgés ont induit des cals de texture pâteuse. Cette texture pâteuse pourrait s'expliquer par le fait que les cellules étant plus âgées, les tissus sont lignifiés et les divisions cellulaires y sont plus lentes entraînant une accumulation d'eau et des nutriments dans les tissus. Les explants d'hypocotyle âgés de sept jours répondent mieux à la callogenèse.

Par ailleurs, la taille de l'explant étant un paramètre fondamental dans la réussite des techniques *in vitro*, des explants de différentes tailles ont été mis en culture. Les résultats ont montré que le taux d'induction callogénique diminue avec l'augmentation de la taille de l'explant. Cela s'explique par le fait que les équilibres endogènes des explants de grandes tailles sont plus influencés par les conditions externes, ce qui réduit la réponse de ces explants à la callogenèse (Ghomari, 2014). Ainsi en culture *in vitro*, la taille des fragments doit être comprise entre 5 et 10 mm (Saadi & Hamdani, 2007). Chez le cotonnier, cette étude a montré que la taille favorable pour une bonne callogenèse est de 5 mm.

Concernant la position de l'explant, les résultats ont montré que la position de l'explant influence le taux d'induction des cals. En effet, le temps de débourrement diffère d'une partie à l'autre pour un même explant. Ainsi, les explants situés à la base débourrent plus tôt (quatre jours) que ceux de la partie médiane et proximale. En effet, au niveau de l'hypocotyle, les tissus des différentes zones n'étant certainement pas homogènes, auraient des besoins nutritifs spécifiques différents, et répondraient différemment à la callogenèse sur le même milieu de culture. Selon Haouala *et al.* (2010), l'induction de cals est sous la dépendance de la position de l'explant mis en culture. D'autre part, la synthèse des cytokinines se faisant dans l'apex des racines et transportée vers le sommet de la plante, la base de l'hypocotyle serait plus riche en cytokinines qui ont pour rôle de favoriser la division cellulaire. Ainsi, dans une étude réalisée sur le voanzou (*Vigna subterranea*), Konaté *et al.* (2013) ont montré que toutes les parties d'une plante sont capables d'induire les cals. Cependant, la position et l'orientation de l'explant influencent la réponse à la callogenèse (Mathews, 1987).

De plus, le poids des cals frais a significativement été influencé par la position de l'explant. Les explants situés à la base ont enregistré le poids des cals frais le plus important. Cette différence de poids serait due au fait que les explants situés à la base étant plus gros, en

présence des hormones continuent les divisions cellulaires en même temps que les autres explants. Aussi, la composition physiologique des différentes parties de serait différente. Ainsi selon Haoula *et al.* (2010), la masse fraîche des cals dépend non seulement du milieu de callogenèse, du type mais surtout de la position de l'explant. Au vu de ce qui précède, l'induction et la prolifération de cals chez le cotonnier est favorisé par les explants situés à la base de tige (juste au-dessus du collet).

### **Effet des antioxydants sur le brunissement des cals**

Les techniques de multiplication *in vitro* entraînent parfois la synthèse de certains composés tels que les composés phénoliques. Ces composés par leur action brunissent les milieux de culture et dans certains cas, les cals (Kouakou, 2009). L'ajout des antioxydants aux milieux de culture est donc indispensable pour pallier ce problème. Trois antioxydants à savoir le chlorure de magnésium ( $MgCl_2$ ), l'acide ascorbique (Ac Asc), et la cystéine (Cyst) ont été ajoutés au milieu de culture afin d'évaluer leur effet sur l'induction et le brunissement des cals. Les résultats ont montré que le type et la concentration de l'antioxydant ont un effet sur l'induction et le brunissement des cals. Dans cette étude, l'ajout de l'acide ascorbique à faible concentration dans le milieu de culture induit des cals de coloration jaunâtre. Alors que, les concentrations plus élevées se sont avérées non seulement peu favorables à la callogenèse mais ont bruni les explants et les cals mis en culture. Nous pensons que l'acide ascorbique aurait un effet direct sur l'induction des cals à faibles concentrations. En effet, selon Desjardins & Gosselin (1987) l'acide ascorbique est un composé instable en solution aqueuse. Sous forme ionisée, il s'oxyde facilement en acide déshydroascorbique. Cette oxydation pourrait être à l'origine du brunissement des explants et des cals (Löschner *et al.*, 1990 ; Stamford, 2012). De plus, Les produits d'oxydation de l'acide ascorbique, ainsi que l'acide ascorbique lui-même sont capables de réagir avec des dérivés aminés et des protéines. Ils participent ainsi au brunissement enzymatique, au même titre que les oses (Ziderman *et al.*, 1989).

Concernant la cystéine, les résultats ont révélé que cet antioxydant induit des cals de coloration verte ou blanchâtre. Ces résultats confirment ceux de Robert (1991) selon lesquels la cystéine est capable d'inhiber le brunissement enzymatique en formant avec les quinones issues des réactions d'oxydation des composés stables. Selon des études, la couleur du complexe formé dépend du rapport cystéine/phénol. Ainsi, en présence d'une quantité suffisante d'acides aminés, le complexe sera incolore (Walker & Reddish, 1964). Chez la poire (*Pyrus communis*) par exemple, Montgomery (1983) a révélé que la cystéine agissait sur le brunissement en empêchant la formation de produits bruns.

Au niveau du  $MgCl_2$ , les tests ont montré que les faibles doses induisent le brunissement des cals. Cela s'expliquerait par le fait qu'à faible dose, cet antioxydant ne serait pas capable d'oxyder les substances phénoliques excrétées par les explants. Ainsi, les composés phénoliques libérés entraînent le brunissement des cals et du milieu de culture. Cependant, utilisé à forte dose, le  $MgCl_2$  réduit fortement le brunissement des cals induisant des cals de coloration verdâtre ou blanchâtre. Ces colorations pourraient s'expliquer par le fait que la concentration optimum de  $MgCl_2$  permettant d'oxyder les substances phénoliques serait de  $0,75 \text{ g.L}^{-1}$ . Plusieurs auteurs dont Trolinder & Goodin (1988) ; Zouzou *et al.*, (2008) ; Kouakou (2009) ont utilisé avec succès le  $MgCl_2$  à la concentration de  $0,75 \text{ g L}^{-1}$  et ont obtenu des cals de couleur verte. Les cals obtenus en présence de cet antioxydant sont friables et plus volumineux. La callogenèse revêt une importance capitale car elle permet de faire d'autres types de cultures notamment l'induction d'embryon.

## **Induction de cellules embryogènes chez le cotonnier**

### **Effet de la source de carbone et de la concentration de glucose**

Dans cette étude, l'influence de la composition du milieu a été testée sur l'induction de cellules embryogènes. Les résultats ont montré que la source de carbone influence la formation des cellules embryogènes. Le glucose a permis d'obtenir le taux d'induction de cellules embryogènes le plus élevé. Cela est dû au fait que parmi les sources de carbone, le glucose est la forme la plus assimilable par les végétaux car il fournit l'énergie à l'explant et participe au mécanisme de la photosynthèse (Richter, 1993). En effet, selon Firoozabady & Deboer (2006) et Kouakou (2009), le glucose utilisé comme source de carbone chez le cotonnier favorise l'induction d'embryons somatiques. De même, chez le pêcher (*Prunus persica*), Declerck *et al.* (1986) ont montré que le glucose et le sorbitol ont donné de meilleurs résultats par rapport au fructose et au saccharose. L'action des sources de carbone sur l'induction des embryons semble être spécifique à chaque espèce. Chez l'ananas (*Ananas comosus*) Yapo (2013) ; Kouadio (2018) et l'olivier (*Olea europaea*) Brhadda *et al.* (2006); ont montré que le saccharose favorise l'induction et la prolifération de cellules embryogènes. Le glucose semble être la meilleure source de carbone pour induire les embryons chez le cotonnier.

Au niveau de la concentration de glucose, les résultats ont montré que les faibles concentrations de glucose ont permis d'obtenir le taux le plus élevé de cellules embryogènes chez le cotonnier. Les fortes concentrations inhibent l'induction de cellules embryogènes. Cela s'expliquerait par le fait que les fortes concentrations entraîneraient une augmentation de la pression osmotique induisant un stress dans le milieu. Cette pression osmotique entraîne une forte absorption des sucres et des minéraux. Il s'en suit une accumulation de sucre dans les cellules conférant aux cals la coloration brune. D'autre part, l'augmentation de la pression osmotique serait néfaste pour les embryons qui sont des structures fragiles. Kumar *et al.* (2013) ont obtenu des résultats similaires. Chez le cotonnier, des travaux ont révélé que le glucose à la concentration de 30 g.L<sup>-1</sup> est idéale pour la prolifération cellulaire et l'induction d'embryon (Trolinder & Goodin, 1988 ; Kouakou, 2009 ; Koné, 2010). Chez l'olivier par contre, Brhadda *et al.* (2008) ont montré que le saccharose à la concentration de 30 g.L<sup>-1</sup> est plus favorable au développement des embryons somatiques. Selon des auteurs la concentration de sucre généralement utilisée pour l'induction et le développement des embryons chez plusieurs espèces est compris entre 20 et 30 g.L<sup>-1</sup> (Han *et al.*, 1989 ; Rout *et al.*, 1991). Cependant, certaines espèces telles que l'asperge (*Asparagus officinalis*) et le chrysanthème (*Chrysanthème hortorum*) nécessitent des concentrations plus élevées de

saccharose allant jusqu'à 50 g.L<sup>-1</sup> (Komura *et al.*, 1990 ; May *et al.*, 1991). Cela signifie que l'effet de la concentration des sources de carbone est fortement influencé par le génotype.

### **Effet des acides aminés sur l'induction de cellules embryogènes**

En ce qui concerne les acides aminés, l'ajout de 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de glutamine a induit le taux le plus élevé de cellules embryogènes. Cela serait due au fait qu'une fois dans le milieu de culture, les acides aminés fournissent aux cellules une source d'azote qui serait rapidement utilisée par ces cellules pour stimuler l'embryogenèse. Selon Yapo (2013), l'azote est utilisé sélectivement sous forme de nitrate pour l'induction des embryons. Par conséquent, le niveau élevé de nitrate aurait un effet positif sur l'induction des cellules embryogènes. Nos résultats sont en accord avec ceux de Price & Smith (1979), Davidonis & Hamilton (1983) qui ont montré chez *Gossypium klotzschianum* que la présence de la glutamine dans le milieu permet d'obtenir un nombre élevé d'embryons. Les acides aminés ont déjà été utilisés pour induire les embryons chez d'autres espèces. Chez l'ananas, Kouadio (2018) a montré que la présence de la glutamine dans le milieu induit un grand nombre de cellules embryogènes. La présence de l'hydrolysate de caséine associé à la glycine semble stimuler la formation de cellules embryogènes. Ces résultats corroborent ceux de Rangan, (1984) qui a observé que l'hydrolysate de caséine induit des embryons.

Les milieux Aa<sub>2</sub> (MIE + 30 g.L<sup>-1</sup> glucose + 0,5 mg.L<sup>-1</sup> glutamine + 0,2 mg.L<sup>-1</sup> asparagine), Aa<sub>3</sub> (MIE + 30 g.L<sup>-1</sup> glucose + 0,5 mg.L<sup>-1</sup> glutamine + 0,2 mg.L<sup>-1</sup> hydrolysate de caséine) et Aa<sub>4</sub> (MIE + 30 g.L<sup>-1</sup> glucose + 0,5 mg.L<sup>-1</sup> glutamine + 0,2 mg.L<sup>-1</sup> asparagine + 2 mg.L<sup>-1</sup> glycine) ont été peu favorables à l'induction d'embryon. Cela pourrait s'expliquer par les différentes combinaisons effectuées. Car selon Finer (1988), la glutamine stimule l'induction des embryons. Cependant, lorsqu'elle est combinée à l'asparagine on observe une diminution du nombre de cellules embryogènes. Le milieu d'induction d'embryon (MIE) additionné de 0,5 mg L<sup>-1</sup> de glutamine est plus embryogène chez le cotonnier.

### **Effet de la combinaison hormonale sur l'induction de cellules embryogènes**

Au niveau de la combinaison hormonale, le milieu H<sub>3</sub> (MIE + 30 g.L<sup>-1</sup> glucose + 0,1 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D + 0,5 mg L<sup>-1</sup> KIN) a induit le taux le plus élevé de cellules embryogènes. Cet effet bénéfique de cette combinaison hormonale sur l'induction d'embryons s'expliquerait par l'absence du NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> et la double concentration du KNO<sub>3</sub> dans le milieu de culture qui entrainerait un stress. Ainsi, en présence du couple 2,4-D/KIN qui est l'hormone de référence dans la culture *in vitro* du cotonnier favoriserait l'induction de structures embryogènes. D'autre part, le stress causé par l'absence du NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> et la double concentration du KNO<sub>3</sub>

augmente le nombre d'embryons selon Davidonis & Hamilton (1983) ; Kumar *et al.* (2013). Selon plusieurs auteurs dont Zouzou *et al.* (2008), Kouakou *et al.* (2009), Robinson *et al.* (2011) chez le cotonnier, la combinaison 2,4-D/KIN est bénéfique pour induire les embryons. En culture *in vitro*, les hormones et plus particulièrement le couple auxine/cytokinine joue un rôle important dans l'induction de l'embryogenèse. Leur présence permet l'initiation de la callogenèse, puis l'acquisition des compétences embryogenèse de certaines cellules selon Koné (2010). De plus parmi les auxines synthétiques, le 2,4-D est une hormone capable d'induire des embryons somatiques lorsqu'il est utilisé seul ou en combinaison (Rathore *et al.*, 2015 ; Raju *et al.*, 2013). L'influence des hormones sur l'induction des embryons semble être liée à la variété. En effet, Kouadio (2018) a montré que chez l'ananas l'induction de structures embryogènes est favorisée par la combinaison Picloram/BAP. Le milieu H<sub>1</sub> (MIE + 30 g.L<sup>-1</sup> glucose + 2 mg L<sup>-1</sup> ANA et 0,5 mg L<sup>-1</sup> KIN) a également permis d'induire des embryons. Nos résultats coïncident avec ceux de Davidonis & Hamilton (1983) qui ont montré que la combinaison ANA/KIN est favorable à l'induction et la prolifération d'embryons somatiques chez certaines variétés de cotonniers.

Après induction de cellules embryogènes, un test de maturation puis de germination a été réalisé. Les résultats ont montré l'apparition de certains stades de l'embryogenèse somatique. La mise en culture de ces embryons sur le milieu de germination a révélé que ceux-ci n'ont pas germés mais, étaient bien vivant d'après le test réalisé avec la solution du bleu de trypan. Cela signifie que l'embryogenèse chez le cotonnier est fortement liée au génotype. Cet effet génotypique sur la régénération *in vitro* a déjà été signalé par plusieurs auteurs dont Trolinder & Gooding (1962) ; Kouadio (2004) et Kouakou (2009).

### 1.3. CONCLUSION PARTIELLE

L'objectif premier de cette étude était de déterminer un milieu optimal de callogenèse, en vue de produire un maximum d'amas cellulaire capable d'induire des embryons somatiques. Ceux-ci pourraient être le point de départ de l'amélioration du cotonnier par l'incorporation de certains caractères intéressants. Un protocole a été élaboré dans le but de déterminer le milieu et l'explant idéal favorable pour induire des cals friables et aptes à initier des embryons somatiques. Au terme de cette étude, le milieu MSB5 + 30 g.L<sup>-1</sup> glucose + 0,75 g.L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub> + 0,1 mg.L<sup>-1</sup> 2,4-D + 0,5 mg L<sup>-1</sup> KIN s'est révélé plus favorable à l'induction de cals. Aussi, la partie basale de l'hypocotyle âgé de sept jours et long de 5 mm a une potentialité callogénique plus élevée en comparaison avec les explants cotylédonaire et racinaires. En somme le meilleur milieu de callogenèse chez le cotonnier est le milieu Murashige & Skoog (1962) additionné des vitamines B5 de Gamborg (1968) + 30 g.L<sup>-1</sup> glucose + 0,75 g.L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub> + 0,1 mg.L<sup>-1</sup> 2,4-D + 0,5 mg L<sup>-1</sup> KIN. Une bonne callogenèse est caractérisée par des cals de texture friable et de coloration verte.

En ce qui concerne l'embryogenèse somatique, les observations microscopiques montrent la présence de cellules embryogènes. L'induction d'embryons serait sous le contrôle du rapport NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>/HNO<sub>3</sub> de l'interaction source de carbone, phytohormones et des acides aminés. Ainsi, le glucose (30 g.L<sup>-1</sup>), la glutamine et le couple 2,4-D/Kin sont plus bénéfiques pour l'induction d'embryons chez le cotonnier.

Le test de viabilité a permis de comprendre que les cellules embryogènes n'étaient pas nécrosées. Le problème de régénération du cotonnier n'est donc pas dû à la nécrose des embryons mais au génotype. Le meilleur milieu d'induction d'embryon chez le cotonnier est le MBS5 - NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> + 2 HNO<sub>3</sub> + 30 g.L<sup>-1</sup> glucose + 0,1 mg.L<sup>-1</sup> 2,4-D + 0,5 mg.L<sup>-1</sup> KIN. Les cellules embryogènes sont des cellules arrondies, luisantes et à cytoplasme dense.

## 2. ÉTUDE DE QUELQUES COMPOSÉS INTERVENANT AU COURS DE L'EMBRYOGENÈSE SOMATIQUE

### 2.1. RÉSULTATS

#### 2.1.1. Influence du milieu de culture sur la teneur en composés biochimiques des cals

Les teneurs en phénols totaux, sucres totaux et protéines des cals embryogènes et non embryogènes sont présentées dans le tableau XIX. Les résultats montrent que la teneur en composés biochimiques diffère selon le type de cals. En effet, l'analyse des données a montré que les cals embryogènes ont induit des teneurs élevées en phénol totaux et en protéines (144,22 et 103,47  $\mu\text{g/g}$  de cals frais) par rapport aux cals non embryogènes (43,2 et 61,50 de  $\mu\text{g/g}$  cals frais, respectivement).

Au niveau des sucres totaux, les résultats ont montré une légère augmentation de la teneur en sucre dans les cals embryogènes (12,54  $\mu\text{g/g}$  de cals frais) en comparaison aux cals non embryogènes (10,45  $\mu\text{g/g}$  de cals frais).

Les phénols et les protéines ont influencés l'induction de cellules embryogènes contrairement aux sucres totaux. Ceci nous a conduit à faire une analyse qualitative des composés phénoliques et une étude des protéines enzymatiques impliquées dans le métabolisme de ces composés.

**Tableau XIX. Teneur en composés biochimiques des cals embryogènes et non embryogènes**

Composés	Teneur en composés des cals ( $\mu\text{g/g}$ cals frais)	
	Cals embryogènes	Cals non embryogènes
Phénols totaux	144,22 $\pm$ 1,05 a	43,20 $\pm$ 0,81 b
Protéines	103,47 $\pm$ 1,57 b	61,50 $\pm$ 0,46 a
Sucres totaux	12,54 $\pm$ 0,35 a	10,45 $\pm$ 0,3 b

Sur une même ligne, les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes (Test de Newman-Keuls au seuil 5 %).

#### 2.1.2. Étude des différents composés impliqués dans le métabolisme phénoliques au cours de l'induction de cellules embryogènes

##### 2.1.2.1. Analyse qualitative et identification des composés phénoliques

L'analyse par Chromatographie Liquide Ultra Haute Performance (UHPLC) a permis d'identifier les composés phénoliques présents dans les cals non embryogènes (A) issus du milieu (MSB5 + 30  $\text{g.L}^{-1}$  glucose + 0,5  $\text{mg.L}^{-1}$  KIN + 0,1  $\text{mg.L}^{-1}$  2,4-D) et les cals

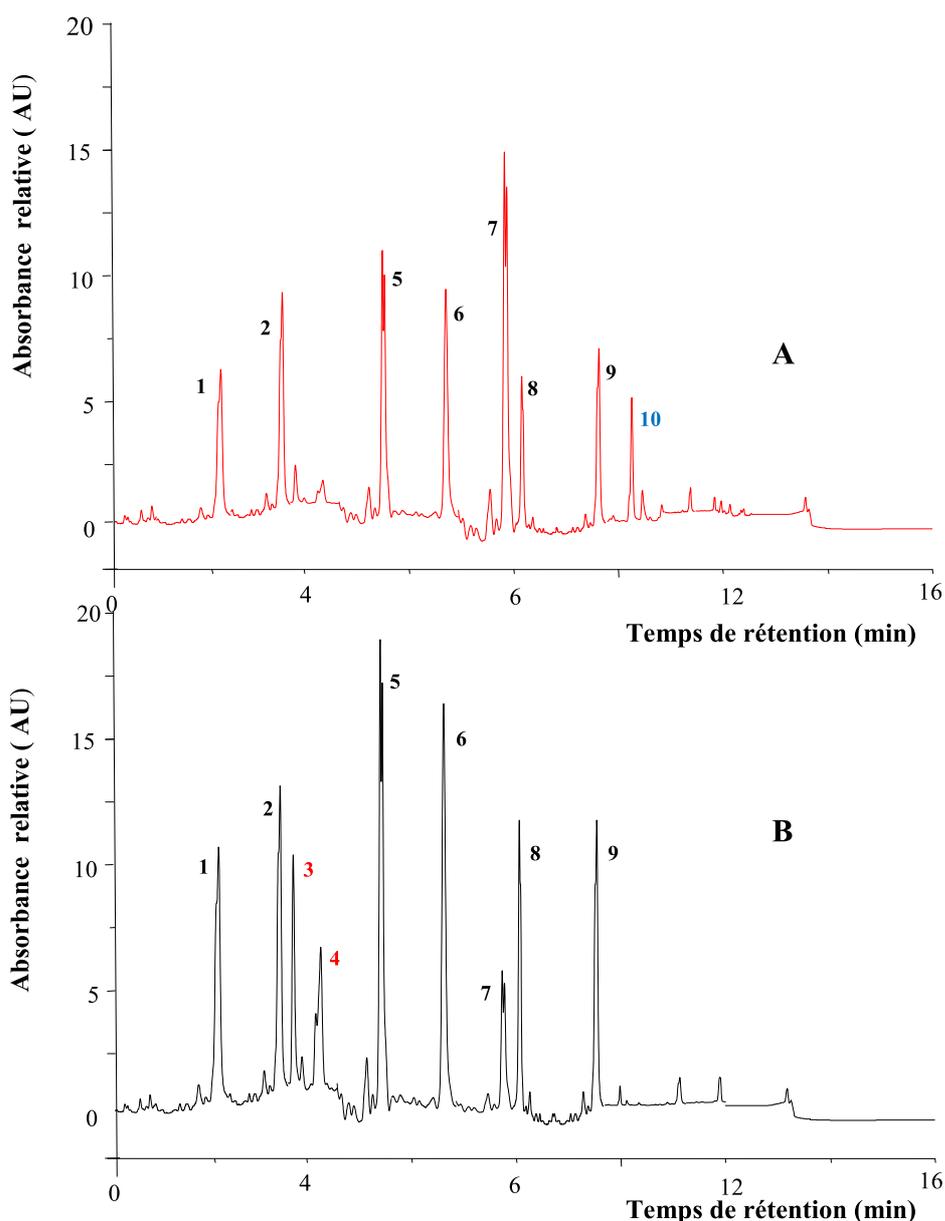
embryogènes (B) issus du milieu (MSB5 – NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> + 2 KNO<sub>3</sub> + 30 g.L<sup>-1</sup> glucose + 0,5 mg.L<sup>-1</sup> KIN + 0,1 mg.L<sup>-1</sup> 2,4-D).

L'analyse des chromatogrammes (Figure 20) révèle que le profil des cals embryogènes B et des cals non embryogènes A présente des similitudes et des différences. Sept composés sont communs aux deux types de cals (A et B) testés. Ce sont l'acide gallique, l'acide gentisique, l'acide férulique, l'acide caféique, la rutine, l'acide *p*-coumarique et la quercétine

La comparaison des profils phénoliques des cals A et B a permis d'observer d'une part la synthèse de novo (acide salicylique et catéchine) uniquement dans les cals embryogènes B et d'autre part la synthèse de la genistéine dans les cals A.

Aussi, la superposition des profils a permis de mettre en évidence une différence entre les amplitudes des pics des composés phénoliques communs aux deux types de cals. Ainsi dans les cals embryogènes (B), l'acide gallique, l'acide gentisique, l'acide férulique, l'acide caféique, l'acide *p*-coumarique et la quercétine ont enregistré une amplitude plus élevée par rapport à ceux des cals non embryogènes (A).

Au niveau des cals A par contre, c'est la rutine qui présente une amplitude élevée avec apparition de la genistéine (Figure 20).



**Figure 20. Chromatogrammes UHPLC des composés phénoliques des cals de cultivar de cotonnier Y331B-R5 détectés à 280 nm**

A : cals non embryogènes ; B : cals embryogènes ; identification des pics par ordre d'élution: 1. Acide gallique (tr = 2,154 min); 2. Acide gentisique (tr = 3,440 min); 3. Acide salicylique (tr = 3,520 min) ; 4. Catéchine (tr = 4,154 min); 5. Acide férulique (tr = 5,385 min); 6. Acide caféique (tr = 6,628 min); 7. Rutine (tr = 7,619 min); 8. Acide *p*-coumarique (tr = 8,030 min); 9. Quercétine (tr = 9,621 min); 10. Genistéine (tr = 10,125 min). UHPLC : Chromatographie Liquide Ultra Haute Performance; tr : temps de rétention

### 2.1.2.2. Activité de quelques protéines enzymatiques

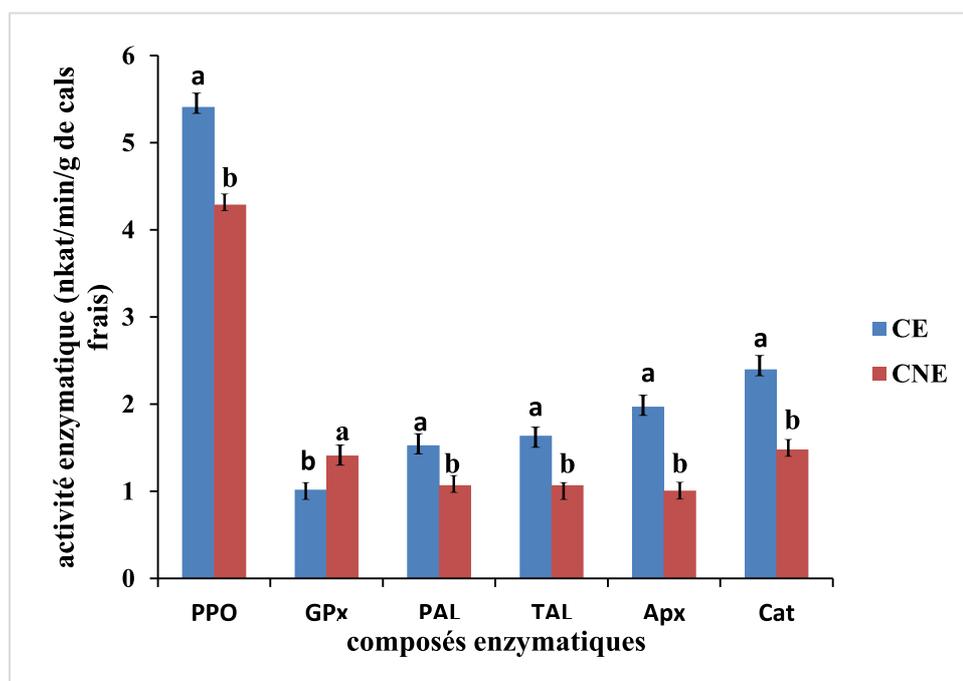
L'étude des enzymes a porté sur trois types d'enzymes: les enzymes de biosynthèse des composés phénoliques (Phénylalanine- ammonia-lyase (PAL) et tyrosine ammonia-lyase (TAL)), les enzymes de dégradation des composés phénoliques (Polyphénoloxydase (PPO) et

gaïacol peroxydase (GPx)), et deux enzymes anti-oxydantes (catalase (Cat) et ascorbate peroxydase (APx)). Les résultats de la figure 21 montrent que le type de cal exerce une influence sur l'activité des enzymes étudiés.

En effet, l'activité de la PPO, de la PAL et de la TAL est plus élevée (5,41 ; 1,53 et 1,64 nkat/min/g de cals frais) dans les cals embryogènes par rapport aux cals non embryogènes (4,29 ; 1,07 et 1,08 nkat/min/g de cals frais).

En revanche, l'activité de la GPx est plus faible (1,02 nkat/min/g de cals frais) dans les cals embryogènes contre (1,41 nkat/min/g de cals frais) dans les non embryogènes (Annexe 4).

Au niveau des enzymes anti-oxydantes, leur activité est plus importante dans les cals embryogènes (1,97 et 2,40 nkat/min/g de cals frais) respectivement pour APx et Cat contre (1,01 et 1,48 nkat/min/g de cals frais) dans les cals non embryogènes.



**Figure 21. Activité enzymatique des cals embryogènes et non embryogènes**

Les bandes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes (Test de Newman-Keuls à 5 %). PPO : Plyphénoloxydase ; GPx : Gaïacol peroxydase ; PAL : Phénylalanine ammonia-lyase ; TAL : Tyrosine ammonia-lyase ; APx : Ascorbate peroxydase ; Cat : Catalase ; CE : Cals embryogènes ; CNE : Cals non embryogènes

## **2.1.5. Relation entre les composés phénoliques et les protéines enzymatiques**

### **2.1.5.1. Matrice des valeurs propres**

Le tableau XX présente les corrélations entre les variables et les facteurs. Il s'agit des coefficients de corrélation linéaire entre les variables initiales et les facteurs. Ce sont ces corrélations qui vont permettre de donner un sens aux facteurs. Les valeurs propres des axes avec l'ACP montrent que les deux axes expriment 99,99 % de la variabilité totale. Ainsi, l'analyse de la structure des individus est faite à partir de ces deux axes.

L'axe 1 décrivant 87,686 % de la variabilité, est défini par six variables : les protéines, les phénols totaux, la polyphénoloxydase (PPO), la phénylalanine ammonia-lyse (PAL), la tyrosine ammonia-lyse (TAL) et l'ascorbate peroxydase (APx). Les protéines, la phénylalanine ammonia-lyse (PAL) et l'ascorbate peroxydase (APx) sont corrélés négativement à l'axe 1, alors que les phénols totaux, la polyphénoloxydase (PPO) et la tyrosine ammonia-lyse (TAL) sont corrélés positivement à l'axe 1. L'axe 1 peut être nommé axe embryogène.

L'axe 2 exprimant 12,313 % de la variabilité, est défini par une seule variable : la gaïacol peroxydase. Cette variable est corrélée négativement à cet axe.

L'étude de la composition des deux axes, montre que six paramètres (protéine, phénols totaux, PPO, PAL, TAL et APx) contribuent de façon significative à l'induction de structures embryogènes chez le cotonnier.

**Tableau XX. Matrice des valeurs propres des composés étudiés**

	<b>Axe 1</b>	<b>Axe 2</b>
<b>Valeurs propres</b>	1,753	1,246
<b>% de variance des axes</b>	87,686	12,313
<b>Valeurs propres cumulées</b>	1,753	2,999
<b>% de variance cumulée</b>	87,686	99,99
<b>Protéines</b>	<b>-0,85165</b>	0,228961
<b>Sucres totaux</b>	-0,62617	-0,298731
<b>Phénols totaux</b>	<b>1,60831</b>	0,328825
<b>PPO</b>	<b>2,01986</b>	-0,137151
<b>GPx</b>	-0,10561	<b>-0,918285</b>
<b>PAL</b>	<b>-1,41466</b>	0,393061
<b>TAL</b>	<b>1,34160</b>	0,471461
<b>APx</b>	<b>-1,48071</b>	0,455462
<b>Cat</b>	-0,49097	-0,523604

PPO : polyphénoloxydase, GPx : gaïacol peroxydase, PAL : phénylalanine ammonia-lyse, TAL : tyrosine ammonia-lyse, APx : ascorbate peroxydase, Cat : catalase.

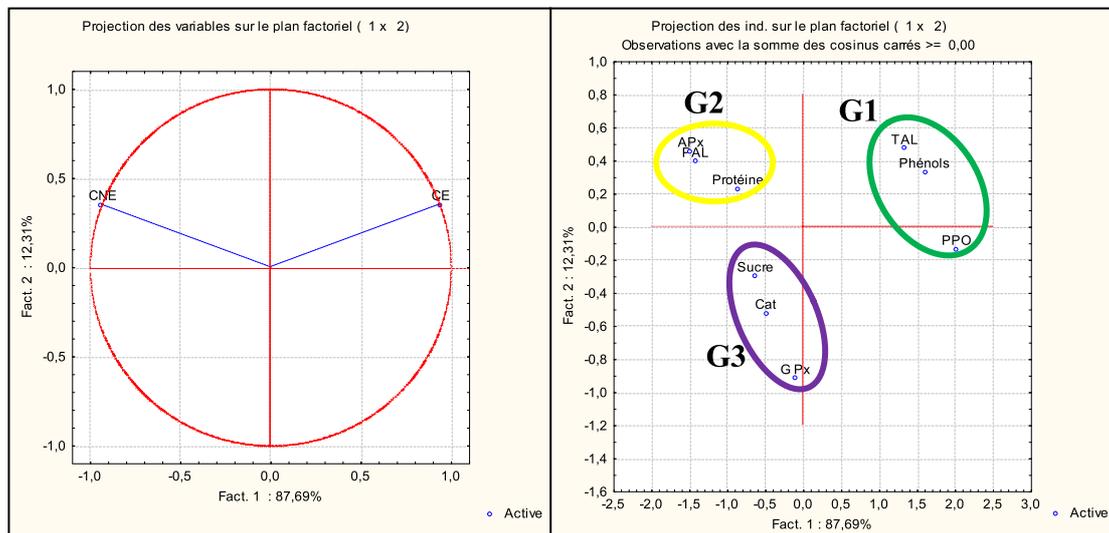
### **2.1.5.2. Relation entre les cals et les composés**

Pour mieux percevoir l'effet des différents composés biochimiques sur l'induction de cellules embryogènes, une analyse en composante principale (ACP) a été réalisée.

L'ACP a montré que les axes 1 et 2 expriment respectivement 87,69 et 12,31 % de la variabilité. La répartition des différents composés sur les deux axes a permis d'identifier trois groupes distincts (Figure 22). Le groupe G1 comprenant (TAL, Phénol totaux et PPO) est corrélé aux cellules embryogènes (CE), le G2 comprenant (les protéines, APx et la PAL) est corrélé aux cellules non embryogènes (CNE) et le G3 comprenant (Catalase, GPx et les sucres) n'est corrélé à aucun facteur.

La discrimination réalisée sur la base des composantes de chaque groupe a permis de déterminer les paramètres qui caractérisent le mieux l'induction de cellules embryogènes. L'analyse de la figure montre que l'induction de structures embryogènes est caractérisé par la TAL, les phénols totaux et les polyphénoloxydases.

Par contre, les protéines, la PAL et l'APx sont caractéristiques des cals non embryogènes. Les composés biochimiques ont des teneurs et des activités plus marquées dans les cals embryogènes que les cals non embryogènes. Ils pourraient donc être considérés comme des marqueurs éventuels de l'embryogenèse somatique.



**Figure 22. Répartition des variables de la teneur en composés biochimiques en fonction des taux d'induction de cellules embryogènes et non embryogènes dans le plan 1-2 d'une ACP**

## 2.2. DISCUSSION

### Effet du type de cal sur les teneurs en phénols, sucres totaux et protéines

Au cours de l'induction des structures embryogènes, il y a un métabolisme intense des composés biochimiques (Kouakou, 2003). Ainsi, les réactions chimiques qui aboutissent à la synthèse ou au catabolisme de ces composés sont catalysées par plusieurs enzymes. Ces composés par leur présence permettent l'acquisition des potentialités embryogènes ou non. Afin de mieux comprendre le rôle de ces composés au cours de l'induction de cellules embryogènes, des analyses biochimiques ont été réalisées. Cette étude a révélé une teneur plus élevée en phénols, sucres totaux et protéines dans les cals embryogènes par rapport aux cals non embryogènes. Cela montre que la composition où le type de milieu exerce une influence sur l'induction de cellules embryogènes. En effet selon Kouakou (2003), lorsqu'ils sont présent au niveau de la paroi cellulaire, les phénols interviennent dans le mécanisme de croissance et stimule l'induction de structures embryogènes. Chez l'ananas (*Ananas comosus*), Kouadio (2018) a rapporté que la quantité de composés phénoliques variait en fonction du type de milieu au cours de l'embryogenèse somatique.

Par ailleurs, une augmentation de la teneur en protéine a été observée dans les cals embryogènes par rapport aux cals non embryogènes. Cette augmentation s'expliquerait par le fait que les protéines interviennent dans la croissance des cellules cultivées *in vitro*, leur accumulation modifierait la différenciation des cellules vers l'induction de cellules embryogènes. Selon Kouadio *et al.* (2004) ; Kouakou (2009), la teneur en protéine est plus important chez la variété embryogène "Coke" que chez les variétés non embryogènes. La teneur en protéines et l'activité des enzymes étant la manifestation génotypique des variétés, leur évolution peut servir d'indicateur sur leur implication dans le processus de l'embryogenèse somatique. Chez le *Picea abies*, Egerstotterws *et al.* (1993) ont noté une augmentation de la teneur protéique dans les suspensions cellulaires des variétés embryogènes par rapport aux variétés non embryogènes.

En ce qui concerne la teneur en sucre, les analyses ont révélé une légère augmentation de la teneur en sucre totaux des cals embryogènes par rapport aux cals non embryogènes. Cette légère augmentation du taux de sucre serait due à l'hydrolyse de l'amidon par les enzymes amylolytiques en glucose. Selon Kishor & Mehta (1987) ; Kouakou (2003) les cellules embryogènes possèdent une teneur en sucre plus importante que les cellules non embryogènes. Ainsi, les sucres auraient un rôle important dans l'acquisition des potentialités embryogènes.

## **Étude des composés par Chromatographie Liquide Ultra Haut Performance**

L'analyse qualitative montre l'influence du métabolisme phénolique sur l'induction de cellules embryogènes. En effet, l'analyse des échantillons réalisés en UHPLC a révélé la présence de plusieurs composés phénoliques. Cependant, la qualité et la quantité des composés varient selon le type de cal (embryogène et non embryogène). Au cours de l'induction de cellules embryogènes, les cals non embryogènes A et embryogènes B ont synthétisés en commun l'acide gallique, l'acide gentisique, l'acide férulique, l'acide caféique, la rutine, l'acide *p*-coumarique et la quercétine. La présence simultanée de ces composés dans les deux milieux ayant induit des cals semble avoir une relation avec la callogenèse, mais ne serait pas bénéfique à l'induction de structures embryogènes chez le cotonnier. La génistéine uniquement présente dans les cals non embryogènes A et la forte teneur (augmentation de l'amplitude) en rutine semble être à la base de l'absence d'embryons dans les cals issus de ce milieu. Les études de Kouakou menées en 2009 ont montré que la génistéine fait partie des composés phénoliques qui seraient responsables de l'inhibition de l'induction de structures embryogènes.

Au cours de cette étude, nous avons observé que les cals embryogènes B ont non seulement induit des composés avec des amplitudes très élevées, mais ont aussi permis la synthèse de *novo* de composés phénoliques (l'acide salicylique et la catéchine). La présence de ces composés uniquement dans ces cals serait probablement responsable du fort taux d'induction de cellules embryogènes observés. Selon Kouakou (2009) l'acide salicylique et la catéchine seraient des marqueurs phénoliques de l'embryogenèse. En plus de la synthèse de *novo*, nous avons observé une forte accumulation de composés communs (l'acide gallique, l'acide gentisique, l'acide férulique, l'acide caféique, l'acide *p*-coumarique et la quercétine) dans les cals embryogènes B. Ce qui laisse entrevoir le rôle primordial de l'accumulation de ces composés phénoliques au cours de l'induction de structure embryogènes chez le cotonnier.

### **Effet du type de cal sur l'activité des protéines enzymatiques et des enzymes anti-oxydantes**

Cette étude a mis en exergue une importante activité des polyphénoloxydases (PPO) dans les cals embryogènes. Les PPO sont des enzymes qui interviennent dans la dégradation des composés phénoliques en formant des diquinones qui ont un effet bénéfiques sur l'induction de structures embryogènes. D'autre part, la catéchine synthétisée au niveau des cals embryogènes serait l'un des substrats des PPO. Ce qui expliquerait donc cette importante activité des PPO dans les cals embryogènes par rapport aux cals non embryogènes.

Au niveau de l'activité de la gaïacol peroxydase (GPx), une faible activité peroxydasique a été enregistrée dans les cals embryogènes par rapport aux cals non embryogènes ou l'activité peroxydasique est plus importante. Cette faible activité peroxydasique au niveau des cals embryogènes serait due à leur faible participation dans le catabolisme phénolique au cours de l'embryogenèse du cotonnier. En effet, l'activité des peroxydases conduit à la formation de monoquinones, qui serait des inhibiteurs de l'induction de cellules embryogènes. Ainsi, la forte activité peroxydasique serait un indicateur d'une bonne callogenèse (Dhawan & Nanda, 1982).

La mise en évidence de l'activité de la PAL et de la TAL, enzymes de biosynthèse des composés phénolique révèle une augmentation de l'activité de ces deux enzymes dans les cals embryogènes. L'augmentation de l'activité de la TAL et de la PAL dans les cals embryogènes serait due à la disponibilité de la phénylalanine et de la tyrosine substrat de ces deux enzymes. Ainsi, selon le substrat, le métabolisme des composés phénoliques pourrait s'orienter *via* la voie de la PAL ou de la TAL. Dans cette étude, la synthèse des composés phénoliques est orientée *via* la TAL dans les cals embryogènes et *via* la PAL dans les cals non embryogènes. Selon Kouakou (2003), le changement de voie de biosynthèse des composés phénoliques des cals non embryogènes aux cals embryogènes, est responsable de l'acquisition ou non des potentialités embryogènes. Ces différences dans le profil phénolique entre les cals embryogènes et non embryogènes aurait une liaison avec l'activité de ces enzymes. Ainsi, la genistéine uniquement présent dans les cals non embryogènes serait synthétisé *via* la voie de la PAL alors que la synthèse de l'Acide salicylique et de la catéchine dans les cals embryogènes seraient liée à la TAL.

Les tests réalisés avec les enzymes anti-oxydantes ont montré que l'activité de la catalase (Cat) et de l'ascorbate peroxydase (APx) est plus importante au niveau des cals embryogènes que des cals non embryogènes. Cela serait dû au stress causé par la composition du milieu de culture qui entraîne une activité intense de ces deux enzymes. Car, la catalase et l'ascorbate peroxydase fonctionnent de façon continue dans toutes les cellules en réponse au stress oxydatif. Ainsi, Manivannan *et al.* (2015) ont rapporté chez *Torilis japonica* que l'activité de l'ascorbate peroxydase (APx), et de la catalase (Cat) augmente au cours de l'induction des embryons. Aussi, Abrahamsson *et al.* (2017) ont montré que le processus la formation d'embryon est précédé d'une augmentation de l'activité catalasique.

### 2.3. CONCLUSION PARTIELLE

Au cours de cette étude, il a été question de voir l'évolution des phénols et sucres totaux, des protéines et des protéines enzymatiques au cours de l'induction de cellules embryogènes. Chez le cotonnier, le milieu d'induction d'embryon (MIE + 30 g.L<sup>-1</sup> glucose + 0,1 mg.L<sup>-1</sup> 2,4-D + 0,5 mg.L<sup>-1</sup> KIN) a permis la biosynthèse et accumulation des phénols, des sucres totaux et des protéines. Ainsi, l'aptitude à l'embryogenèse somatique serait sous le contrôle de la biosynthèse de l'acide salicylique et la catéchine et de l'accumulation de polyphénols tels que l'acide gallique, l'acide gentisique l'acide férulique, l'acide caféique, l'acide *p*-coumarique et la quercétine dans les cals. Ces composés seraient des marqueurs de l'embryogenèse somatique. D'autre part, la réduction de la biosynthèse de la rutine dans les cals embryogènes serait également un indicateur de l'embryogenèse somatique. Alors que la synthèse de ce composé dans les cals non embryogènes suivi de la synthèse de la genistéine serait un indicateur d'une bonne callogenèse.

Au niveau des enzymes, nous avons observé une variation de l'activité des enzymes. Ainsi, la phénylalanine ammonia-lyase (PAL), la tyrosine ammonia-lyase (TAL) et la polyphénoloxydase (PPO) ont présenté une forte activité dans les cals embryogènes par rapport à ceux des cals non embryogènes. Ces enzymes seraient des indicateurs de l'embryogenèse somatique. D'autre part, la forte activité de la Catalase (Cat) chez les cals embryogènes traduirait l'implication de ce composé dans le processus de l'embryogenèse somatique

### **3. MICROPROPAGATION DU COTONNIER**

#### **3.1. RÉSULTATS**

##### **3.1.1. Effet de la BAP et de la KIN sur l'induction de pousses provenant des bourgeons terminaux des vitroplants de cotonnier**

Les résultats de l'effet des phytohormones sur l'induction de pousses provenant des bourgeons terminaux des vitroplants de cotonnier sont consignés dans le tableau XXI et montrent que le type et la concentration des hormones a significativement influencé les paramètres mesurés. En effet, le plus grand nombre de pousses (7,05 ; 7,33 et 8,73 pousses) ont été obtenus avec la combinaison BAP/KIN aux concentrations de 1 ; 1,5 et 2 mg.L<sup>-1</sup>.

Les analyses relatives au nombre de feuilles ont révélé que le nombre de feuilles a été significativement influencé par les hormones et leurs concentrations. La KIN utilisée seule ou en combinaison avec la BAP a permis d'obtenir le plus grand nombre de feuilles (9,33 ; 9,66 et 10 feuilles, respectivement pour la KIN 1 et 1,5 mg.L<sup>-1</sup> et BAP/KIN 0,5 mg.L<sup>-1</sup>). Le plus petit nombre de feuilles (3,01 feuilles) a été enregistré avec la KIN à la concentration de 0,1 mg.L<sup>-1</sup>.

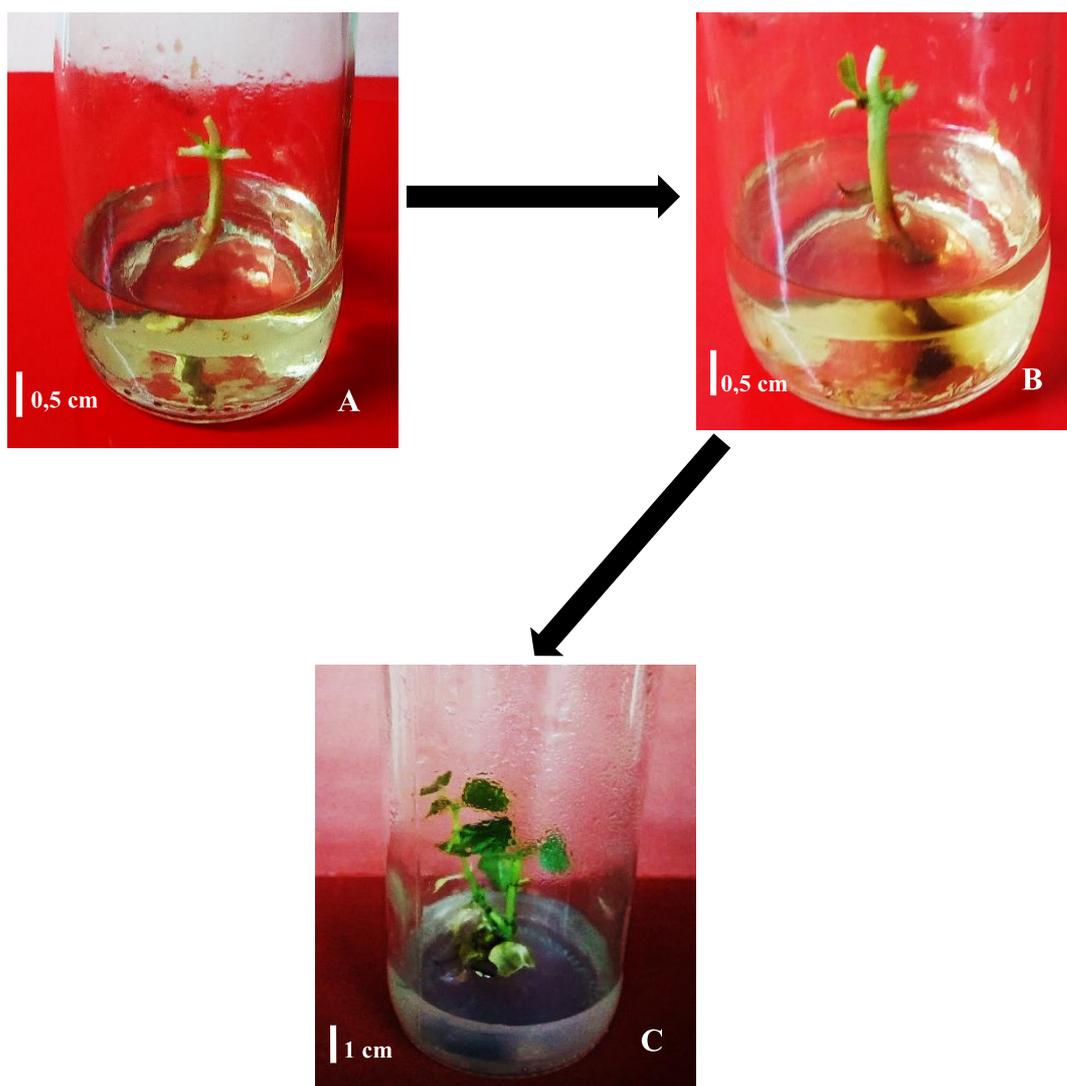
Les tests réalisés sur le nombre d'entre nœuds ont montré un effet hautement significatif des hormones sur ce paramètre. Les résultats révèlent que la combinaison BAP/KIN a permis d'obtenir le plus grand nombre d'entre nœuds (5,71 entre nœuds) à la concentration (1,5 mg.L<sup>-1</sup>) (Figure 23). La BAP et la KIN utilisées seules ont induit moins d'entre nœud que la combinaison de ces deux phytohormones.

Les plus petites valeurs ont été obtenues sur les milieux MS sans hormones de croissance (milieux témoins).

**Tableau XXI. Influence de la BAP et de la KIN sur l'induction de pousses des bourgeons terminaux après quatre semaines de culture**

Hormones	(mg.L <sup>-1</sup> )	Nb Pousses	Nbr Feuilles	Nbr d'entre Nœuds
<b>BAP</b>	0	1,01 ± 0,03 d	1,22 ± 0,11 d	1,00 ± 0,10 d
	0,1	1,33 ± 0,13 d	3,66 ± 0,23 c	1,33 ± 0,12 d
	0,5	1,66 ± 0,13 d	6,66 ± 0,38 bc	1,66 ± 0,13 cd
	1	2,33 ± 0,23 c	7,33 ± 0,42 b	2,33 ± 0,23 cd
	1,5	2,66 ± 0,26 c	6,66 ± 0,33 bc	1,33 ± 0,27 cd
	2	4,00 ± 0,37 bc	8,00 ± 0,47 b	2,00 ± 0,35 b
	<b>KIN</b>	0	1,20 ± 0,01 d	1,33 ± 0,03 d
0,1		1,00 ± 0,01 d	3,01 ± 0,27 c	1,05 ± 0,02 d
0,5		1,66 ± 0,13 d	5,66 ± 0,34 bc	2,33 ± 0,13 cd
1		1,66 ± 0,12 d	9,33 ± 0,53 a	2,33 ± 0,23 cd
1,5		3,66 ± 0,33 bc	9,66 ± 0,54 a	4,66 ± 0,31 bc
2		3,66 ± 0,26 bc	6,66 ± 0,35 bc	4,66 ± 0,32 bc
<b>BAP/KIN</b>		0	1,44 ± 0,02 d	1,81 ± 0,03 d
	0,1	5,66 ± 0,33 b	6,66 ± 0,35 bc	4,26 ± 0,34b
	0,5	6,66 ± 0,36 b	10,0 ± 0,57 a	4,33 ± 0,43 a
	1	7,05 ± 0,42 a	9,01 ± 0,51 a	5,56 ± 0,36 b
	1,5	7,33 ± 0,37 a	7,33 ± 0,43 b	5,71 ± 0,35 b
	2	8,73 ± 0,41 a	7,83 ± 0,43b	5,66 ± 0,26 c

Dans une même colonne, les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes (Test de Newman-Keuls au seuil 5 %) ; BAP : Benzylaminopurine ; KIN : Kinétine ; BAP/KIN : Benzylaminopurine + Kinétine ; Nbr : Nombre.



**Figure 23. Phases d'induction de pousses à partir de bourgeons terminaux de vitroplants de cotonnier en présence de la BAP et de la KIN**

A : Bourgeon terminal de vitroplant sur milieu de bourgeonnement ; B : Débourrement du bourgeon terminal sept jours après la mise en culture ; C : pousses de cotonnier âgées de quatre semaines ; BAP : benzylaminopurine ; KIN : kinetine

### **3.1.2. Effet de la BAP et de la KIN sur l'induction de pousses à partir des embryons immatures de cotonnier**

L'effet de la BAP et de la KIN a été testé sur l'induction de pousses à partir des embryons immatures de cotonnier. Les résultats ont montré que les hormones exercent un effet significatif ( $p < 0,001$ ) sur les paramètres étudiés (tableau XXII). Toutes les concentrations ont induit des pousses. Toutefois, la combinaison BAP/KIN a permis d'obtenir le nombre le plus élevé de pousses aux concentrations de 1,5 et 2  $\text{mg.L}^{-1}$  (7,60 et 7,80

pousses, respectivement) (Tableau XXII). Le plus petit nombre de pousses a été obtenu avec le témoin (1,01 bourgeons). Les analyses montrent également que la BAP à la concentration de 2 mg.L<sup>-1</sup> a induit le plus grand nombre de pousses (5,02 bourgeons). Quant aux tests réalisés avec la KIN, ils ont montré que la concentration de 1,5 mg.L<sup>-1</sup> a été plus favorable à l'induction de pousses (4,33 bourgeons).

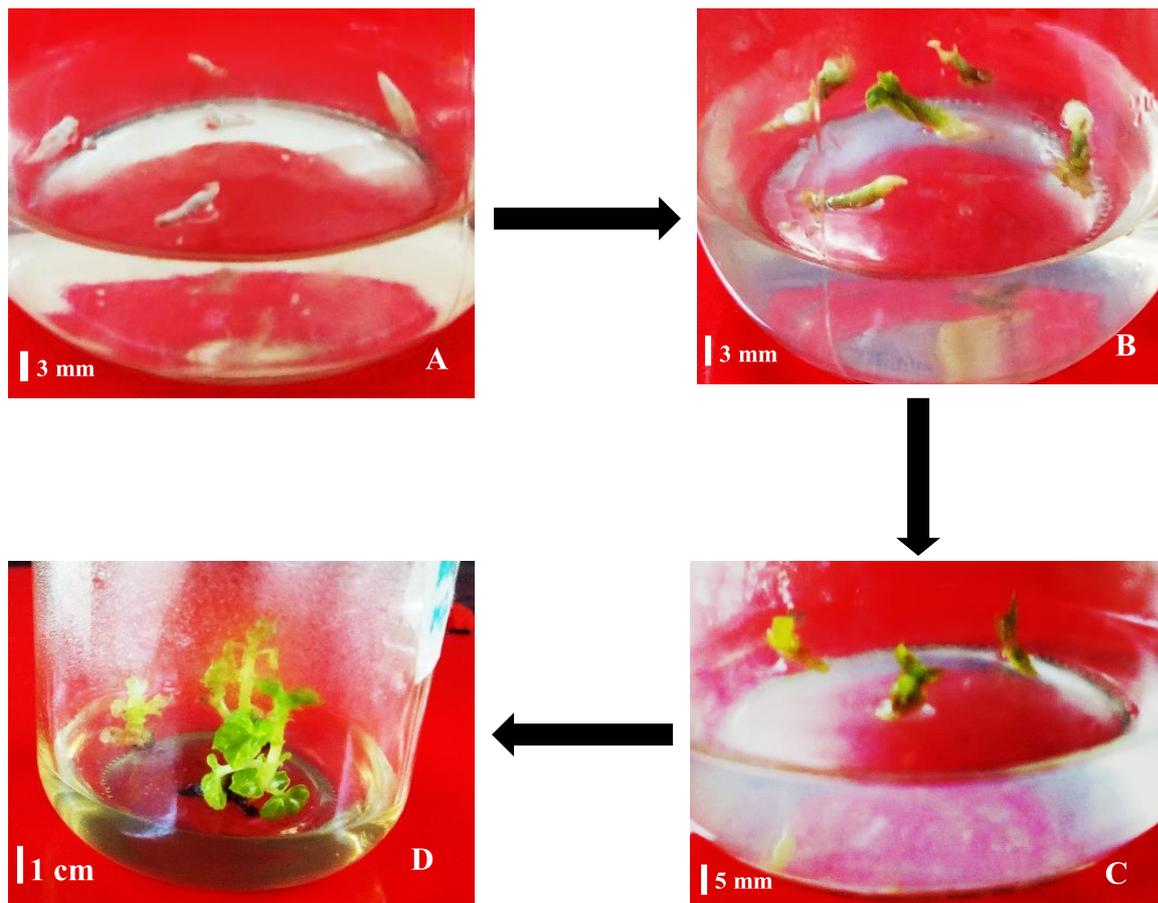
Au niveau de l'induction du nombre de feuilles, les résultats révèlent un effet significatif des hormones. La combinaison BAP/KIN semble stimuler la formation de feuilles chez les embryons immatures mis en culture (Figure 24). Ainsi, les concentrations de 1,5 et 2 mg.L<sup>-1</sup> se sont révélées plus favorables à l'induction de feuilles (8,3 et 8,32 feuilles, respectivement). La BAP et la KIN utilisées séparément à la concentration de 2 mg.L<sup>-1</sup> a induit le plus grand nombre de feuilles (6,33 et 5,86 feuilles, respectivement pour la BAP et la KIN).

Les tests réalisés sur le nombre d'entre nœuds montrent que ce paramètre a été significativement influencé par les hormones ( $p < 0,001$ ). Les résultats ont révélé que la combinaison BAP/KIN a eu plus d'effet positif sur la formation des entre nœuds par rapport à l'effet individuel des hormones. Les nombres les plus élevés d'entre nœud ont été enregistrés avec la combinaison BAP/KIN à 1,5 et 2 mg.L<sup>-1</sup> (6,5 et 7,66 entre nœuds, respectivement). Les concentrations élevées semblent avoir un effet bénéfique sur l'induction d'entre nœuds. Ainsi, la concentration de 2 mg.L<sup>-1</sup> de chaque type d'hormone (BAP et KIN) a permis l'induction du nombre le plus élevé d'entre nœuds. Pour tous tests réalisés, les témoins ont enregistré les valeurs les plus faibles quel que soit le paramètre étudié.

**Tableau XXII. Effet de la BAP et de la KIN sur l'induction de pousses des embryons immatures de cotonnier**

Hormones	(mg.L <sup>-1</sup> )	Nbr pousses	Nbr Feuilles	Nbr d'entre Nœuds
<b>BAP</b>	0	1,01 ± 0,01 d	2,15 ± 0,02 d	1,03 ± 0,02 d
	0,1	1,33 ± 0,02 d	2,66 ± 0,02 d	2,05 ± 0,02 d
	0,5	2,20 ± 0,03 c	3,08 ± 0,07 c	3,30 ± 0,07 c
	1	3,05 ± 0,07 c	5,13 ± 0,24 b	3,66 ± 0,08 c
	1,5	3,10 ± 0,07 c	5,66 ± 0,19 c	4,10 ± 0,20 b
	2	5,02 ± 0,23 b	6,33 ± 0,43 b	4,21 ± 0,21 b
<b>KIN</b>	0	1,22 ± 0,01 d	2,01 ± 0,02 d	1,02 ± 0,01 d
	0,1	1,33 ± 0,02 d	2,20 ± 0,03 d	1,66 ± 0,02 d
	0,5	2,33 ± 0,02 c	3,05 ± 0,18 c	3,06 ± 0,07 c
	1	2,66 ± 0,03 c	4,33 ± 0,08 c	3,66 ± 0,08 c
	1,5	4,33 ± 0,21 c	5,66 ± 0,34 b	4,33 ± 0,23 b
	2	4,10 ± 0,11 c	5,86 ± 0,38 b	5,40 ± 0,08 b
<b>BAP/KIN</b>	0	1,35 ± 0,02 d	2,15 ± 0,02 c	1,05 ± 0,01c
	0,1	3,66 ± 0,28 b	4,11 ± 0,47 c	3,70 ± 0,07 c
	0,5	4,66 ± 0,18 c	6,33 ± 0,12 b	3,02 ± 0,06 c
	1	6,07 ± 0,45 b	6,05 ± 0,45 b	5,33 ± 0,23 b
	1,5	7,60 ± 0,52 a	8,30 ± 0,55 a	6,50 ± 0,47 a
	2	7,80 ± 0,58 a	8,32 ± 0,55 a	7,66 ± 0,48 a

Dans une même colonne, les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes (Test de Newman-Keuls au seuil 5 %) ; BAP : Benzylaminopurine ; KIN : Kinétine ; BAP/KIN : Benzylaminopurine + Kinétine ; Nbr : Nombre.



**Figure 24. Étapes d'induction de pousses à partir d'embryons immatures de cotonnier**

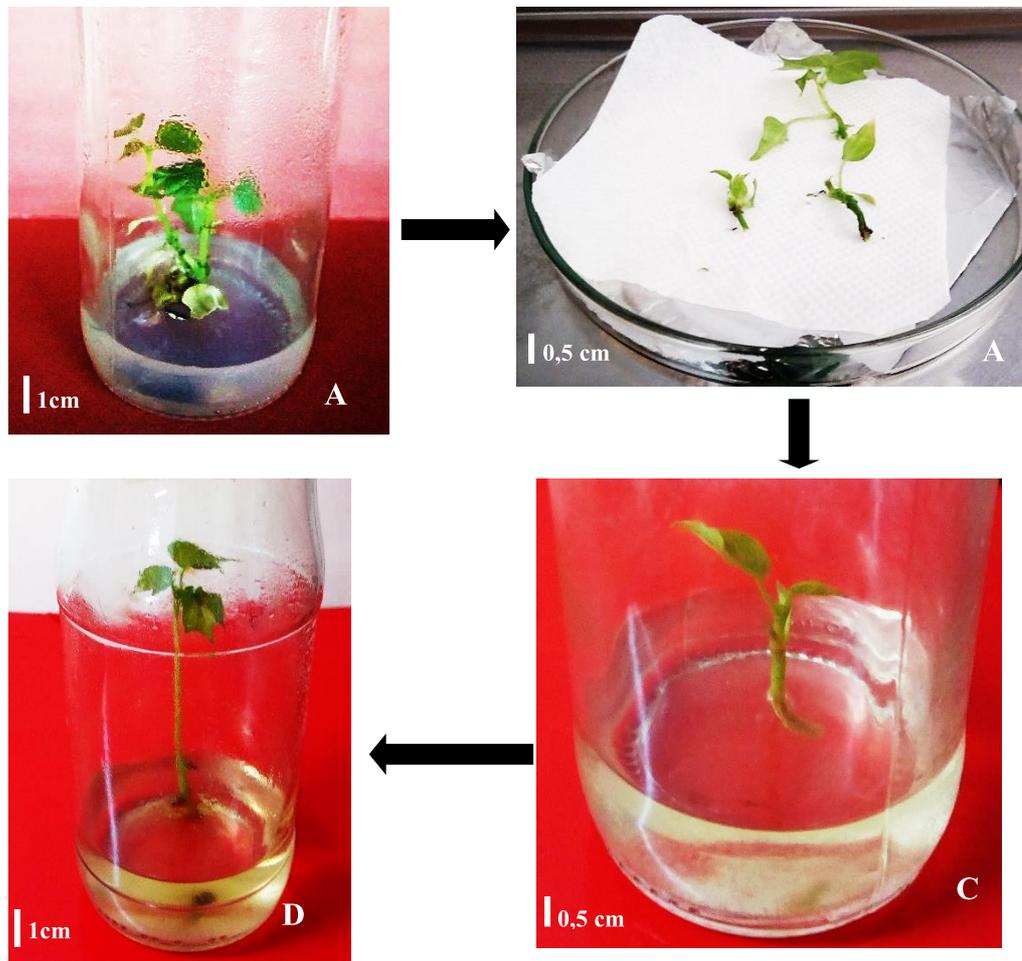
A : embryons immature de cotonnier sur milieu de bourgeonnement ; B : embryons immature après une semaine de mise en culture ; C : embryons immature après deux semaines, D : pousses de cotonnier obtenu à partir des embryons immature.

### 3.1.3. Effet de la gibbérelline sur l'élongation de pousses de cotonnier

Les pousses obtenues ont été allongées sur milieu MS avec les vitamines MS additionné de GA3 (Figure 25). Les résultats montrent que les concentrations de 0,5 et 1 mg.L<sup>-1</sup> se sont révélées plus bénéfiques à l'élongation des pousses provenant des bourgeons terminaux (7,01 et 6,17 cm, respectivement). La concentration de 1,5 mg.L<sup>-1</sup> a été défavorable à l'allongement des pousses (Tableau. XXIII).

De même, les analyses ont montré que la gibbérelline (GA3) a influencé significativement l'élongation des pousses obtenues à partir des embryons immatures de cotonnier ( $p < 0,01$ ). Les concentrations de 1,5 et 1 mg.L<sup>-1</sup> ont enregistré les longueurs les plus importantes (7,21 et 6,6 cm). Suivies de la concentration de 0,5 mg.L<sup>-1</sup> avec 4,36 cm.

Chez les embryons immatures, les faibles concentrations semblent avoir un effet inhibiteur sur l'élongation des pousses (Tableau XXIII). En effet, la concentration de  $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$  a enregistré la plus faible longueur (3,15 cm). Pour toutes les expériences réalisées, les milieux témoins se sont révélés défavorables à l'élongation des pousses (1,21 et 1,81 cm, respectivement pour les bourgeons terminaux et les embryons immatures).



**Figure 25. Phases de multiplication et d'élongation des pousses de cotonnier**

A : pousses de cotonnier âgés de quatre semaines ; B : segments uni-nodaux ou bi-nodaux ; C : pousse de cotonnier sur milieu d'élongation ; D : pousse de cottonniers allongé après deux semaines

**Tableau XXIII. Influence de la gibbérelline (GA3) sur l'élongation des pousses obtenues**

GA3 (mg.L <sup>-1</sup> )	longueur (cm)	
	BT	EI
0	1,21 ± 0,02 c	1,81 ± 0,03 c
0,1	3,67 ± 0,37 b	3,15 ± 0,44 b
0,5	7,01 ± 0,4 a	4,36 ± 0,40 b
1	6,17 ± 0,3 a	6,60 ± 0,44 a
1,5	4,25 ± 0,2 b	7,21 ± 0,41 a

Dans une même colonne, les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes (Test de Newman-Keuls au seuil 5 %) ; BT : Pousses provenant des bourgeons terminaux ; EI : Pousses provenant des embryons immature.

### 3.1.4. Effet des auxines sur l'enracinement des pousses provenant des embryons immature et des bourgeons terminaux de cotonnier

L'effet de trois hormones a été testé sur l'enracinement des pousses des bourgeons terminaux de cotonnier. Les résultats ont montré que les auxines ont significativement influencé l'enracinement des pousses ( $p < 0,001$ ) (Tableau XXIV). En effet, l'AIA à la concentration de 1 mg.L<sup>-1</sup> a induit le nombre le plus élevé de racines (14,5 racines). Au niveau de l'AIB, les fortes doses 0,5 ; 1 et 1,5 mg.L<sup>-1</sup> ont induit les nombres les plus élevés de racines (8,5 ; 8,01 et 8,10 racines, respectivement). Il en est de même pour le 2,4-D avec 3,8 ; 6,6 et 6,82 racines, respectivement pour 0,5 ; 1 et 1,5 mg.L<sup>-1</sup>.

Les analyses réalisées sur la longueur moyenne des racines ont montré une influence significative des hormones sur l'allongement des racines des pousses obtenues à partir des bourgeons terminaux. L'AIB et l'AIA ont induit les plus grandes longueurs moyennes (13,32 et 13,57 cm) à la concentration de 1 mg.L<sup>-1</sup> (Tableau XXIV). Le 2,4-D s'est révélé peut favorable que l'AIB et l'AIA.

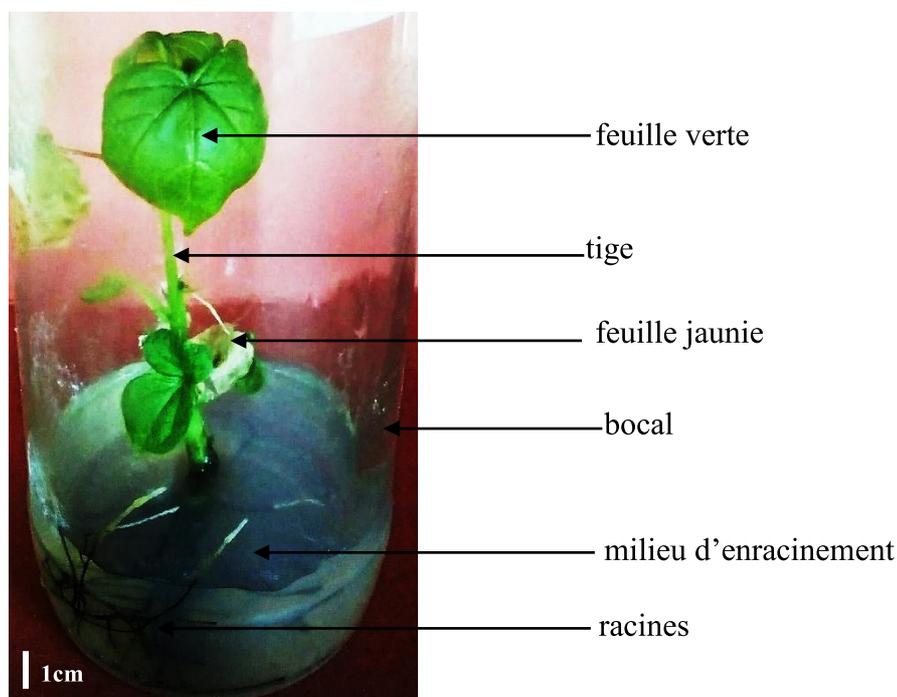
Au niveau des embryons immatures, les résultats ont montré un effet significatif des auxines sur la rhizogenèse (Figure 26). L'AIB à la concentration de 1 mg.L<sup>-1</sup> a induit le nombre le plus élevé de racines (13,25 racines). Suit de la concentration 1,5 mg.L<sup>-1</sup> (10,25 racines). L'AIA et le 2,4-D ont eu un effet inhibiteur sur l'enracinement des embryons immatures. Les résultats de cette étude montrent également que l'AIB a enregistré la longueur moyenne la plus importante (12,6 cm) à la concentration de 1 mg.L<sup>-1</sup>. Le 2,4-D s'est montré

peu favorable à l'induction et à l'allongement des racines des pousses. Les plus faibles longueurs moyennes ont été obtenues sur les milieux témoins.

**Tableau XXIV. Influence des auxines sur l'enracinement des pousses**

Hormones (mg.L <sup>-1</sup> )	Bourgeons Terminaux		Embryons immatures		
	Nbr R	LMR	Nbr R	LMR	
AIA	0	1,54 ± 0,03 d	0,12 ± 0,01 d	1,44 ± 0,03 d	7,89 ± 0,45 c
	0,1	5,00 ± 0,17 c	5,32 ± 0,21 c	1,66 ± 0,04 d	11,30 ± 0,70 a
	0,5	10,75 ± 0,62 b	7,50 ± 0,44 bc	1,70 ± 0,04 d	9,48 ± 0,47 b
	1	14,50 ± 0,74 a	13,57 ± 0,72 a	3,66 ± 0,13 c	10,95 ± 0,54 a
	1,5	8,50 ± 0,44 bc	8,25 ± 0,42 bc	3,60 ± 0,16 c	8,87 ± 0,53 b
AIB	0	1,33 ± 0,03 d	0,65 ± 0,02 d	1,33 ± 0,03 d	8,21 ± 0,41 b
	0,1	4,50 ± 0,12 c	6,35 ± 0,32 bc	9,60 ± 0,57 b	10,70 ± 0,52 a
	0,5	8,50 ± 0,42 bc	13,32 ± 0,78 a	5,50 ± 0,23 c	10,75 ± 0,56 a
	1	8,01 ± 0,41 bc	7,50 ± 0,41 bc	13,25 ± 0,72 a	12,60 ± 0,67 a
	1,5	8,10 ± 0,47 bc	11,01 ± 0,59 b	10,25 ± 0,55 b	9,17 ± 0,50 b
2,4-D	0	1,48 ± 0,03 d	0,31 ± 0,001 d	1,30 ± 0,03 d	5,30 ± 0,24 d
	0,1	3,20 ± 0,06 d	2,69 ± 0,07 d	2,2 ± 0,06 d	6,18 ± 0,29 c
	0,5	3,80 ± 0,08 d	4,83 ± 0,13 c	2,87 ± 0,07 d	6,94 ± 0,34 c
	1	6,60 ± 0,36 c	5,25 ± 0,2 c	3,80 ± 0,08 c	7,30 ± 0,4 c
	1,5	6,82 ± 0,39 c	6,17 ± 0,3 c	3,20 ± 0,05 c	6,07 ± 0,29 c

Dans une même colonne, les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes (Test de Newman-Keuls au seuil 5 %); AIA : Acide indole-3-acétique ; AIB : Acide indole butyrique ; 2,4-D : Dichlorophénoxyacétique ; Nbr R: Nombre Racine ; LMR : Longueur Moyenne Racine



**Figure 26. Vitroplant de cotonnier enraciné après quatre semaines de culture**

### 3.1.5. Acclimatation des vitroplants

#### 3.1.5.1. Effet du type d'explant sur la pré-acclimatation des vitroplants

Les résultats de la pré-acclimatation sont indiqués dans le tableau XXV et montrent que le type d'explant a exercé un effet significatif ( $p < 0,001$ ) sur le taux de survie des explants. Les vitroplants provenant des embryons immatures ont enregistré le taux de survie le plus élevé (88,64 %) par rapport ceux issus des bourgeons terminaux de cotonnier (75,77 %).

**Tableau XXV. Taux de survie des vitroplants de cotonnier préacclimatés**

Explants	Nombre de plants pré-acclimatés	Taux de survie (%)
Bourgeons terminaux	70	75,77 ± 0,31 b
Embryons immatures	70	88,64 ± 0,42 a

Les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5 % (Test de Newman-Keuls).

#### 3.1.5.2. Effet du type d'explant sur l'acclimatation des vitroplants

Après la période de pré-acclimatation, les vitroplants ont été transférés sous une serre puis à l'air libre. Les paramètres de survie mesurés au cours de l'acclimatation des vitroplants sont présentés dans le tableau XXVI. L'analyse des résultats a montrés que le type d'explant a eu un effet significatif sur le taux de survie vitroplants. Les vitroplants provenant des embryons immatures ont répondu plus favorablement à l'acclimatation (73,76 %) contre 59,27 % pour les vitroplants issus des bourgeons terminaux. Le nombre de racines émises a également été influencé par le type d'explant. Les vitroplants issus des embryons immatures ont induit le nombre le plus élevé de racines (16, 01 racines). Le nombre de feuilles émises en revanche, n'a pas été influencé par le type d'explant. La figure 27 montre un vitroplant de cotonnier acclimaté après dix semaines d'acclimatation.

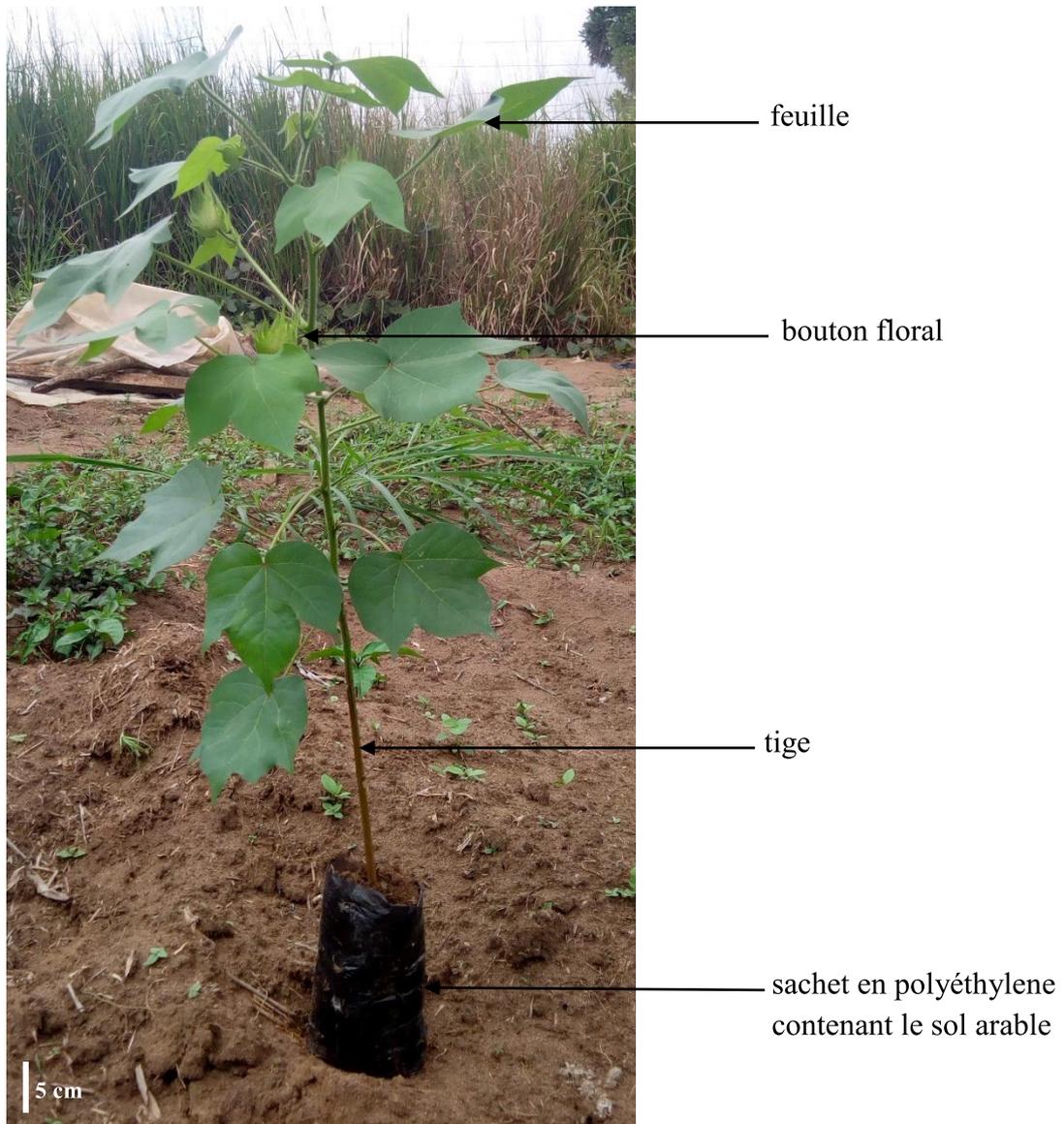
Chaque explant de départ pourrait produire après quatre semaines en moyenne, sept pousses. Ainsi, après cinq cycles de culture de 26 semaines (annexe 5), on pourrait produire  $U_n = (A + 1)^n U_0 = 16807$  pousses à partir d'un seul explant. Avec  $A$  = nombre de pousses au temps  $t_1$ ,  $n$  = nombre de cycles au temps  $t$ ,  $U_n$  = nombre de pousses au cycle  $n$  et  $U_0 = 1$  explant au temps  $t = 0$ .

Ainsi à partir de cette voie, il serait possible de couvrir avec 2,47 environ 3 explants (50421 pousses), les besoins d'un hectare d'une plantation de cotonnier d'une densité de 41600 plants/hectare en 26 semaines de culture.

**Tableau XXVI. Effet de l'explant sur l'acclimatation des vitroplants obtenus**

<b>Plants acclimaté</b>	<b>Paramètres</b>		
	<b>Nombre Feuille</b>	<b>Nombre Racine</b>	<b>Taux Survie</b>
<b>Bourgeons Terminaux</b>	12,50 ± 0,11 a	11,35 ± 0,13 b	59,27 ± 0,43 b
<b>Embryons Immatures</b>	13,66 ± 0,14 a	16,01 ± 0,17 a	73,76 ± 0,54 a

Dans une même colonne, les moyennes suivit de la même lettre ne sont pas significativement différentes (Test de Newman-Keuls au seuil de 5 %).



**Figure 27. Vitroplant de cotonnier après 2 mois et demi d'acclimatation**

### 3.2. DISCUSSION

#### **Effet de la BAP et de la KIN sur l'induction de pousses des bourgeons terminaux et des embryons immatures de cotonnier**

La régénération du cotonnier par embryogenèse somatique est fortement liée au génotype. Cette dépendance limite l'amélioration du cotonnier. En effet, plusieurs méthodes d'amélioration ont recours aux méthodes de culture *in vitro* (Antoine, 2004 ; Murphy *et al.*, 2008 ; Kawtar *et al.*, 2015). La micropropagation apparaît donc comme une alternative et une méthode très prometteuse d'amélioration *in vitro* pour les espèces récalcitrantes. Dans cette étude, l'effet de deux cytokinines (BAP et KIN) sur l'induction de pousses à partir des bourgeons terminaux et des embryons immatures de cotonnier a été testé.

Les résultats ont montré que les cytokinines ont significativement influencé l'induction de pousses des bourgeons terminaux des vitroplants de cotonnier. La combinaison BAP/KIN a induit le plus grand nombre de pousses. Cela serait dû au fait que la BAP et la KIN sont des cytokinines de synthèse qui ont une forte action sur la division cellulaire, réduisent la dominance apicale tout en stimulant les divisions cellulaires et la formation de pousses (Georges & Scherrington, 1984 ; Zryd, 1992). Ainsi, l'addition de ces cytokinines au milieu de culture entraîne une augmentation de la quantité de minéraux entraînant une augmentation de pression du milieu. Il s'en suit une forte absorption des minéraux aboutissant à la formation de pousses. De plus, les cytokinines seraient directement responsables de la reprogrammation embryonnaire des axes des méristèmes apicaux (Jorge *et al.*, 1998). Des résultats similaires ont été obtenus par Afolabi-Balogun *et al.* (2015) qui ont induit des pousses en présence de la BAP et de la KIN chez le cotonnier.

Lorsque la BAP et la KIN sont utilisées seules, les concentrations les plus élevées ont induit le plus grand nombre de pousses alors que les faibles concentrations se sont avérées inhibitrices. Ainsi, un optimum de concentration d'hormone de croissance est nécessaire pour l'induction des pousses et cela varie selon les espèces. Selon Afolabi-Balogun *et al.* (2015), les fortes concentrations de BAP stimulent le bourgeonnement. Chez l'espèce *Calamus spp* par contre, des concentrations plus élevées allant de 1 mg.L<sup>-1</sup> à 6 mg.L<sup>-1</sup> sont nécessaires pour induire des pousses (Bingshan *et al.*, 2000). D'après ces auteurs, la production chute dès que la concentration atteint 8 mg.L<sup>-1</sup>. Ils ont aussi observé que les concentrations très élevées de BAP inhibent la production des pousses au profit d'une hypertrophie des explants.

La mise en évidence de l'effet des cytokinines sur l'induction de pousses chez les embryons immatures a montré un effet significatif des cytokinines sur le bourgeonnement des embryons immatures. La combinaison BAP/KIN aux concentrations de 1,5 et 2 mg.L<sup>-1</sup>, a permis d'induire le nombre le plus important de pousses, de feuilles et d'entre nœuds. Cette formation active de pousses en présence du couple BAP/KIN s'expliquerait par le fait que les cytokinines sont des hormones, qui à forte concentration inhibent la dominance apicale. Cette inhibition de la dominance apicale entraîne l'activation de la dominance caulinaire qui se traduit par une prolifération de pousses axillaires et adventives (Ellis & Poyser, 2002). Selon Pathi & Tuteja (2013), la concentration de 2 mg.L<sup>-1</sup> de la combinaison BAP/KIN favorise la formation d'un nombre important de bourgeons chez certaines variétés de cotonnier.

Les fortes concentrations de BAP ont induit le nombre le plus élevé de pousses.

Chez *Ocimum canum*, Essozima *et al.* (2014) ont observé une augmentation du taux d'induction de pousses lorsque le milieu est additionné de la BAP. Cependant, les faibles concentrations de BAP et de KIN se sont révélées peu favorables. Cela pourrait s'expliquer par le fait qu'il faut une concentration optimum pour stimuler la formation de pousses. Nos résultats corroborent ceux de Pathi & Tuteja (2013) qui ont montré que les faibles concentrations de BAP et de KIN affectent négativement le taux d'induction de pousses provenant des embryons immatures de cotonnier. Ces résultats ont également montré que les cytokinines utilisées à fortes doses stimulent la formation de feuilles. En effet Afolabi-Balogun *et al.* (2015), les cytokinines interviennent dans les processus de différenciation cellulaire, principalement au niveau des feuilles et des bourgeons en favorisant la production de chlorophylle, la régulation de la photosynthèse et l'ouverture des feuilles.

### **Effet de la gibbérelline sur l'élongation des pousses de cotonnier**

L'étude de l'élongation des pousses a montré que la GA3 influence l'élongation des pousses. La meilleure élongation a été obtenue avec les concentrations de 0,5 et 1 mg.L<sup>-1</sup> à partir des bourgeons terminaux. Ce résultat s'explique par le fait que la GA3 a pour rôle de promouvoir la croissance des entre-nœuds en augmentant la synthèse des protéines grâce à son action sur la duplication de l'ADN (Chaussat *et al.*, 1980). Ces résultats sont en conformité avec ceux obtenus par Belaizi *et al.* (1989) qui ont montré que les bourgeons réagissent différemment en fonction de la concentration de GA3 dans le milieu. Ainsi, ils ont allongé des jeunes pousses de pommiers (*Pyrus malus*) avec des concentrations de GA3 variant entre 0,3 et 1,5 µM. Ceci confirme la spécificité de la réponse des espèces en fonction des hormones et de leurs concentrations.

Chez les pousses provenant des embryons immatures par contre, les concentrations de 1 et 1,5 mg.L<sup>-1</sup> se sont révélées plus favorables à leur élongation. Cela explique la spécificité de réponse des explants. En effet la réponse de l'explant dépend de la composition de milieu, de la nature et type d'explant. Ainsi, contrairement aux bourgeons terminaux, les embryons immatures auraient besoin de concentrations plus élevées pour stimuler leur élongation. Pendant que des espèces exigent des concentrations élevées, chez d'autres espèces, de faibles concentrations sont suffisantes pour l'élongation. Ainsi, chez le pommier la concentration de 1,5 µM a permis d'obtenir la meilleure élongation (62,5 %) (Belaizi *et al.*, 1989). Au-delà de cette concentration, le taux d'élongation diminue.

### **Effet des auxines sur l'enracinement des pousses**

L'enracinement de pousses obtenues après élongation a été réalisé sur un milieu MS additionné d'auxine (AIA, AIB et 2,4-D) à différentes concentrations. Les résultats ont montré que ces hormones ont significativement influencé la rhizogenèse des pousses provenant des bourgeons terminaux. En effet, les auxines ont pour rôle de stimuler l'élongation cellulaire en favorisant le déclenchement hormonal de la rhizogenèse (Margara, 1983). Selon Belaizi *et al.* (1989) l'aptitude des explants à l'enracinement est influencée par le type d'auxine. De plus, Afolabi-Balogun *et al.* (2015) ont montrés que 1,5 mg.L<sup>-1</sup> d'AIA induit un taux d'enracinement élevé chez le cotonnier. Les tests réalisés avec les embryons immatures ont montré que l'AIB s'est révélé plus favorable à l'enracinement aux concentrations de 1 et 1,5 mg.L<sup>-1</sup>.

L'acclimatation des vitroplants a consisté à les introduire dans leur habitat naturel de façon progressive. Les résultats ont montré une différence d'adaptation en fonction de l'origine du vitroplant. Les vitroplants provenant des embryons immatures s'adaptent mieux au milieu naturel que ceux provenant des bourgeons terminaux.

Dans notre étude, le taux de survie élevé des vitroplants issus des embryons immatures pourrait s'expliquer par le fait que les embryons possèdent des caractéristiques physiologiques leur permettant de germer et régénérer un nouvel individu lorsque les conditions sont favorables. Les vitroplants issus des embryons immatures induisent plus de racines que ceux issus des bourgeons terminaux, ce qui expliquerait le taux de survie élevé de ces plantes. Le nombre de feuilles en revanche n'a pas été influencé par l'origine des vitroplants.

### 3.3. CONCLUSION PARTIELLE

La micropropagation est une technique très importante dans le processus de multiplication *in vitro* des végétaux. Le type d'hormones et l'origine de l'explant sont des paramètres majeurs dans la réussite de cette technique. Notre étude a permis de mettre en évidence la combinaison benzylamminopurine/kinétine (BAP/KIN) comme étant la meilleure combinaison pour induire des bourgeons chez le cotonnier (1,5 et 2 mg.L<sup>-1</sup>). La gibbérelline (GA<sub>3</sub>) à la concentration de 0,5 mg.L<sup>-1</sup> est idéale pour allonger les bourgeons terminaux et la concentration de 1 mg.L<sup>-1</sup> pour les embryons immatures.

L'acide indole-3-acétique (AIA) (1 mg.L<sup>-1</sup>) permet une bonne rhizogenèse chez les bourgeons terminaux et l'acide indole butyrique (AIB) à la même concentration est favorable pour induire les racines chez les embryons immatures.

L'étude de l'acclimatation a montré que les vitroplants issus des embryons immatures répondent plus favorablement à l'acclimatation, et ont présenté le taux de survie le plus élevé. L'acclimatation étant une étape critique dans la réussite des techniques *in vitro* à cause des problèmes de survie, nous pouvons dire que les embryons immatures de cotonnier représentent les meilleurs explants pour une multiplication en masse chez le cotonnier.

# **CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES**

L'objectif de cette étude est de régénérer *in vitro* le cotonnier afin de contourner les barrières génétiques et obtenir du matériel végétal sain pour améliorer la productivité et la qualité du cotonnier cultivé en Côte d'Ivoire. Pour ce faire, un protocole a été élaboré pour optimiser la production de cals puis d'embryons de la variété de cotonnier Y331B-R5 (cultivée en Côte d'Ivoire). Ainsi, nous avons étudié l'effet de différents facteurs sur la multiplication cellulaire du cotonnier, étudié les possibilités d'induire des embryons par embryogenèse somatique puis, comparé les teneurs de certains composés biochimiques des cals embryogènes et non embryogènes. Enfin, nous avons induit des pousses à partir des embryons immatures et des bourgeons terminaux de cotonnier.

L'embryogenèse somatique indirecte étant tributaire d'une bonne callogenèse, l'étude de l'amélioration de la callogenèse a permis de montrer que le glucose à la concentration de 30 g.L<sup>-1</sup> est nécessaire pour induire des cals friables et capables de donner des embryons somatiques chez le cotonnier. Le test réalisé avec les auxines a permis d'identifier le 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D) à la concentration de 0,1 mg.L<sup>-1</sup> comme le meilleur dérivé de l'auxine comparativement aux autres. Chez les cytokinines, la Kinétine (KIN) à la concentration de 0,5 mg.L<sup>-1</sup> donne les meilleurs cals. Enfin, les tests réalisés avec la combinaison hormonale ont montré que la combinaison du 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D), et de la kinétine (KIN) est plus favorable pour induire des cals chez le cotonnier.

Les études réalisées sur le type d'explant ont révélé que la partie basale de l'hypocotyle âgée de sept jours longs de 5 mm répond plus favorablement à la multiplication cellulaire. Au niveau du brunissement des explants et des milieux de cultures, le chlorure de magnésium (MgCl<sub>2</sub>) à la concentration de 0,75 g.L<sup>-1</sup> a été identifié comme étant plus efficace pour réduire le brunissement causé par la production de composés phénoliques chez le cotonnier. Ainsi, le milieu MSB5 + 30 g.L<sup>-1</sup> glucose + 0,75 g.L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub> + 0,1 mg.L<sup>-1</sup> 2,4-D + 0,5 mg.L<sup>-1</sup> KIN a été identifié comme ayant une potentialité callogénique supérieure aux autres milieux de culture testés.

L'étude de l'embryogenèse somatique a permis d'induire des embryons à partir des cals friables. Les résultats montrent que l'induction de cellules embryogènes chez le cotonnier serait sous le contrôle d'interactions de phytohormones 2,4-dichlorophénoxyacétique/kinétine (2,4-D/KIN) et du rapport nitrate d'ammonium/nitrate de potassium (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>/KNO<sub>3</sub>) dans le milieu de culture. Les milieux G30 (MIE + 30 g.L<sup>-1</sup> glucose) et H<sub>3</sub> (MIE + 30 g.L<sup>-1</sup> glucose + 0,1 mg.L<sup>-1</sup> 2,4-D + 0,5 mg.L<sup>-1</sup> KIN) sont les plus embryogènes.

Quant aux composés biochimiques, l'étude a montré que l'aptitude à l'induction de cellules embryogènes est liée à la biosynthèse de plusieurs composés phénoliques et de leur accumulation dans les cals de cotonnier. Ainsi, l'acide salicylique et la catéchine ont été identifiés comme des marqueurs phénoliques de l'induction de cellules embryogènes chez le cotonnier. Cette étude a donc mis en évidence l'existence d'un métabolisme phénolique actif endogène au cours de l'induction de structures embryogènes chez le cotonnier.

Enfin, concernant la voie de multiplication par la micropropagation, l'étude a montré que la combinaison benzylaminopurine/kinétine (BAP/KIN) est plus favorable pour induire des pousses chez le cotonnier. La gibbérelline (GA3) à la concentration de 0,5 mg.L<sup>-1</sup> a permis une bonne élévation des pousses provenant des bourgeons terminaux et la concentration de 1,5 mg.L<sup>-1</sup> a permis d'allonger les embryons immatures. L'acide indole-3-acétique (AIA) (1 mg.L<sup>-1</sup>) a permis d'obtenir un grand nombre de racines chez les bourgeons terminaux. Chez les embryons immatures, l'acide indole butyrique (AIB) à la concentration de 1 mg.L<sup>-1</sup> a induit un nombre élevé de racines.

Les vitroplants issus des embryons immatures ont répondu favorablement à l'acclimatation avec le taux de survie le plus important. L'acclimatation étant une étape critique dans la réussite des techniques *in vitro* à cause des problèmes de survie, nous pouvons dire que les embryons immatures de cotonnier représentent les meilleurs explants pour une multiplication en masse chez le cotonnier.

L'ensemble des résultats acquis suggèrent plusieurs perspectives de travail. Ainsi, pour optimiser l'embryogenèse, il serait souhaitable de :

- tester les potentialités embryogéniques d'autres milieux de culture tels que (Schenk & Hildebrandt (1972), Kao & Michayluk (1975), Chu (N6) (1978), Lloyd & Mc Cown (1980)), afin de déterminer la composition du milieu de culture la plus favorable à l'embryogenèse chez le cotonnier ;
- faire une étude plus approfondie des enzymes de biosynthèse et de dégradation intervenant dans le processus de l'embryogenèse afin de comprendre leur rôle exacte au cours des différentes subcultures ;
- faire une étude histologique des embryons obtenus afin de comprendre pourquoi après l'induction, ces embryons ne suivent pas les différentes étapes de l'embryogenèse pour aboutir à la régénération ;

- faire une étude intégrale du génome des variétés de cotonnier dite embryogène (Coker) en comparaison avec nos variétés locales, afin de comprendre certains mécanismes du processus de l'embryogenèse somatique.

## **RÉFÉRENCES**

- Abdellatef E. & Khalafallah M.M. (2008). Influence of growth regulators on callus induction from hypocotyls of medium staple cotton (*Gossypium hirsutum* L). Cultivar Barac B-67. *Journal Soil Research*, 2(1) : 17-22.
- Abeda Z.H.J. (2016). Optimisation de la production des anthocyanes par culture cellulaire de l'oseille de Guinée [*Hibiscus sabdariffa* L. (Malvaceae)], isolement et étude de quelques activités biochimiques. Thèse de Doctorat, UFR des Sciences de la Nature, Université Nangui Abrogoua (Abidjan, Côte d'Ivoire), 101 p.
- Abrahamsson M., Valladares S., Merino I., Larsson E. & Von-Arnald S. (2017). Degeneration pattern in somatic embryos of *Pinus sylvestris* L. *In Vitro Cellular & Development Biology Plant*, 53(2) : 86-96.
- AFD (2018). Cotonnier (*Gossypium hirsutum*), Connaissance des végétaux-Fruit. Appui à la Formation et au Développement, ONG Lourvain Coopération, Belgique.[http://www.afd.be/~palt-ch/coton/conaiss/FR\\_coton.htm](http://www.afd.be/~palt-ch/coton/conaiss/FR_coton.htm). Consulté le 18/09/2018.
- Afolabi-Balogun N.B., Inuwa H.M., Ume O., Bakare-Odunola M. & Adebola P.A. (2015). Optimization of micropropagation protocol for three cotton varieties regeneration from apical Shoot. *Journal of Plant Breeding and Crop Science*, 7(2) : 38-43.
- Agnès B., Hélène R. & Louise F. (2013). La culture *in vitro* en TPE. <http://culture-in-vitro-tpe.e-monsite.com/>, consulté le 18/09/2018.
- Akbar M. A., Karmakar B. K. & Roy S. K. (2003). Callus induction and high-frequency plant regeneration of pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.). *Plant Tissue Culture*, 13(2) : 109-116.
- Antoine G. (2004). La transformation génétique chez les arbres forestiers : principales stratégies utilisées et leurs applications/genetic transformation in forest trees : main strategies and applications. *Bois et Forêts des Tropiques*, 282(4) : 52-66.
- Arbaoui S., Soufi S. & Bettaieb T. (2018). Contrôle du brunissement enzymatique en culture *in vitro* : Cas de l'amaryllis (*Amaryllis belladonna* L.). *Journal of New Sciences*, 60(4) : 3850-3855.
- ARECA (2013). Filière coton, Bulletin bimensuel d'information des acteurs des filières coton et anacarde en Côte D'Ivoire, N°0001/Mars 2013. 4p. Consulté le 18/01/2017.
- Attrée S.M., Budlmir S. & Fowke L.C. (1990). Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from cultured shoots and cotyledon of seedlings from stored seeds of black and white spruces (*Picea mariana* and *Picea glauca*). *Canadian Journal of Botany*, 68(1) : 30-34.

- Augé R., Beauchesne G., Noccon-Gibot B., Minier R., Morand J.C., Decourtye L., Oudin Y. & Vidalfe H. (1982). La culture *in vitro* et ces applications horticoles. Technique et documentation (Lavoisier). 153 p.
- Aydin M., Hossein P.A., Haliloğlu K. & Tosun M. (2016). Effect of polyamines on somatic embryogenesis via mature embryo in wheat. *Turkish Journal of Biology*, 40 : 1178-1184.
- Ayolié K., El Yacoubi H. & Rochdi A. (2007). Influence du 2,4-D et de l'explant embryonnaire sur la callogenèse du blé dur. *Bulletin de la Société Pharmaceutique de Bordeaux*, 146 : 97-112.
- Azano Y., Katsumoto H., Inokuma C., Kaneko S., Ito Y. & Fujiie A. (1996). Cytokinin and thiamine requirements and stimulative effect of riboflavin and alpha-ketoglutaric acid on embryogenesis callus induction from the seeds of *Zoysia japonica* Steud. *Plant physiology*, 149 : 413-417.
- Baaziz M., Aissam F., Bendiad K. & El Hadrami I. (1994). Electrophoretic-patterns of acid soluble proteins and active isoforms of peroxydase and polyphenoloxydase typifying calli and somatic embryos of two reputed date palm cultivars in Morocco. *Euphytica*, 76 : 159-168.
- Bachelier B. (2016). Coton : suivez le fil... Dossier Fibres et teintures végétales - Jardins de France, 644 : 3 p.
- Bagayoko K. (2013). L'importance et l'avenir du coton en Afrique de l'ouest: cas du Mali. Thèse de Docteur en Sciences Économiques, Université de Grenoble (Grenoble, France) : 420 p.
- Bahieldin A., Mahfouz H.T., Eissa H.F., Saleh O.M., Ramadan A.M., Ahmed I.A., Dyer W.E., El-Itriby H.A. & Madkour M.A. (2005). Field evaluation of transgenic wheat plants stably expressing the HVA1 gene for drought tolerance. *Physiologia plantarum*, 123 : 421-427.
- Beasley C.A. (1971). *In vitro* culture of fertilized cotton ovule. *Bioscience*, 21 : 906-907.
- Belaizi M., Rajbir S.S., Alain D. & Sangwan S.N. (1989). Maîtrise des étapes de la micropropagation du Pommier (*Pyrus malus* L. cv.) Golden delicious, *Bulletin de la Société Botanique de France*, 136(3) : 187-197.
- Benabdelhafid Z. (2015). Embryogenèse somatique, variations somaclonales et tolérance à la salinité chez le blé dur (*Triticum durum* Desf.). Thèse de doctorat de 3ème cycle, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Frères Mentouri Constantine (Constantine, Algérie), 144p.

- Beniken L., Omari F., Dahan R., Van Damme P., Benkirane R. & Benyahia H. (2013). Évaluation de l'effet du stress hydrique et du porte greffe sur la clémentine *Citrus reticulata* Swingle var. Sidi Aissa. *Journal of Applied Biosciences*, 71 : 5692-5704.
- Benyahia H., Chetto O., Dominique D. & Yann F. (2012). Mise au point des conditions de calogenèse, caulogenèse et rhizogenèse chez les porte-greffes d'agrumes à partir d'épicotyle: cas du citrange Troyer. *Journal of Applied Biosciences*, 60 : 4375-4387.
- Berti F., Hofs J.L., Zagbaï H.S. & Lebailly P. (2006). Le coton dans le monde, place du coton africain et principaux enjeux. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 10(4) : 271-280.
- Bingshan Z., Hungacan X., Ying L., Guangtian Y. & Zhenfei Q. (2000). Tissue culture for mass propagation and conservation of rattans. Chine, p [http://www.bioversityinternational.org/publications/Web\\_version/576/ch522.htm](http://www.bioversityinternational.org/publications/Web_version/576/ch522.htm). Consulté le 19/07/2018.
- Boquet D.J. & Moser E.B. (2003). Boll retention and boll size among intrasymphodial fruiting sites in cotton. *Crop Science*, 43 : 195-201.
- Bouchelta A., Boughdad A. & Blenzar A., (2005). Effets biocides des alcaloïdes, des saponines et des flavonoïdes extraits de *Capsicum frutescens* L. (solanaceae) sur *Bemisia tabaci* (gennadius) (Homoptera aleyrodidae). *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 9 : 259-269.
- Bourgou L., Sanfo D. & Diané K.S. (2013). Apports génétiques potentiels de variétés de cotonniers du Brésil à l'amélioration des variétés cultivées des pays du C4: 2. Analyse des caractéristiques technologiques de la fibre. *Tropicultura*, 31(4) : 231-237.
- Bradford M. (1976). A rapid and sensitive methode for the quantitation microgram quantities of protéins utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72 : 248-254.
- Brhadda N., Walalib L.D.E. & Abousalim A. (2008). Étude histologique de l'embryogenèse somatique de l'olivier (*Olea europaea* cv.) Picholine marocaine. *Fruits*, 62(2) : 115-124.
- Bruneton J. (1999). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Paris, France : Lavoisier, 1120 p.

- Buffard-Morel J. (1968). Recherches sur la culture *in vitro* des embryons de palmier à huile. v. effets du glucose, du lévulose, du maltose et du saccharose. *Oléagineux*, 23(12) : 707-711.
- Cao J.L., Zhang X.L., Jin S.H., Yang X.Y., Zhu H.G. & Fu L.L. (2008). An efficient culture system for synchronization control of somatic embryogenesis in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Acta Agronomica Sinica*, 34(2) : 224-231.
- Carron M.P., Auzac J., Etienne H., El Hadrami I., Housti F., Michaux-Ferriera N. & Montero P. (1992). Biochemical and histological features of somatic embryogenesis in rubber (*Hevea brasiliensis* Mull. Arg.). *Indian Journal of Natural Rubber Research*, 5 : 7-17.
- CCI (2010). Types de coton. Des exploitations pour un développement durable. [www.guidedecoton.org/chapitre5/types-de-coton](http://www.guidedecoton.org/chapitre5/types-de-coton), Consulté le 10/08/2017.
- CCIC (2014). Bulletin du Comité Consultatif International du Coton. 220 p, Consulté le 30/30/2017.
- Chisari M., Barbagallo R.N. & Spagna G. (2007). Characterization of polyphenoloxidase and peroxidase and influence on browning of cold stores strawberry fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(9) : 3469-3476.
- Chaussat R., Bigot C., Nozeran R., Courduroux J.-C., Favre J.-M., Champagnant T. P., Margara C., Jullien M., Chupeau Y., Bourgin J.P., Raquin M., Deshayes A., Cornu A., Favreau J. (1980). La multiplication végétative des plantes supérieures ; Ed. BORDA, Paris pp. 31-43.
- Chu C.C. (1978). The N6 medium and its applications to anther culture of cereal crops. *Proceed. Sympos. Plant Tissue Culture*, Science Press Beijing, pp 43-50.
- CIRAD (2012). Textile biologique et écologique. <https://www.natexbio.com/textile-biologique-et-ecologique/>. Consulté le 7/01/2020.
- CIRAD (2019). Le coton <https://www.cirad.fr/nos-recherches/filieres-tropicales/coton/plantes-et-usages>. Consulté le 5/02/2020.
- CIRAD (1999). Les nouvelles approches de la génétique cotonnière. *Agriculture et développement*, 22 : 49- 59.
- CIRAD (2018). Le coton, fil des temps, des marches et des cultures. Exposition du salon international de l'agriculture de Paris, Montpellier, CIRAD, 15p. [http://www.cirad.fr/upload/fr/communique/plaquette\\_sia\\_coton.pdf](http://www.cirad.fr/upload/fr/communique/plaquette_sia_coton.pdf). Consulté le 10/10/2017.

- Collet G.F. & Lê C.L. (1988). Micropropagation de porte-greffes de pommier et de poirier. Enracinement *in vitro* de *Pyrus malus* L. (M25, 26, 27, MM106, M9 type jork) et *Cydonia oblonga* Mill. (A). *Revue suisse Viticulture Arboriculture, Horticulture*, 20(2) : 131-138.
- Constable G.A. (2015). Cotton breeding and physiology research in Australia. Presented at 75th Plenary Meeting of the ICAC, Mumbai, India, December 6-11, 2015. [www.icac.org](http://www.icac.org). Consulté le 14/04/2017.
- Coulibaly A. (2014). Situation actuelle et défis de la filière coton ivoirienne. Communication de la Côte d'Ivoire à la 73ème plénière du comité exécutif de coton (CCIC), Consulté le 15/02/2018, 5 p.
- Cretenet M., Mohtar R.H. & Moussa A.A. (2006). L'aléa pluviométrique dans la prise de décisions en culture cotonnière pluviale. *Cahier Agricole*, 15(1) : 109-115.
- Cronquist A. (1981). An integrated system of classification of flowering plants. Columbia University Press, New York (USA) : 1262 p.
- Davidonis G.H. & Hamilton R.H. (1983). Plant regeneration from Callus tissue of *Gossypium klotzchianum* L. *Plant Science Letter*, 32 : 89-93.
- Davidonis G.H., Johnson A.S., Landivar J.A. & Fernandez C.J. (2004). Cotton fiber quality is related to boll location and planting date. *Agronomic Journal*, 96 : 42-47.
- De Neto V.B.P. & Otoni W.C. (2003). Carbon sources and their osmotic potential in plant tissue culture : does it matter. *Scientia Horticulturae*, 97 : 193-202.
- De Silva A.E., Kadir M.A., Aziz M.A. & Kadzimin S. (2008). Callus induction in pineapple (*Ananas comosus* L. cv.) moris and josapine. *International Journal of Agricultural Research*, 3(4) : 261-267.
- Declerck V. & Korban S.S. (1986). Influence of growth regulators and carbone sources on callus in duction growth and morphogenesis from leaf tissues of peach (*Prunus persica* L. Batsch). *Journal of Horticultura Science*, 71(1) : 49-50.
- Demol J., Baudoin J.P., Loueant B.P., Marechal R. & Mergeal G. (2002). Le cotonnier *Gossypium* sp, in « Amélioration des plantes tropicales, application aux espèces cultivées en régions tropicales ». 400-405.
- Desjardins Y. & Gosselin A. (1987). Influence des concentrations hormonales. Du milieu de culture et d'un anti-oxydant sur le temps de doublage des tiges de framboisiers 'madawaska'cultives *in vitro*. *Canadian Journal of Plant Science*, 67 : 863-869.

- Dhawan S.R. & Nanda K.K. (1982). Stimulation of root formation on *Impatiens balsamina* L. Cuttings by coumarin and the associated biochemical changes. *Biologia Plantarum*, 24: 177-182.
- Dia M. (2019). Coton : la Côte d'Ivoire se hisse à la 3ème place africaine devant le Burkina Faso. <https://afrique.latribune.fr/afrique-de-l-ouest/cote-d-ivoire/2019-05-10/coton-la-cote-d-ivoire-se-hisse-a-la-3eme-place-africaine-devant-le-burkina-faso-816734.html>. Consulté le 9/02/2020.
- Dixon R.A. & Paiva N.L. (1995). Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism. *Plant Cell*, 7(7) : 1085-1097.
- Dossa E.L., Bertrand B. & Aidam A. (1994). Microbouturage *in vitro* du *Cola nitida* (Schott et Endl.). *Café Cacao Thé*, 38(1) : 57-60.
- Druart P.H. & Samyn G. (1995). Carbohydrates and *in vitro* organogenesis. Bulletin des Recherches Agronomiques de Gembloux 30(1-2) : 1-3.
- Dublin P. (1980). Multiplication végétative *in vitro* de l'*Arabusta*. Association Scientifique Internationale du Café (ASIC), 9<sup>ème</sup> Colloque, Londres, 1980ASIC, 9<sup>ème</sup> Colloque scientifique sur le café, 1980, Londres, France, pp 571-591.
- Dubois M., Gilles K., Hamilton J., Rebers P. & Smith F. (1956). Colorimetric methods for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28: 350-356.
- Dutt M. & Grosser J. W. (2009). Evaluation of parameters affecting *Agrobacterium* mediated transformation of Citrus. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 98 : 331-340.
- Duval R. (2005). Les conditions didactiques de l'apprentissage de la géométrie développement de la visualisation, différenciation des raisonnements et coordination de leur fonctionnement. *Annales des Didactique et de Science cognitives*, 10 : 5-53.
- Egerstotter U., Mo L. & Von Anold S. (1993). Extracellular protein in embryogenic suspension cultures of norway spruce (*Picea abies*). *Physiology Plant*, 88 : 315-321.
- El Yacoub H., Chriki N., Nadif L.A. & Rochdi A. (2010). Le syndrome de la feuille jaune 'yls': état phytosanitaire du *Saccharum sp.* Au Maroc et élimination du virus 'scylv' par culture *in vitro*. *Lebanese Science Journal*, 11(1) : 31-43.
- Ellis T.H.N. & Poyser S.J. (2002). An integrated and comparative view of pea genetic and cytogenetic maps. *New Phytologist*, 153 : 17-25.

- Essozima A., Djidjole K.E., Kodjo G. & Rassimwai P. (2014). Effet de deux phytohormones exogènes et du NaCl sur la morphogenèse *in vitro* d'*Ocimum canumsims*. *European Scientific Journal*, 10(33) : 433-444.
- Evans D.A., Sharp W.R. & Flien C.E. (1989). Growth and behaviour of cell cultures embryogenesis and organogenesis in plant tissue culture, methods and application agricultures. Thoupe T. A. Ed Academic press, pp 45-113.
- FAO (2018). Marché mondial du coton en 2017 : les producteurs africains ont été gagnants. <http://www.commodafrica.com/24-01-2018-marche-mondial-du-coton-en-2017-les-producteurs-africains-on>. Consulté le 23/08/2018.
- FAO (2014). Gestion intégrée de la production et des déprédateurs du coton. Guide du facilitateur pour les champs écoles des producteurs, Rome. 89 p.
- Fehér A., Pasternak T.P. & Dudits D. (2003). Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell, Tissue and Organe Culture*, 74 : 201-228.
- Feng R., Zhang B., Zhang W. & Wang Q. (2000). Genotype analysis in cotton tissue culture and plant regeneration. In: Larkin, P.J. (ed.). Proceedings of the 4<sup>th</sup> Asia-pacific conference on Agricultural Biotechnology, Darwin 13-16 July 1998, pp 148-189.
- Finer J.J. (1988). Plant regeneration from somatic embryogenic suspension cultures of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Plant Cell Report*, 7 : 399-402.
- Firoozabady E. & Deboer D. (1993). Plant regeneration via somatic embryogenesis in many cultivars of cotton (*G. hirsutum* L.). *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant*, 29 : 166-173.
- Firoozabady E., Heckert M. & Gutterson N. (2006). Transformation and regeneration of pineapple. *Plant Cell, Tissue and Organe Culture*, 84 : 1-16.
- Fok M. (2016). Impacts du coton-Bt sur les bilans financiers des sociétés cotonnières et des paysans au Burkina Faso. *Cahiers Agricultures* 25(3): 1–13.
- Fotso S, Donfagsiteli T, Omokolo N. (2003). Comparaison des premières étapes de l'embryogenèse somatique chez *Baillonella toxisperma* et *Vitellaria paradoxa* Sapotacées. *Biotechnologie Agronomie Société et Environnement*, 10(4) : 271-280.
- Foyer C.H. & Noctor G. (2011). Ascorbate and Glutathione : The Heart of the Redox Hub. *Plant Physiological*, 155 : 2-18.
- Gamborg O.L., Miller R.A. & Ojima K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, 50 : 151-158.

- Ganesan M, Jayabalan N. (2004). Evaluation of haemoglobin (erythrogen): for improved somatic embryogenesis and plant regeneration in cotton (*Gossypium hirsutum* L. cv. SVPR 2). *Iranian Journal of Biotechnology*, 3(3): 144-151.
- Gautier F. (2017). Aptitude du Douglas (*Pseudotsuga menziesii*) à l'embryogenèse somatique : approches de physiologie cellulaire et moléculaire via l'analyse du protéome et du transcriptome. Thèse de Doctorat, Faculté des Biosciences de l'Environnement et de la Santé, Université de Limoges (Limoges, France), 329p.
- Georges E.F. & Scherrington P.D. (1984). Plant propagation by tissue culture, Exegetic Ltd, Basingstoke, UK pp 241-279.
- Ghomari S. (2014). Production de variants de pommes de terre (*Solanum tuberosum* L.) tolérants au stress salin. Thèse de Doctorat, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Abdelhamid Ibn Badis De Mostaganem (Mostaganem, Algérie), 161p.
- Ghomari S. (2016). Régénération via organogenèse ou embryogenèse chez le *Scorpiurus*. *Agriculture*, 13(6) : 265-272.
- Gonzalez B.H., Chetto O., Dominique D. & Yann F. (2012). Mise au point des conditions de callogenèse, caulogenèse et rhizogenèse chez les porte-greffes d'agrumes à partir d'épicotyle: cas du citrange Troyer. *Journal of Applied Biosciences*, 60 : 4375-4387.
- Grafi G. (2004). Multiplication *in vitro* des plantes. *Developmental Biology*, 268 : 1-6.
- Haicour R. (2003). Biotechnologie végétale. Techniques de laboratoire. Edition Technique et Document Montréal, Université Francophone 23(24): pp 305.
- Hakam N., Sripada U.M, Gaboun F., Rabha A, Ibriz M. & Iraqi D. (2014). Effect of genotypes and culture media on embryogenic callus induction and plantlet regeneration from mature embryos of durum wheat. *Romanian Agricultural Research*, 31 : 121-128.
- Hamad A.M. & Taha R.M. (2009). Effect of explants density on the *in vitro* prolifération and growth of separated and cluster shoots of smooth Cayenne pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.). *Asian Journal of Plant Sciences*, 8(4) : 313-317.
- Hamasaki R., Purgatto E. & Mercier H. (2005). Glutamine enhances competence for organogenesis in pineapple leaves cultivated *in vitro*. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17(4) : 383-389.
- Han H. & Xi T., 1989. Rapid propagation of lettuce by embryos. *Plant Physiology*, 2 : 17-20.

- Handaji N., Arsalane N., Lamarti A., Dambier D., Benyahia H., Miaghizo H., Cheikh O.Y. & Ollitrault P. (2005). Induction de l'embryogenèse somatique et régénération des plantules chez les mandariniers (*Citrus reticulata* L). *El Awamia*, 114(2) : 109-118.
- Hannweg K., Watt M.P. & Berjak F. (1996). A simple methode for micropropagation of *Bowiea vlubilis* from inflorescence explants. *Botanical Bulletin Academia Sinica*. 37 : 213-217.
- Haouala F., farhat N. & Chabchoub L. (2010). Effets du type et de la position de l'explant sur l'induction de cals chez le gerbera (*Gerbera jamesonii* Bolus). *Tropicultura*, 28(1) : 57-60.
- Hilario P.M.G. (2019). Production mondiale de coton par pays. <https://fr.statista.com>statistiques>. Consulté le 13/11/2019.
- Hofs J.L. (2010). Enjeux environnementaux et agroéconomiques de cotonniers transgéniques Bt en petit paysannat africain : recommandations et aide à la décision pour leur utilisation raisonnée. Thèse de doctorat, Sciences agronomiques, université de Liège (Gembloux Agro-Bio Tech). <http:// bictel-fusagx.ulg.ac.be/ETD-db/collection/available/ FUSAGxetd-03192010-114411/>
- Hougni A. & Touré Y. (2014). Trois lignées régionalisées de cotonnier (*Gossypium hirsutum* L.) pour l'amélioration de laproductivité de la culture cotonnière au Bénin. Atelier Scientifique INRAB (sous presse) Consulté le 22/09/2017.
- Houndonougbo A. (1989). Influence des différentes concentrations d'acide indole-3-acétique, d'acide naphthalène-acétique, d'acide 2,4-Dichlorophenoxyacétique et de kinétine sur la callogenèse et l'organogenèse *in vitro* de fragment d'entre nœud de deux variétés de patate douce *Ipomaea batatas* L. *Agronomy*, 9 : 653-660.
- Hu P., Meng Y. and Wise R.P. (2009). Functional Contribution of Chorismate Synthase, Anthranilate Synthase, and Chorismate Mutase to Penetration Resistance in Barley–Powdery Mildew Interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22(3) : 311-320.
- Ihssen J., Jankowska D., Ramsauer T., Reiss R., Luchsinger R. & Wiesli L. (2017). Engineered *Bacillus pumilus* laccase-like multi-copper oxidase for enhanced oxidation of the lignin model compound guaiacol. *Protein Engineering Design and Selection*, 30(10) : 449-453.

- Ishii Y, Takamura T, Goi M. & Tanaka M. (2004). Callus induction and somatic embryogenesis of *Phalaenopsis*. *Plant Cell Report*, 17(6) : 446-450.
- Jheng F., Liauh Y., Chung J. & Huang P. (2006). Enhancement of growth and regeneration efficiency from embryogenic callus culture of *Oncidium* (Gower Ramsey) by adjusting carbohydrate sources. *Plant Science*, 170 : 1133-1140.
- Jorge L.M. Permingeat H.R, Romagnoli M.V, Heisterborg C.M, Ruben H.V. (1988). Multiple shoot induction and plant regeneration from embryonic axes of cotton. *Plant Cell Tissue and Organe Culture*, 54 : 131-136.
- Kanazawa T., Nakamura S., Momoi M., Yamaji T., Takematsu H., Yano H., Sabe H., Yamamoto A., Kawasaki T. & Kozutsumi Y. (2000). Inhibition of cytokinesis by a lipid metabolite. *Journal of Cell Biology*, 149 : 943-950.
- Kao K.N. & Michayluk M.R. (1975). Nutritional requirements for growth of *Vicia hajastama* cells and protoplasts at a very low population density in liquid media. *Planta*, 126 : 105-117.
- Karami O. & Saidi A. (2010). The molecular basis for stress-induced acquisition of somatic embryogenesis. *Molecular Biology Reports*, 37(5) : 2493-2507.
- Kawtar L., Najat H., Brhadda N., Najat A., Gmira N., Elmustapha E., Tarik A. & Benyahia H. (2015). Optimisation de l'induction de callogenèse à partir des embryons excisés de mandariniers (*Citrus spp.*). *Journal Application of Bioscience*, 89 : 8300-8310.
- Ke D. & Saltveit J.R. (1989). Carbon dioxide-induced Brown stain development as related to phenolic metabolism in iceberg lettuce. *Journal American Science*, 114(5) : 789-794.
- Khatoon S., Akmal M., Sarin N.B. & Khan J.A. (2014). Cytokinins improve shoot regeneration efficiency in two Indian cotton (*Gossypium hirsutum* cv. *Narashima* and *G. arboreum* cv. AKA-7) cultivars. *Advances in Applied Agricultural Sciences*, 2(8) : 25-31.
- Kishor K.P. & Mehta A.R. (1987). Changes in enzymatic activities in callus cultures of cotton. I-effect of gibberelic acids. *Current Sciences*, 52(21) : 1120-1122.
- Kodjo G., Atsou A., Komi O., Koffi T., Attoh-Mensah M-L., Djidjolé K.E., Dzifa K.A., Aziadekey M., Akpavi S., Essozima A. & Rassimwaï P. (2014). Régénération *in vitro* par organogénèse directe de pousses à partir de boutures de trois cultivars de patate douce (*Ipomoea batatas*) originaire du togo. *European Scientific Journal*, 10(27) : 7431-7881.

- Koffi K.K., Anzara G.K., Malice M., Djè Y, Baudoin J-P & Bi I.Z. (2009). Morphological and allozyme variation in a collection of *Lagenaria siceraria* (Molina) Standl. From Côte d'Ivoire. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 13: 257-270.
- Komura H., Chokyu S. & Ikeda Y. (1990). Micropropagation of *Asparagus* through somatic embryogenesis. 1. Somatic embryogenesis and plant regeneration from seedlings. *Bull. Hiroshima Prefect. Agricultural Experiment Station*, 53: 43-50.
- Konan Y.K.F. (2015). Stimulation des défenses naturelles du cotonnier (*Gossypium hirsutum* L. malvaceae) par le méthyle jasmonate et l'éthéphon : effet sur la biosynthèse des composés phénoliques et sur la résistance à *Fusarium oxysporium* f. sp. *vasinfectum*, agent causal de la fusariose. Thèse de Doctorat, UFR des Sciences de la Nature, Université Nangui Abrogoua, (Abidjan, Côte d'Ivoire), 202 p.
- Konaté K., Koné M., Koffi K.E., Zouzou M. & Kouadio Y.J. (2013). Induction et prolifération des cals à partir de l'axe embryonnaire du Voandzou [*Vigna subterranea* (L) Verdc. Fabaceae] : effet de la segmentation de l'explant, des phytohormones, de la source de carbone et du génotype. *Afrique Science*, 9(1) : 140-150.
- Koné M. (2003). Contribution à l'étude de l'embryogenèse somatique du Cotonnier : *Gossypium hirsutum* L. (Malvaceae). Callogenèse et cultures de suspensions cellulaires de deux cultivars de la Côte d'Ivoire. Thèse de doctorat de 3<sup>e</sup> cycle, UFR Biosciences, Université de Cocody, (Abidjan, Côte d'Ivoire), 152 p.
- Koné M. (2010). Développement de méthodes de régénération *in vitro* du voandzou [*Vigna subterranea* (L.) Verdc. (Fabaceae)] et analyse de l'homogénéité variétale des plantules régénérées, Thèse de Doctorat d'État, UFR Sciences de la Nature, Université d'Abobo-Adjamé (Abidjan, Côte d'Ivoire), 214 p.
- Kouadio J.Y., Mongomaké K., Djè Y., D'Almeida M.A. & Zouzou M. (2004). L'étiollement est un facteur d'induction de l'embryogenèse somatique au cours de la callogenèse chez deux variétés récalcitrantes de cotonnier (*Gossypium hirsutum* L.) cultivées en Côte d'Ivoire. *Biotechnologie Agronomie Société et Environnement*, 8(3) : 155-162
- Kouadio O.K.S. (2018). Effet de la composition du milieu de culture sur la régénération *in vitro* de l'ananas [*Ananas comosus* (L.) var. Cayenne lisse] par embryogenèse somatique indirecte et impact du stress salin sur les paramètres morphophysologiques des vitroplants régénérés. Thèse de Doctorat, UFR

Sciences de la Nature, Université Nangui Abrogoua (Abidjan, Côte d'Ivoire), 206 p.

- Kouadio O.K.S., Yapo E.S.S., Kouassi K.M., Silue O., Koffi E. & Kouakou T.H. (2018). Improved callogenesis and somatic embryogenesis using amino acids and plant growth regulators combination in pineapple [*Ananas comosus* (L.) Merr. (Bromeliaceae)]. *European Journal of Biotechnology and Bioscience*, 5(5) : 06-16.
- Kouadio O.K.S., Yapo E.S.S., Silue O., Adou B.Y. C. & Kouakou T.H. (2018). Influence of carbohydrates on callus proliferation during somatic embryogenesis in Pineapple [*Ananas Comosus* (L.) Merr. (Bromeliaceae) Var. Cayenne Smooth Cultivar CI 16]. *European Scientific Journal*, 14(15) : 1857-7881.
- Kouakou E.T. & Traoré D. (2010). Maîtrise des mauvaises herbes de la culture cotonnière par des rotations culturales en Côte d'Ivoire. *Cahier Agriculture*, 19(3) : 200-204.
- Kouakou K.L. (2009). Optimisation de la production de plantules de deux espèces de rotin *Laccosperma secundiflorum* (P. Beauv) Kuntze et *Eremospatha macrocarpa* (G. Mann & Wendl.) H. Wendl commercialisées en Afrique tropicale. Thèse de Doctorat, UFR des Science de la Nature, Université d'Abobo-Adjamé, (Abidjan, Cote d'Ivoire), 145 p.
- Kouakou T.H., Zouzou M., Kouadio Y.J. & Anno A.P. (2008). Embryogenèse somatique chez le cotonnier (*Gossypium hirsutum* L.) : évolution des composés lipidiques au cours de la callogénèse et de la culture de suspensions cellulaires. *Afrique Science*, 04(3) : 147-159.
- Kouakou T.H. (2003). Contribution à l'étude de l'embryogenèse somatique chez le cotonnier (*Gossypium hirsutum* L.) : évolution de quelques paramètres biochimiques au cours de la callogénèse et de cultures de suspensions cellulaires. Thèse de doctorat de 3è cycle, UFR Bioscience, Université de Cocody (Abidjan, Côte d'Ivoire), 144 p.
- Kouakou T.H. (2009). Embryogenèse somatique chez le cotonnier (*Gossypium hirsutum* L. (Malvaceae)) : variation des composés phénoliques au cours de la callogénèse et de la culture des suspensions cellulaires. Thèse de doctorat d'état, UFR des Sciences de la Nature, Université d'Abobo-Adjamé, (Abidjan, Cote D'Ivoire), 152 p.
- Kouakou T.H., Kouakou K. L., Kouassi K. M., Koffi K. E. & Koné M. (2014). Influence de la taille des vitroplants et du type d'explant sur la réponse à la callogénèse chez le

- cotonnier (*Gossypium hirsutum* L.) cultivé en Côte d'Ivoire. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 8(2) : 588-595.
- Kouser S. & Qaim M. (2011). Impact of Bt cotton on pesticide poisoning in smallholder agriculture: A panel data analysis. *Ecological Economics*, 70: 2105-2113.
- Krishna M.P. & Narendra T. (2013). High-frequency regeneration via multiple shoot induction of an elite recalcitrant cotton (*Gossypium hirsutum* L. cv Narashima) by using embryo apex. *Plant Signaling & Behavior*, 8(1) : 94-99.
- Kromer K. & Gamian A. (200). Analys of soluble carbohydrates, proteins and lipids in shoots of M67apple rootstock cultured in vitro during regeneration of adventitious roots. *Journal of plant Physiology*, 156 : 775-782.
- Kumar M., Singh H., Shukla K.A., Verma P. & Singh P.K. (2013). Induction and establishment of somatic embryogenesis in elite Indian cotton cultivar (*Gossypium hirsutum* L. cv Khandwa-2). *Plant signaling & Behavior*, 8(10) : 1-6.
- Kumar P.P., Sharma M., Anil S. & Singh P.A. (2005). Micropropagation of *Rosa damascena* and *R. bourbonioana* in liquid cultures. *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation*, 373-385.
- Label K., Handaji N., Brhadda N., Arsalane N., Gmira N., Essalhi E., Aderdour T. & Benyahia H. (2015). Optimisation de l'induction de callogenèse à partir des embryons excisés de mandariniers (*Citrus spp.*). *Journal of Applied Biosciences*, 89 : 8300-8310.
- Latowski D., Surówska E. & Strzalka K. (2010). Regulatory role of components of ascorbate glutathione pathway in plant stress tolerance. In : Ascorbate-gluthatione pathway and stress tolerance in plants, Naser AA, Umar S, Chan MT (Eds), *Springer*, London, England, 443 p.
- Tremblay L. & Lamhamedi M.S. (2006). Embryogenèse somatique au ministère des ressource naturelles et de la du Québec. Laboratoire au site de plantation. *Revue des plants et des hormones*, 9(3) : 6-11.
- Lawson A.J. (2008). Effet de différentes pratiques de taille sur l'amélioration des performances agronomiques du cotonnier *Gossypium hirsutum* L. Thèse de Doctorat, UFR des Sciences et Techniques de Production Végétale, Université de Parakou (Parakou, Bénin), 118 p.
- Ledwòn A. & Gaj M.D. (2011). Leafy cotyledon, fusca expression and auxin treatment in relation to somatic embryogenesis induction in *Arabidopsis*. *Plant Growth Regulator*, 65(1) : 157-167.

- Lege K.E., Cothren J.T. & Smith C.W. (1995). Phenolic acid and condensed tannin concentrations of six cotton genotypes. *Environmen Experimental Botany*, 35(2) : 241-249.
- Leonard B.R., Tindall K.V. & Emfinger K.D. (2006). Fall armyworm survivorship and damage in Bollgard and Bollgard 2 cotton. Beltwide cotton Conf. San Antonio, Texas-January 3-6: 1080-1084.
- Li L. & Qu R. (2002). *In vitro* somatic embryogenesis in turf type bermudagrass: roles of abscisic acid and gibberellic acid and occurrence of secondary somatic embryogenesis. *Plant Breed*, 121 : 155-158.
- Lloyd G. & McCown B. (1980). Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Proceeding International Plant Propagators Society*, 30 : 421-427.
- Löschner J., Kroh L. & Vogel J. (1990). L-Ascorbic acid - A carbonyl component of non-enzymatic browning reactions. Browning of L-ascorbic acid in aqueous model system. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung*, 191(4-5) : 302-305.
- Luczkiewicz M. & Glod D. (2003). Callus cultures of *Genista* plants: *in vitro* material producing high amounts of isoflavones of phytoestrogenic activity. *Plant Science*, 165 : 1101-1108.
- Lugasi A., Hovari J., Sagi K.V. & Biro L. (2003). The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. *Acta Biologica Szegediensis*, 1(4) : 119-125.
- Macheix J.J., Fleuriet A. & Billot J. (1990). Fruit phenolics, CRC press, Boca Roton. In : les polyphenols en agroalimentaire Sarni-Manchado, Cheynier V.2006, Technique & Documentation Lavoisier-Paris, 246 p.
- Macheix J.J., Fleuriet A. & Jay-Allemand C. (2005). Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. *Presses Polytechniques et Universitaires Romandes* (éditions), Paris, France 192 p.
- Magniez F. (2007). Les biotechnologies végétales pour quoi faire? *biotechnologie*, <http://www.technobio.fr/article-5408749.html>. Consulté le 23/08/2018.
- Manivannan M., Periyasamy R. & Devashayam S. (2015). Handheld Isobaric Aesthesiometer for Measuring Two-point Discrimination, *Springer*, 2(35) : 675-685.
- Margara J. (1983). Bases de la multiplication végétative. Les méristèmes et l'organogénèse. INRA, 263 p.

- Mateille T. & Foncelle B. (1989). Techniques de production de vitro-plants de bananier cv. 'Poyo'. *Revue Horticole*, 294 : 39-45.
- Mathews H. (1987). Morphoetic responses from *in vitro* cultured seedling explants of mung bean (*Vigna radiata* L. Wilczek). *Plant Cell, tissue and Organe Culture*, 11 : 233-240.
- May R. & Trigiano R. (1991). Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaves of *dendranthema grandiflora*. *Journal of American Society for Horticultural Science*, 116(2) : 366-371.
- Mayer A. (1987). Polyphenoloxidases in plants, recent progress. *Phytochemistry*, 26 : 11-20.
- Mercier H. & Kerbay G. (1998). Importance of tissue culture technique for conservation of endangered Brazilian bromeliads from rain forest canopy. *Selbyana*, 16 : 147-149.
- Merkle S., Kimberly A., Battle P. & Bailey R. (1998). Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from immature and mature tissues of sweetgum (*Liquidamber styraciflua*). *Plant Science*, 132 : 169-178.
- Miller C. & Skoog F. (1953). Chemical control of bud formation in tobacco stem segments. *American Journal of Botanic*, 40 : 768-73.
- Mishra S., Sanyal I. & Amla D.V. (2012). Changes in protein pattern during different developmental stages of somatic embryos in chickpea. *Biology Plant*, 56(4) : 613-619.
- Montgomery M.W. (1983). Cystein as an inhibitor of browning in pear juice concentrate. *Journal of Food Science*, 48(3) : 951-952.
- Mordhorst A., Stirn S., Dresslhaus T. & Lorz H. (1994). Controlling factors and markers for embryogenic potential and regeneration capacity in barley (*Hordeum vulgare* L.) cell culture. *Current Issues in Plant Molecular and Cellular Biology*. Proceeding of the 8<sup>th</sup> International Congress on plant tissue and cell culture. Florence, Italy 12-17 June 1994. 383-387.
- Morrelo J.R., Romeo M.P., Ramo T. & Motilva M.J. (2005). Évaluation of L-phenylalanine ammonia-lyase activity and phenolic profile in olive drupe (*Olea europaea* L.) from fruit setting period to harvesting time. *Plant Science*, 168 : 65-72.
- Moussa A.A., Cretenet M., Nibouche S. & Gaborel C. (2003). Impact d'une attaque précoce de chenilles de la capsule sur le rendement en coton graine en fonction de la pluviosité au Nord Cameroun. *Coton Fibres Tropical*, 2 : 145-167.
- Munro J. M. (1987). Cotton. *Tropical Agriculture Serie*, 2 : 170-172.

- Munro J. M. (1994). The cotton crop in insect pests of cotton. *In*: Matthews G.A. and Tunstall J.P. edition CAB. *International Wallingford*, 3-26.
- Murashige T. & Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco virus cultures. *Physiology plant*, 15 : 473-497.
- Murphy D.J. (1993). Plant lipids. Their metabolism, function and utilization *Plant Biochemistry and Molecular Biology*, 5 : 113-128.
- Murphy H.N., Hahn E.J. & Paek K.Y. (2008). Recurrent somatic embryogenesis and plant regeneration in *Coriandrum sativum* L. *Scientific Horticulture*, 118 : 168-171.
- Mzouri K. & Amssa M. (2002). Amélioration de l'embryogenèse somatique à partir d'embryons immatures chez le Blé tendre (*Triticum aestivum* L.). II : Effet des régulateurs de croissance sur la callogenèse. *Acta Botanica*, 149(4) : 357-368.
- N'Cho X. (2008). Callogenèse chez le cotonnier (*Gossypium hirsutum* L.): effets cultivar, nature et teneur en source de carbone. DEA physiologie végétale, UFR biosciences, Université de Cocody (Abidjan, Côte d'Ivoire), 36p.
- N'goran A.R. (2016). Stimulation des défenses naturelles du cotonnier [*Gossypium hirsutum* L. (Malvaceae)] par des éliciteurs oligosaccharidiques extraits des suspensions de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, intérêt phytopathologique des composés phénoliques. Thèse de Doctorat, UFR des Biosciences, Université Félix Houphouët-Boigny (Abidjan, Côte d'Ivoire), 169 p.
- Najiba B., Dou E. & Abdelhadi A., 2008. Effet du sucre sur l'embryogenèse somatique de l'olivier (*Olea europaea* L.) cv. «Picholine marocaine». *Biotechnologie Agronomie Société et Environnement*, 12(3) : 245-250.
- Naz S. & Khatoon K. (2014). The effect of auxins on callus induction in *Achyranthes aspera*. *Pakistan Journal of Botany*, 46(6) : 2203-2207.
- Ndoumou D.O., Fotso S., Doungous O. & Mbouna D. (2004). Propagation d'*Irvingia gabonensis* par microbouturage *in vitro*. *Fruits*, 59(1) : 31-38.
- Nomura K. & Komamine A. (1995). Physiological and biochemical aspects of somatic embryogenesis. *In*: Thorpe, T. A., (eds), *In Vitro Embryogenesis in Plants*. Kluwer, Dordrecht, 249–266.
- Nouatin G., Amouzouvi H.D.&Dedjan J. (2014). Climate change and farmer's perception of climatic evolution in Alibori departement in Benin. [Int.http://popups.ulg.ac.be/17804507/index.php?id=12904&format=print](http://popups.ulg.ac.be/17804507/index.php?id=12904&format=print). Consulté le 25/ 07/ 2017.

- Nozeron R. & Babcilhon L. (1972). Les cultures *in vitro* en tant que technique pour l'approche des problèmes posés par l'amélioration des plantes. *Annual Amélioration Plantes*, 22(2) : 167-185.
- Özgen M., Türet M., Özcan S. & Sancak C. (1996). Callus induction and plant regeneration from immature and mature embryos of winter durum wheat genotypes. *Plant Breed*, 115(6) : 455-458.
- Parry G. (1982). Le cotonnier et ses produits. Paris, France, Edition Maisonneuve et Larose, 502 p.
- Perraud A. (1971). Les sols de la Côte d'Ivoire. In : Le milieu naturel de la Côte d'Ivoire. Mémoire ORSTOM, 50, Paris (France) : 269-389.
- Pathi K.M. & Tuteja N. (2013). High-frequency regeneration via multiple shoot induction of an elite recalcitrant cotton (*Gossypium hirsutum* L. cv Narashima) by using embryo apex. *Plant Signaling & Behavior*, 8(1) : 94-99.
- Rabechault H, Buffard-Morel J. & Vacheron C. (1974). Recherches sur la culture *in vitro* des embryons de palmier à huile: effets de la pression osmotique sur la croissance et le développement et sur l'absorption des sucres. *Oléagineux*, 29(12) : 351-356.
- Rainville A. & Tremblay L. (2014). L'embryogenèse somatique, un outil novateur dans la filière de production de plants forestiers du Québec. *Ressources Naturelles*, 21(5) : 48-56.
- Raju C.S., Kathiravan K., Aslam A. & Shajahan A. (2013). An efficient regeneration system via somatic embryogenesis in mango ginger (*Curcuma amada* Roxb.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 112(3) : 387-393.
- Ramdan R., Handaji N., Beyahia H. & Ibriz M. (2014). Influence of growth regulators on callus induction from embryos of five citrus rootstocks. *Journal of Applied Biosciences*, 73 : 5959-5965.
- Rao K.V., Syrasanna P. & Reddy G.M. (1990). Biochemical change in embryogenic and non embryogenic calli of *Zea mays* L. *Plant Sciences*, 66 : 127-130.
- Rathore M.S., Paliwal N., Anand K.V. & Agarwal P.K. (2015). Somatic embryogenesis and *in vitro* plantlet regeneration in *Salicornia brachiata* Roxb. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 120(1) : 355-360.
- Regnier T. (1994). Composés phénoliques du blé dur (*Triticum turgidum* L. var durum); Variation au cours du développement et de la maturation du grain relation avec l'apparition de la moucheture. Thèse de Doctorat des sciences et technique de la production végétale, Université. Montpellier II (Montpellier, France), 177 p.

- Ren J.P, Wang X.G. & Yin J. (2010). Dicamba and sugar effects on callus induction and plant regeneration from mature embryo culture of wheat. *Agricultural Sciences in Chine*, 9: 31-37.
- Rhimi A., Ben Fadhel N. & Boussaid M. (2006). Plant regeneration via somatic embryogenesis from in vitro tissue culture in two *Tunisian Cucumis* melo cultivars Maazoun and Beji. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 84 : 239-243
- Richter G. (1993). Les glucides in Métabolisme des végétaux. Physiologie et brochure. Ed Presses Polytechniques et Universitaires. Romandes chap. IV, 189-220.
- Rinaldo D., Mbéguié-A-Mbéguié D. & Fils-Lycaon B. (2010). Advances on polyphenols and their metabolism in sub-tropical and tropical fruits. *Trends Food Science Technology*, 21 : 599-606.
- Robert S. (1991). Contribution a l'étude de l'autooxydation et du processus de brunissement de la moutarde de Dijon. Thèse de Doctorat des Biotechnologies et Industries Alimentaires, Institut National Polytechnique de Lorraine (Lorraine, France), 312 p.
- Robinson T.P., Thornton P.K., Franceschini G., Kruska R.L., Chiozza F., Notenbaert A., Cecchi G., Herrero M., Epprecht M., Fritz S., You L., Conchedda G. & See L. (2011). Global livestock production systems. Rome, FAO, and Nairobi, International Livestock Research Institute (ILRI). 152 p.
- Rodriguez-Delgado M.A., Malovana S., Perez J.P., Borges T. & Garcia-Montelongo F.J. (2001). Separation of phenolic compounds by high-performance liquid chromatography with absorbance and fluorimetric detection. *Journal of Chromatography*, 912 : 249-257.
- Rout G., Debata B. & Das P. (1991). Somatic embryogenesis in callus cultures of *Rosa hybrida* L. cv. 'Landora'. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 27 (1) : 65-69.
- Saadi A. & Hamdani F. (2007). Régénération *in vitro* du *Scorpiurus muricatus* ssp. *subvillosus* via la caulogénès. *Biotechnologie Agronomie Société et Environnement*, 11(3) : 185-191.
- Saeed R., Muhammad U., Fatima B., Tariq M.K. & Iqar A.K. (2004). *In Vitro* Regeneration and Multiple Shoot Induction in Upland Cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *International Journal of Agriculture & Biology*, 06(4) : 704-707.
- Sakhanokho H.F., Zipf A., Rajasekaran K., Saha S. & Sharma G.C. (2001). Induction of highly embryogenic calli and plant regeneration in Upland (*Gossypium hirsutum* L.) and Pima (*Gossypium barbadense* L.). *Cotton Crop Science*, 41 : 1235-1240.

- Sané D. (1998). Étude des facteurs physiologiques et cytogénétiques de l'embryogenèse somatique chez *Acacia nilotica* (L.) (Willd. Ex) del. ssp. *Tomentosa* Brenan, *Acacia nilotica* (L.) [Willd. ex] del. ssp. *Adstringens* Brenan et *Acacia tortilis* (Forsk.) Hayne ssp. *raddiana* (Savi) Brenan. Thèse de Doctorat de biologie végétale, Université Cheikh Anta Diop-Dakar (Dakar, Sénégal), 201 p.
- Santimone M. (1973). Mécanisme des réactions d'oxydation peroxydasique. Thèse d'état, Université d'Aix-Marseille, Marseille (France), 380.
- Savita N., Virk G.S. & Nagpal A. (2010). Effect of explant type and different plant growth regulators on callus induction and plantlet regeneration in *Citrus jambhiri*. *Journal of Science Technology*, 5 : 97-106.
- Sayegh M. 2009. La résistance du cotonnier *Gossypium hirsutum* à la bactériose causée par *Xanthomonas campestris* pathovar *malvacearum*. Rôle du gène GhLOX1 dans la réaction hypersensible. Thèse de doctorat. Institut National Polytechnique de Lorraine-nancy, France. 155 p.
- Schenck R.U. & Hildebrandt A.C. (1972). Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Canadian Journal Botany*, 50 : 199-204.
- Sekloka E., Lançon J., Zinsou V.A. & Thomas G. (2016). Influence des conditions de culture sur la production de capsules chez le cotonnier (*Gossypium hirsutum* L.) en conditions de culture pluviale au Bénin. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 20(2) : 1-10.
- Shetty K. & Mc Kersie B. (1993). Proline, thioproline and potassium mediated stimulation of somatic embryogenesis in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Science*, 88 : 185-193.
- Singh B. (2000). Biochemistry of phenolic compounds. (ed). Academic press. London-New York.
- SODEXAM (2016). Données météorologiques de 1987-2015 d'Abidjan. Société d'exploitation et de développement Aéroportuaire, aéronautique et Météorologiques : direction de la Météorologie Nationale, Port-Bouët-Abidjan Côte d'Ivoire).
- Soneji J.R., Rao P.S., Mhatre M. (2002). Somaclonal variation in micropropagated dormant axillary buds of pineapple (*Ananas comosus* L., Merr.). *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 77 : 28-32.

- SOUPI N.M.S. (2013). Implication des arabinogalactanes protéines dans le développement des embryons chez *Theobroma cacao* L. Thèse de doctorat, Faculté des Sciences et Techniques, Université de Yaoundé I (Yaoundé, Cameroun), 188 p.
- Summantran V.M. (2011). Cellular Chemosensitivity Assays: An overview, in *CREE I. A ed*, Cancer Cell Culture: Methods and protocol, Methods. *Moleculair Biology*, 731 : 219-236.
- Swankar P., Bohra S. & Chandra N. (1986). Biochemical changes during growth and differentiation of the callus of *Solanum surattense*. *Journal of Plant Physiology*, 76 : 75-81.
- Tan X.L. & Qian Y.G. (1988). Effect of explants sources and cultural conditions on plant regeneration in *Gossypium gossypoides* (Ulbrich) Standley. *Acta Genetica Sinica*, 15(2) : 473-497.
- Taurus T.E., attree S.M., fowke L.C & Dunstan D.I. (1990). Somatic embryogenesis from immature and mature zygotic embryos and embryo regeneration from protoplasts in black spruce *Picea-mariana* mill. *Plant science*, 67(1) : 115-124.
- Thiruwengadam M., Mohamed S., Yang C. & Jayabalan N. (2006). Development of an embryogenic suspension culture of bitter melon (*Momordica charantia* L). *Scientia Horticulturae*, 109 : 123-129.
- Tidjani M.A. & Akponikpè P.B.I. (2012). Évaluation des stratégies paysannes d'adaptation aux changements climatiques : cas de la production du maïs au nord Bénin. *African Crop Science Journal*, 20(2) : 425-441.
- Trolinder N.L. & Goodin J.R. (1988). Somatic embryogenesis in cotton (*Gossypium*). II. Requirement for embryo development and plant regeneration. *Plant Cell, Tissue and Organe Culture*, 12 : 43-53.
- Urquiaga I. & Leighton F. (2000). Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. *Journal of Biotechnology Research*, 33(2) : 55-64.
- Vaissayre M., (1994). Dix années d'expérimentation pour la protection du cotonnier en Côte D'Ivoire (1981-1990). Document CIRAD /CA, 3(93) : 1-57.
- Verdu C. (2013). Cartographie génétique des composés phénoliques de la pomme. Thèse de Doctorat en Biologie Cellulaire et Moléculaire Végétale, Université d'Angers (Angers-Nantes, France), 213 p.

- Vianney R.B. (2017). L'histoire du coton, Sacs en fibres coton au Pérou : [https://es.wikipedia.org/wiki/Civilizaci%C3%B3n\\_caral#/media/File:Peru\\_Caral22.jpg](https://es.wikipedia.org/wiki/Civilizaci%C3%B3n_caral#/media/File:Peru_Caral22.jpg). Consulté le 16/04/2018.
- Wajahatullah K., Balakrishnan P. & Smith D.L. (2003). Chitosan and chitin oligomers increase phenylalanine ammonia-lyase and tyrosine ammonia-lyase activities in soybean leaves. *Journal of Plant Physiology*, 160 : 859-863.
- Walker J.R. L. & Reddish. C.E.S. (1964). Note on the use of cysteine to prevent browning in apple products. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 15 : 902-904.
- Wang Y., Wang X., Ma Z., Zhang G. & Han G. (2006). Somatic embryogenesis and plant regeneration from two recalcitrant genotypes of *Gossypium hirsutum* L. *Agricultural Sciences in china*, 5(5) : 323-329.
- Weber N. & Taylor D. (1990). In International Congress on plant tissue and cell cultures proceeding Amsterdam. *Netherlands*, 24-29 : 324-330.
- Wendel J.F. & Cronn R.C. (2003). Polyploidy and the evolutionary history of cotton. *Adventis Agronomie*, 78 : 139-186.
- White P.R. (1939). Potentiality unlimited growth of excised plant callus in an artificial medium. *American Journal of Botany*, 26 : 59-64.
- Yanhui L., Kongming W., Yuying J., Bing X., Ping L., Hongqiang F., Kris A., Wyckhuys G. & Yuyuan G. (2013). Mirid Bug Outbreaks in Multiple Crops Correlated with Wide-Scale Adoption of Bt Cotton in China. *Science*, 328 : 1151-1154.
- Yapo E., Tanoh K., Mongomaké K., Kouadio J., Kouamé P. & Merillon J. (2011). La régénération de l'ananas (*Ananas comosus* L.) par embryogenèse somatique végétale. *Journal of Biochemistry Plant Biotechnology*, 20(2) : 196-204.
- Yapo S.E.S. (2013). Propagation et régénération *in vitro* de l'ananas (*ananas comosus* var. *comosus* (l. merrill) coppens & leal) cultivé en côte d'ivoire et étude physicochimique des fruits issus des vitrocultures. Thèse de doctorat, UFR des Sciences et Technologies des Aliments, Université Nangui Abrogoua (Abidjan, Côte d'Ivoire), 151 p.
- Yemet A., Tarassenko L. & Blume Y. (2002). Efficient callus formation and plant regeneration of goosegrass [*Eleusine indica* (L.) Gaertn.]. *Plant Cell Reports*, 21 : 503-510.
- Zatimeh A., Shibli R.A.A., Tahtamouni R.W., Al-Qudah T.S., Mallouh S.A., Younes S.L. & Al-Hawamdeh F.M. (2017). Experimenting the possibility of callus development and growth from *Peganum harmala* L. leaf discs and assessment of the

- antibacterial activities of callus extract against *Salmonella* sp. and *Bacillus subtilis*. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 15(1) : 28-33.
- Zhang B., Feng R., Liu F. & Wang Q. (2001). High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration of an elite Chinese cotton variety. *Botanic Bulletin of Science Academie*, 42 : 9-16.
- Zhou Y., Dahler J.M., Underhill S.J.R. & Wills R.B.H. (2003). Enzymes associated with blackheart development in pineapple fruit. *Food Chemistry*, 80 : 565-572.
- Ziderman I.I., Gregorski K.S., Lopez S.V. & Friedman M. (1989). Thermal interaction of ascorbic acid and sodium ascorbate with protéins in relation to nonenzymatic browning and Maillard reactions of foods. *Journal of Agricultural and Biological Chimistry*, 37(6) : 1480-1486.
- Zouzou M., Kouakou T.H., Koné M., Amani N.G. & Kouadio Y.J. (2008). Effect of genotype, explants, growth regulators and sugars on callus induction in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Australian Journal of Crop Science*, 2(1) : 1-9.
- Zouzou M., Kouakou T.H., Koné M., Peeters M.C. & Swennen R. (1997). Callogenèse chez le cotonnier cultivé en Côte d'Ivoire. Effet position explant hypocotyle, variété, source de carbone et régime hormonal. *African Crop Science Conference Proceeding*, 3 : 1489-1494.
- Zryd J.P. (1992). Cultures de cellules, tissus et organes végétaux. Fondements théoriques et utilisations pratiques. Presses Polytechniques et Universitaires Romandes 308p.

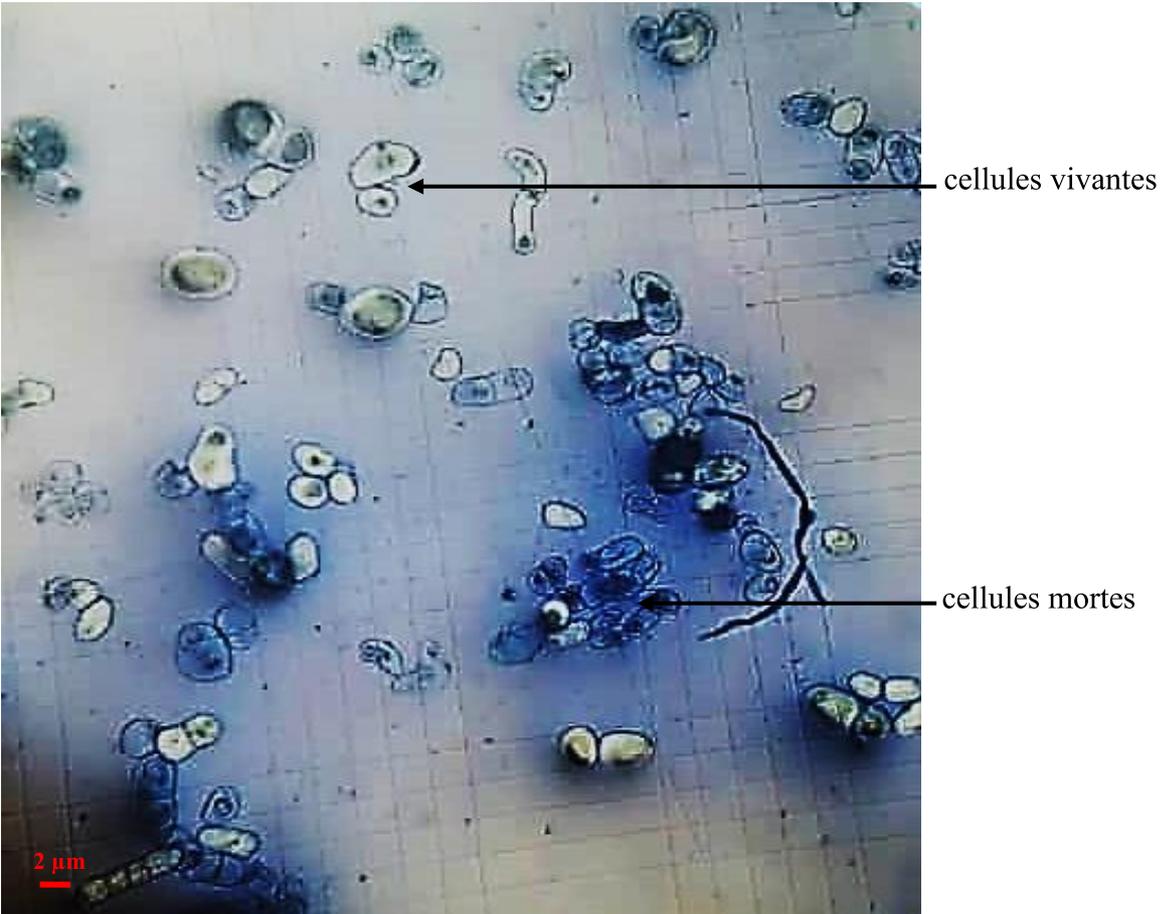
# **ANNEXES**

**Annexe 1. Coloration des cellules avec la solution de bleu de trypan : debut (Gx400)**

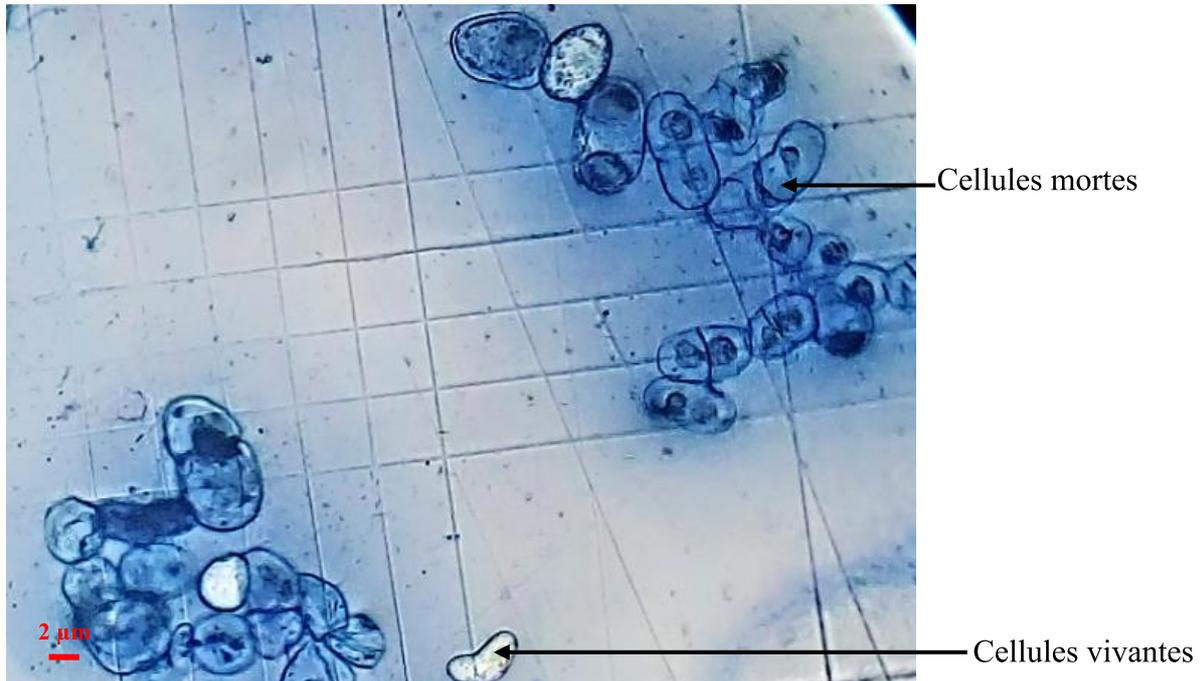


**CV : Cellules vivantes ; CM : Cellules mortes**

**Annexe 2. Coloration des cellules avec la solution de bleu de trypan : fin de la coloration après cinq minutes (Gx400)**



**Annexe 3. Coloration des cellules avec la solution de bleu de trypan : cellules mortes (Gx400)**

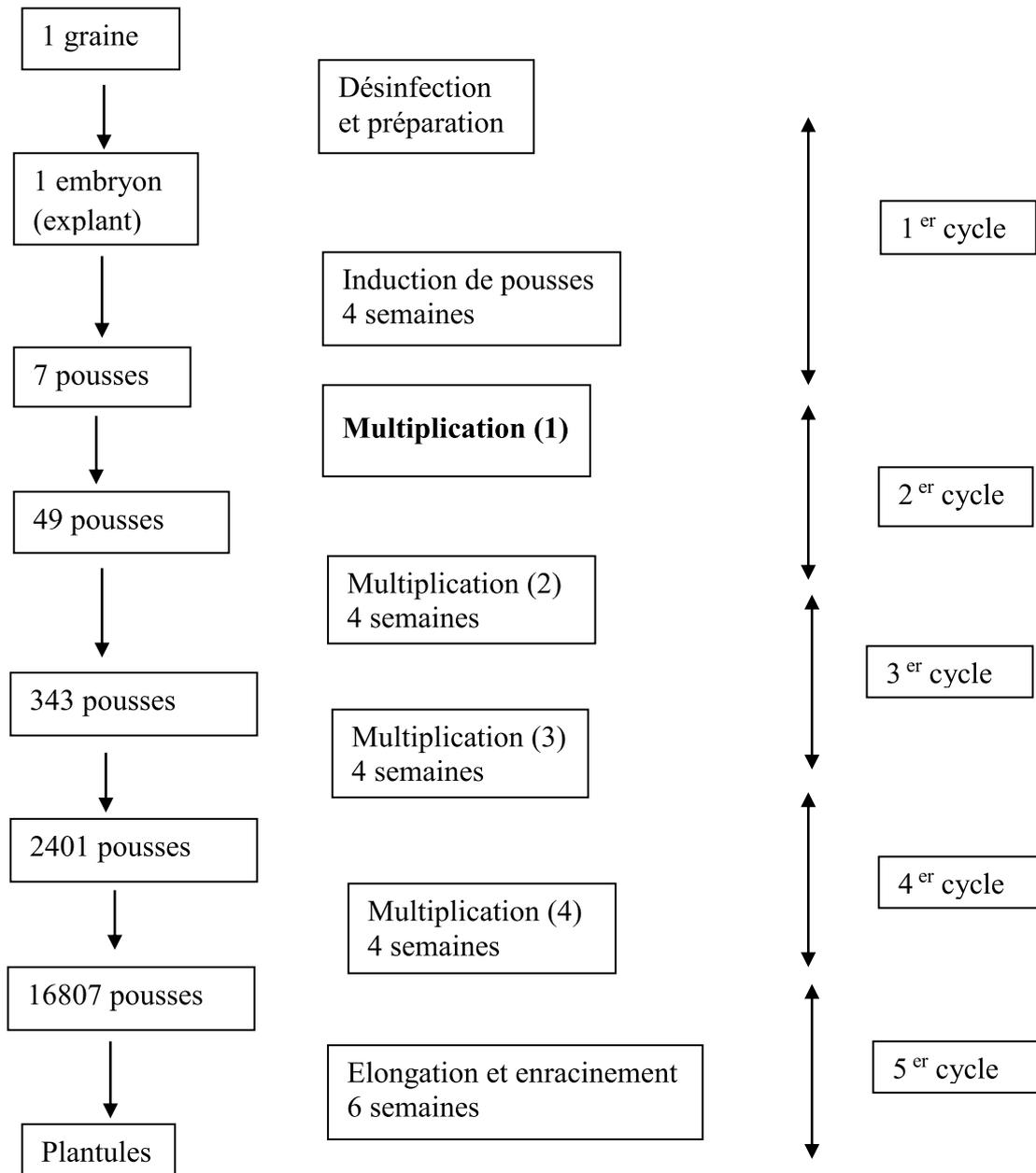


**Annexe 4. Activité des enzymes extraits des cals embryogènes et non embryogènes**

Composés enzymatiques	Activité enzymatique (nkat/min/g de cals frais)	
	Cals embryogènes	Cals non embryogènes
PPO	5,41 ± 0,01 a	4,29 ± 0,24 b
G Px	1,02 ± 0,00 b	1,41 ± 0,01 a
PAL	1,53 ± 0,04 a	1,07 ± 0,01 b
TAL	1,64 ± 0,02 a	1,08 ± 0,03 b
APx	1,97 ± 0,00 a	1,01 ± 0,00 b
Cat	2,40 ± 0,16 a	1,48 ± 0,05 b

Sur une même ligne, les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes (Test de Newman-Keuls au seuil 5 %), PPO : polyphénoloxydase, GPx : gaïcol peroxydase, PAL ; phénylalanine-ammonialyase, TAL : tyrosine-ammonialyse, APx : ascorbate peroxydase, Cat : catalase

## Annexe 5. Cycles de culture de micropropagation *in vitro* chez le cotonnier



# **PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES**

N'guessan A.S.R., Ayolie K., Yapo S.E.S., Konan Y.K.F., N'cho A.L., N'goran K.D. Kone D., Kouadio Y.J. & Kouakou T.H. (2019). Induction of High-Frequency Callus with an Elite Cotton (*Gossypium Hirsutum* L.) from Côte d'Ivoire. *Journal of Advances In Biotechnology*, 8 : 1104-1117.

N'guessan A.S.R., Ayolie K., Konan Y.K.F., Yapo S E S., Kouadio Y.J & Kouakou T.H. (2020). Optimization of somatic embryogenesis culture medium induction in cotton (*Gossypium hirsutum* L. cv. Y331B-R5) growth in côte d'ivoire. *Journal of Agriculture and Research*, 6(7) : 1-12.

DOI: <https://doi.org/10.24297/jbt.v8i0.8503>

## Induction of High-Frequency Callus with an Elite Cotton (*Gossypium Hirsutum* L.) from Côte d'Ivoire

Affoué Sylvie Rachelle N'GUESSAN<sup>1\*</sup>, Koutoua AYOLIE<sup>1</sup>, Sopie Edwige Salomé YAPO<sup>1</sup>, Yao Kouakou Francois KONAN<sup>1</sup>, Achi Laurent N'CHO<sup>2</sup>, Kouakou Désiré N'GORAN<sup>2</sup>, Dramane KONE<sup>2</sup>, Yatty Justin KOUADIO<sup>1</sup>, Tanoh Hilaire KOUAKOU<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Université Jean Lorougnon Guédé, UFR Agroforesterie, BP 150 Daloa, Côte d'Ivoire

<sup>2</sup> Université Nangui Abrogoua, UFR Sciences de la Nature, 02 BP 801 Abidjan 02, Côte d'Ivoire

nguessansylvie322@gmail.com

### ABSTRACT

In cotton, factors such as carbon sources, hormonal combination, and type of explant influence the responses to callus induction. In this study callus induction was optimized to get high-frequency callus in cotton. Different carbon sources were tested, and among them, glucose at 3% was found to be the best carbohydrate in callus induction. Culture medium supplemented with 2,4-D (0.1 mg.L<sup>-1</sup>) and KIN (0.5 mg.L<sup>-1</sup>) gave a high callogenesis response, unlike other hormonal combinations. With explants, hypocotyl (72.93%) appeared easier to induce callus than cotyledon (48.75%) following root (37.5%). So, carbon sources, hormone, and their concentration affect significantly callus induction. The highest frequency of callus induction was then observed when hypocotyl explants were cultured on medium supplemented with 0.1 mg.L<sup>-1</sup> of 2,4-D in combination with 0.5 mg.L<sup>-1</sup> of KIN and 3% glucose. The induced-callus obtained were friable and of high quality. The other types of combinations resulted in the formation of compact callus with sometimes roots emerging from it. The present study may provide an efficient protocol to improve the callogenesis responses by adjusting the carbohydrates, the hormonal regime, and the type of explant to be cultured for a high-frequency callus induction of the Y331B-R5 cotton cultivar.

**Keywords:** Cotton, Callus, Carbohydrate, Explant, Growth Regulator.

**Abbreviations:** 2,4-D: 2,4-dichlorophenoxyacetic; NAA: naphthalene acetic acid; IBA: indol-3-butyric acid; BAP: benzyl amino purine; KIN: kinetin; TDZ: thidiazuron; CM: callus medium; MSB: MS basal medium with vitamins B5.

### 1. INTRODUCTION

Cotton, a tropical plant, is among the most important crop in the world. The genus *Gossypium* includes some 50 species, and only four of them are currently grown for the fibers and seeds production [1]. Initially produced for the fibers in the textile industry, cotton is also grown for the seed oil, which is the main oil consumed in the Sahelian countries [2]. Overall, the United States, China, India, and Pakistan lead with more than 80% of world cotton production [3]. With an output of 412.646 tons in 2017-2018, Côte d'Ivoire is the fourth producer in south of Sahara, hereafter Mali, Burkina Faso, and Benin [4]. In Côte d'Ivoire, cotton is the fourth export product and contributes to 1.7% of Gross Domestic Product (GDP). The incomes generated by cotton crop reach more than 100 billion CFA francs per year and supports about 3.5 million people [5, 6]. However, Ivoirian cotton production is subjected to several constraints resulting in lower yield. Causes are multiple, but, pest pressure is by far the most important as it sometimes resulted in 30% loss of production [7]. Pesticides and phytosanitary products advised as solution to parasitic pressure have polluted environment and plant material. So, other more environmentally conscious methods have been introduced to improve performance. Among these, *in vitro* culture through its various techniques like somatic embryogenesis permit not only to produce plant material healthy and performing to improve production [8,9], but it is also species

improvement method. Indeed, somatic embryos can develop resistance to any diseases [10]. In addition, callogenesis is an important step for protoplast fusion [11, 12].

However, the success of somatic embryogenesis requires many control of factors influencing somatic embryos induction. Thus, the medium components and explant type are substantial factors who influence indirect embryogenesis [13]. This study contributes to the improvement of cotton regeneration techniques and highlights the influence of the composition of culture medium and explant type on cotton callogenesis.

## 2. MATERIAL AND METHODS

### 2.1. Seeds material

Seeds of cotton cv. Y331B-R5 was obtained from Ivorian Textile Development Company (Korhogo, Côte d'Ivoire, West Africa). The seeds surrounded by fibers were delinted by using commercial sulfuric acid (100 mL.Kg<sup>-1</sup> of seeds). Acid was added to the seeds contained in a glass jar and stirred with a stick until the fibers vanish for 1min. Subsequently the seeds were washed under running tap water for 15 min and finally washed by distilled water for 5 min. Following rinsing with tap water to completely dismiss the sulfuric acid delinted seeds were dried in the open air and constitute seed material used for the experiments.

### 2.2. Culture medium and conditions of culture

Throughout this investigation, the MS basal medium [14] containing sucrose and 2.2 g.L<sup>-1</sup> of phytagel adjusted to pH 5.8 was used. Unless otherwise stated, growth hormones were always added before autoclaving the medium which was done at 121°C under 1 bar pressure for 20 min. All cultures' media were incubated in a growth room under a 12 h photoperiod with cool white fluorescent light at 2000 lux of intensity, and the temperature was maintained at 28 ± 2 °C with 70% relative humidity.

### 2.3. Seeds surface disinfection and *in vitro* germination

The seeds were transferred under a laminar airflow and surface sterilized by dipping in 70% (v/v) ethanol for 1 min. The seeds were disinfected thoroughly in 2.4% (v/v) hypochlorite sodium-containing 3-4 drops of Tween-20 for 30 min with intermittent shaking. Finally, the seeds were rinsed with sterilized distilled water five times. The disinfected seeds were dipped and kept in sterile distilled water during 48 h for coats softening. Seeds without coats were inoculated on half-strength MS [14] basal medium supplemented with vitamins B5 [15] in test tubes for seedling formation. Seeds were incubated in dark condition for 2-days and then transferred under light/dark photoperiod for 5-days. The *in vitro* grown seedlings of cotton were used as the source of explants.

### 2.4. Callus induction and growth

Callus induction and growth were performed on MS basal medium with vitamins B5 (MSB) supplemented with 2,4 dichlorophenoxyacetic (2,4-D), naphthalene acetic acid (NAA), indol-3-butyric acid (IBA), benzylaminopurine (BAP), kinetin (KIN) and thidiazuron (TDZ), sugars such as glucose, fructose, maltose and sucrose. Cotyledon, hypocotyl, and root segments from *in vitro* grown seedlings were used as explants. The choice of growth regulators, sugars and explants for different experiments depends on the objective to be achieved. Eight culture pots each containing four explants were used by treatment. The experiment was designed in a complete randomized device with triplicate.

#### 2.4.1. Effect of sugar type

To test the effect of sugar types on callus induction, different types of carbon sources (sugars), including glucose, fructose, maltose and sucrose at 30 g.L<sup>-1</sup> were supplemented to callus medium (CM) constituted of MSB medium supplemented *with* 0.1 mg.L<sup>-1</sup> 2,4-D and 0.5 mg.L<sup>-1</sup> KIN [16-18]. After determining the best sugar

type, the best concentration of sugar was examined at concentration of 20 to 50 g.L<sup>-1</sup>. Cotyledons from 7-day-old-grown sterile seedlings were used as explants. Cotyledon measuring about 5x5 mm was cut with a sterile scalpel in a laminar flow cabinet and were inoculated on the CM medium for 4-weeks. The best sugar and its best concentration will be retained for further experiments.

#### 2.4.2. Effect of growth regulators

Various concentrations of six hormones solutions were prepared and added to CM, medium containing the best sugar at its best concentration. Three auxins such as 2,4-D, NAA, IBA and three cytokinins such as BAP, KIN, and TDZ were used at 0.1, 0.5, 1.0 and 1.5 mg.L<sup>-1</sup>. Cotyledon pieces (5x5 mm) were used as explants. In total, 12 hormone combinations were carried out with cytokinins. The hormone regime which promoting the best callogenesis was retained for the next experiment.

#### 2.4.3. Effect of explants types

Cotyledon pieces (5x5 mm), hypocotyl sections (5 mm length), and root segments (5 mm length) of 7-day-old in vitro plantlets were used in this study to evaluate the effect of explant type on callus induction. Explants were cut with a sterile scalpel under a laminar flow cabinet and were placed on MS medium containing best sugar with its best concentration and best hormone regime for 4-weeks.

#### 2.5. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the STATISTICA 7.1 software. Data were subjected to analysis of variance (ANOVA) using STATISTICA 7.1 software at 5%. For parametric values, the Newman-Keuls test was used to means comparison, while, for nonparametric values, the Kruskal-Wallis test was used.

### 3. RESULTS

#### 3.1. Effect of carbon source on callus induction

The results of the carbon source effect were recorded in Table 1. These results showed that there is a significant effect between sugar type on callus induction. In fact, the bursting time was significantly influenced by the sugar type. Thus, the fastest bursting time (7 days) was noticed with glucose followed by fructose and maltose (15 days). While sucrose, gave the longest bursting time (20 days). These results also revealed that glucose produced the highest rate of callus (64.05%) in front of fructose (50.13%) while sucrose induced the lowest rate of callogenesis (27.32%). Likewise, there are significantly different between the weights of fresh and dry material.

**Table 1. Influence of carbon source on cotton callus induction**

Carbone source	BT (Day)	CI (%)	FW (mg ± s)	DW (mg ± s)	PR (%)	Color	Texture
Glucose	10	64.05 ± 4.25 a	17.25 ± 4.90 a	2.87 ± 0.76 a	95.31 ± 8.13 a	Green	Fr
Sucrose	7	27.32 ± 4.86 d	3.68 ± 1.08 b	0.05 ± 0.01 c	25.12 ± 5.04 c	Yell	Fr
Fructose	5	50.13 ± 5.05 b	10.11 ± 3.05 ab	1.76 ± 0.38 b	38.26 ± 7.29 b	White	Fr
Maltose	5	41.16 ± 4.61 c	4.59 ± 1.33 b	0.46 ± 0.15 bc	30.70 ± 7.45 b	Brown	Fr

In a column, means followed by the same letter are not significantly different at 5%; BT: Bursting time; D: Day; IR: Induction rate; FW: Fresh weight; DW: Dry weight; PR: Proliferation rate; Gr: Green; Yell: Yellow; Br: Brown; Fr: Friable.

The highest weights of fresh and dry material were obtained on glucose supplemented medium (17.25 and 2.87 mg, respectively). Sucrose induced the lowest fresh weight (3.68 mg) and dry weight (0.05 mg). The proliferation rate estimation showed that sugar type significantly influenced callus proliferation (95.31, 38.26, 30.70 and 25.12%) for the glucose, fructose, maltose, and sucrose respectively. All the sugar types induced friable callus. However, the most friable callus was obtained with glucose and this callus was green (Figure 1).



**Figure 1. Callus derived from cotyledon explants of cotton in MS medium supplemented with carbohydrate A: glucose; B: sucrose; C: fructose; D: maltose**

### 3.2. Effect of glucose concentration on cotton callus proliferation

The results of glucose concentration of callus induction are presented in Table 2 and shown that glucose levels have significantly affected ( $p < 0.001$ ) callus proliferation. Indeed, the bursting time decreases with the increase of glucose concentration of culture medium. The results also showed that the induction rate, the fresh and dry weights increased when the glucose concentration increased in the culture medium. However, glucose at 5% induced the highest induction rate (75.52%) and the highest fresh and dry weights (18.95 and 2.29 mg respectively). Low concentrations of glucose (2 and 3%) produced a friable, white and green callus. While high glucose levels have induced a little friable callus and present a slight browning (Figure 2).

**Table 2. Impact of glucose concentration cotton callus induction**

Glu (%)	BT (D)	IR (%)	FW (mg ± s)	DW (mg ± s)	PR (%)	Color	Texture
2	10	47.5 ± 2.5 c	3.95 ± 1.08 d	0.65 ± 0.21 c	32.89 ± 7.75 c	white	friable
3	7	62.07 ± 2.2 b	15.22 ± 4.39c	1.39 ± 0.66 b	51.67 ± 9.04 ab	green	friable
4	5	66.17 ± 2.3 b	17.11 ± 4.3ab	1.42 ± 0.42 b	63.01 ± 9.32 ab	brown	lit fr
5	5	75.25 ± 0.1 a	18.95 ± 5.47 a	2.29 ± 0.69 a	77.37 ± 9.11a	brown	lit fr

In the column, means with the same letters are not significantly different at 5%; Glu: Glucose BT: Bursting time; D: Day; IR: Induction rate; FW: Fresh weight; DW: Dry weight; PR: Proliferation rate; Lit fr: Little friable.



**Figure 2. Callus appearance induced with different glucose concentrations of cotton cotyledon A: 2% glucose; B: 3% glucose; C: 4% glucose; D: 5% glucose.**

### 3.3. Effect of auxins and their concentration on callogenesis

In this study, three auxins at different concentrations were tested on cotton callogenesis. The results showed a significant difference between auxins and their concentrations on callogenesis. Indeed, only the low concentrations of 2,4-D (0.1 and 0.5 mg.L<sup>-1</sup>) and high level of IBA (1.5 mg.L<sup>-1</sup>) induced callus. This study also indicated that the bursting time was not influenced by the auxin type (8 days). These results revealed that 2,4-D at 0.1 and 0.5 mg.L<sup>-1</sup> produced the highest induction rates (70 and 40.25%) against 19.41% for IBA at 1.5 mg.L<sup>-1</sup>. Statistical analysis also showed that fresh and dry weight was significantly influenced by auxins type. The proliferation rate was significantly influenced by auxin type. All callus obtained during this study were white, friable for 2,4-D, and compact for IBA (Table 3).

### 3.4. Effect of cytokinin in combination with 2,4-D on callogenesis

To assess the effect of cytokinin in combination with 2,4-D, three cytokinins: BAP; KIN and TDZ at four levels (0.1; 0.5; 1.0 and 1.5 mg.L<sup>-1</sup>) were combined with 0.5 mg.L<sup>-1</sup> of 2,4-D. The results are recorded in Table 4. These results showed that callus induction was significantly affected by the cytokinin in the presence of 2,4-D. In fact, all hormonal components induced callus. However, the combination 2,4-D (0,1 mg.L<sup>-1</sup>) with KIN (0,5 mg.L<sup>-1</sup>) resulted in the highest induction rate (75.52%). In addition, the callus obtained with this combination is greenish coloring and very friable favorable to somatic embryos production. MS medium containing 0.1 mg.L<sup>-1</sup> 2,4-D and several concentration of TDZ induced callus with an induction rate varying from 29.73 to 45% according to the concentration. However, these callus are pasty texture unfavorable to produce somatic embryos. The induction rate, fresh and dry weight and proliferation rate were increased with 0.1 mg.L<sup>-1</sup> 2,4-D + 0.5 mg.L<sup>-1</sup> KIN. 2,4-D associated with BAP promoted root formation, the callus is white and compact texture.

**Table 3. Influence of auxin on cotton callus induction**

Auxin (mg.L <sup>-1</sup> )	BT(D)	IR (%)	FW (mg ± s)	DW (mg ± s)	PR (%)	Color	Texture
<b>0.1</b>	8	70.00 ± 1.84a	2.80 ± 0.66a	0.66 ± 0.20a	21.27 ± 1.58b	white	friable
<b>0.5</b>	8	40.25 ± 0.96b	1.81 ± 0.59b	0.23 ± 0.08 bc	22.21 ± 1.42b	white	friable
<b>2,4D 1.0</b>	-	0 ± 0d	0 ± 0c	0 ± 0c	0 ± 0c	-	-
<b>1.5</b>	-	0 ± 0d	0 ± 0c	0 ± 0c	0 ± 0c	-	-

	<b>0.1</b>	-	0 ± 0d	0 ± 0c	0 ± 0c	0 ± 0c	-	-
	<b>0.5</b>	-	0 ± 0d	0 ± 0c	0 ± 0c	0 ± 0c	-	-
<b>NAA</b>	<b>1.0</b>	-	0 ± 0d	0 ± 0c	0 ± 0c	0 ± 0c	-	-
	<b>1.5</b>	-	0 ± 0d	0 ± 0c	0 ± 0c	0 ± 0c	-	-
	<b>0.1</b>	-	0 ± 0d	0 ± 0c	0 ± 0c	0 ± 0c	-	-
	<b>0.5</b>	-	0 ± 0d	0 ± 0c	0 ± 0c	0 ± 0c	-	-
<b>AIB</b>	<b>1.0</b>	-	0 ± 0d	0 ± 0c	0 ± 0c	0 ± 0c	-	-
	<b>1.5</b>	8	19.41 ± 1.20c	2.13 ± 0.65ab	0.32 ± 0.08b	70.2 ± 1.47a	white	compact

In column, means with the same letters are not significantly different at 5%; T: Bursting time; D: Day; IR: Induction rate; FW: Fresh weight; DW: Dry weight; PR: Proliferation rate.

**Table 4. Influence of cytokinin on cotton callus induction**

<b>Cytokinin (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>BT (D)</b>	<b>IR (%)</b>	<b>FW (mg ± s)</b>	<b>DW (mg ± s)</b>	<b>PR (%)</b>	<b>Color</b>	<b>Texture</b>	
<b>0.1</b>	-	0 ± 0c	0 ± 0b	0 ± 0b	0 ± 0c	-	-	
<b>BAP</b>	<b>0.5</b>	-	0 ± 0c	0 ± 0b	0 ± 0b	0 ± 0c	-	-
	<b>1.0</b>	-	0 ± 0c	0 ± 0b	0 ± 0b	0 ± 0c	-	-
	<b>1.5</b>	-	0 ± 0c	0 ± 0b	0 ± 0b	0 ± 0c	-	-
<b>0.1</b>	-	0 ± 0c	0 ± 0b	0 ± 0b	0 ± 0c	-	-	
<b>KIN</b>	<b>0.5</b>	21	23.75 ± 0.70b	0.42 ± 0.20b	0.06 ± 0.03b	13.93 ± 1.13b	white	lit fr
	<b>1.0</b>	-	0 ± 0c	0 ± 0b	0 ± 0b	0 ± 0c	-	-
	<b>1.5</b>	-	0 ± 0c	0 ± 0b	0 ± 0b	0 ± 0c	-	-
<b>0.1</b>	-	0 ± 0c	0 ± 0b	0 ± 0b	0 ± 0c	-	-	
<b>0.5</b>	-	0 ± 0c	0 ± 0b	0 ± 0b	0 ± 0c	-	-	
<b>TDZ</b>	<b>1.0</b>	17	67.75 ± 1.34a	6.51 ± 0.25a	1.53 ± 0.62a	78.07 ± 1.33a	yell-w	comp
	<b>1.5</b>	17	69.05 ± 1.3a	7.53 ± 0.59a	1.79 ± 0.56a	71.53 ± 1.70a	white	comp

In column, means with the same letters are not significantly different at 5%; BT: Bursting time; D: Day; IR: Induction rate; FW: Fresh weight; DW: Dry weight; PR: Proliferation rate; yell-w: Yellowish white; lit fr: little friable; comp: compact.

### 3.5. Effect of cytokinin in the presence of 2,4-D on callogenesis

To assess the effect of cytokinin in combination with 2,4-D, three cytokinin: BAP; KIN and TDZ at four levels (0.1; 0.5; 1 and 1.5 mg.L<sup>-1</sup>) are combined with 0.5 mg.L<sup>-1</sup> 2,4-D. The results are recorded in Table 5 and showed that callus induction was significantly affected by the cytokinin in the presence of 2,4-D.

**Table 5. impact of cytokinin supplemented with 0.1 mg/l 2,4-D cotton callus induction**

2,4-D (mg.L <sup>-1</sup> )	Cytokinin (mg.L <sup>-1</sup> )	B T (D)	IR (%)	FW (mg ± s)	DW (mg ± s)	PR (%)	RN	Color	Texture	
0.1	BAP	0.1	17	45.00 ± 8.66 b	0.23 ± 0.06 e	0.02 ± 0.00 e	0.25 ± 0.04 g	12.66 ± 0.51 a	white	comp
		0.5	17	35.00 ± 5.10 c	0.66 ± 0.25 cd	0.18 ± 0.08 c	11.29 ± 1.85 f	14.00 ± 0.72 a	white	comp
		1.0	17	14.47 ± 0.10 e	1.10 ± 0.50 c	0.23 ± 0.05 c	26.66 ± 1.70 d	11.00 ± 1.78 a	white	comp
		1.5	17	24.65 ± 4.17 d	1.58 ± 0.76 b	0.13 ± 0.06 b	19.85 ± 1.50 e	06.33 ± 0.45 b	white	comp
	Kin	0.1	10	41.66 ± 3.33 b	0.45 ± 0.16 e	0.45 ± 0.06 b	0.04 ± 0.01 g	00 ± 00	wh-gr	lit-fr
		0.5	7	75.52 ± 7.23 a	15.63 ± 4.61 a	1.79 ± 0.06 a	83.72 ± 2.25 a	00 ± 00	green	v-fr
		1.0	11	35.00 ± 5.10 c	0.98 ± 0.05 c	0.08 ± 0.01 e	32.21 ± 1.46 c	00 ± 00	wh-y	lit-fr
		1.5	10	40.00 ± 5.05 b	1.93 ± 0.42 b	0.36 ± 0.14 bc	34.15 ± 2.77 c	00 ± 00	yel-g	lit-fr
	TDZ	0.1	8	40.00 ± 5.15 b	0.38 ± 0.11 e	0.03 ± 0.01 e	0.03 ± 0.00 de	00 ± 00	brown	pasty
		0.5	8	45.00 ± 7.11 b	0.53 ± 0.08 d	0.11 ± 0.70 d	26.41 ± 1.70 d	00 ± 00	yello	pasty
		1.0	8					00 ± 00	w	pasty

1.5	8	29.73 ± 6.26 d	0.85 ± 0.05 c	0.07 ± 0.01 e	45.30 ± 2.20 b	00 ± 00	yello w	pasty
		35.00 ± 5.20 c	1.35 ± 0.32 b	0.50 ± 0.04 b	38.45 ± 1.32 b		yello w	

In the column, means with the same letters are not significantly different at 5%; BT: Bursting time; D: Day; IR: Induction rate; RN: Root number; FW: Fresh weight;

DW: Dry weight; PR: Proliferation rate; why: whitish-yellow; wh-g: whitish green; yel-g: yellowish green; comp: compact; lit-fr: little friable; v-fr: very friable.

In fact, all hormonal components induced callus, but the combination 2,4-D (0.1 mg.L<sup>-1</sup>) with KIN (0.5 mg.L<sup>-1</sup>) resulted in the highest induction rate (75.52%). In addition, the callus obtained with this combination is greenish coloring and very friable favorable to somatic embryos production. MS medium containing 0.1 mg.L<sup>-1</sup> of 2,4-D and several concentrations of TDZ induced callus with induction rate varied from 29.73 to 45% according to the concentration. However, these callus are pasty texture unfavorable to

produce embryos. The induction rate, fresh and dry weight and proliferation rate were increased with 0.1 mg.L<sup>-1</sup> of 2,4-D + 0.5 mg.L<sup>-1</sup> of KIN. 2,4-D associated with BAP promoted root formation yet, the callus is white and compact texture (Figure 3).



**Figure 3. Cytokinin effect in the presence of 2,4-D on cotyledon callus**

A: 0.1 mg L<sup>-1</sup> of 2,4-D + 0.1 mg L<sup>-1</sup> of BAP; B :0.1 mg L<sup>-1</sup> of 2,4-D + 0.5 mg L<sup>-1</sup> of BAP; C: 0.1 mg L<sup>-1</sup> of 2,4-D + 1 mg L<sup>-1</sup> of BAP; D: 0.1 mg L<sup>-1</sup> of ,4-D + 1.5 mg L<sup>-1</sup> of BAP; E: 0.1 mg L<sup>-1</sup> of 2,4-D + 0.1 mg L<sup>-1</sup> of KIN; F: 0.1 mg L<sup>-1</sup> of 2,4-D + 0.5 mg L<sup>-1</sup> of KIN; G: 0.1 mg L<sup>-1</sup> of ,4-D + 1 mg L<sup>-1</sup> of KIN; H: 0.1 mg L<sup>-1</sup> of 2,4-D + 1.5 mg L<sup>-1</sup> of KIN;

I: 0.1 mg L<sup>-1</sup> of 2,4-D + 0.1 mg L<sup>-1</sup> of TDZ; J: 0.1 mg L<sup>-1</sup> of 2,4-D + 0.5 mg L<sup>-1</sup> TDZ; K: 0.1 mg L<sup>-1</sup> of 2,4-D + 1 mg L<sup>-1</sup> of TDZ, L: 0.1 mg L<sup>-1</sup> of 2,4-D + 1.5 mg L<sup>-1</sup> of TDZ .

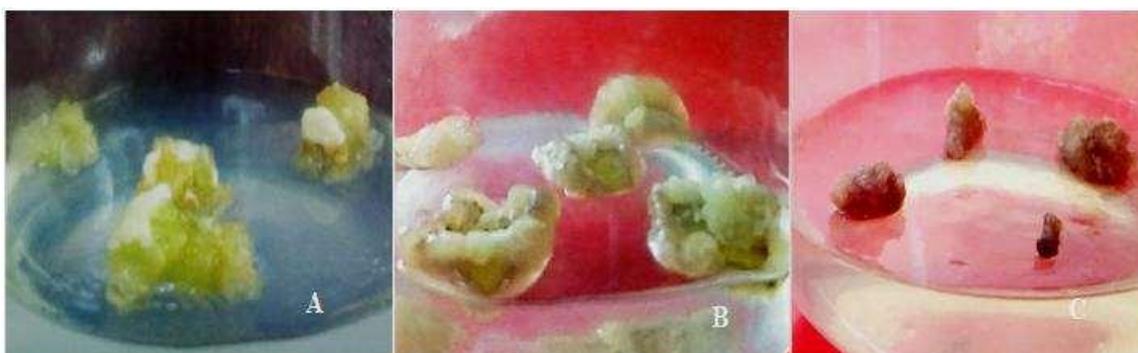
### 3.6. Effect of explant type on callogenesis

In this experiment, three explants (root, hypocotyl, and cotyledon) were cultured on MS medium to assess their effect on callogenesis. The results revealed that callogenesis was significantly influenced by explant type (Table 6). So the response of callogenesis varies according to the type of explant. Thus, the bursting time was 7 for hypocotyl and cotyledon and 15 days for root explant. The result also showed that among the three explants, the highest percentage of callus was obtained with hypocotyl (82.93%), followed by cotyledon (68.75%) and root (37.5%). Statistical analysis indicated that fresh, dry weights of matter and proliferation rates were also significantly influenced by explant type. The highest fresh and dry weight of matter was produced by hypocotyl (24.41 and 1.98 mg). All callus are friable, and their color is brown, green and white respectively, for root, hypocotyl, and cotyledon (Figure 4).

**Table 6. Effect of explant type on cotton callogenesis**

Explant	BT (D)	IR (%)	FW (mg ± s)	DW (mg ± s)	PR (%)	Color	Texture
root	15	37.5 ± 0.91c	10.72 ± 0.24b	0.35 ± 0.01c	21.73 ± 1.35c	brown	friable
hypocotyl	7	82.93 ± 1.74a	24.41 ± 0.67a	1.98 ± 0.08a	70.93 ± 1.14a	green	friable
cotyledon	9	68.75 ± 1.26b	12.8 ± 0.17b	0.59 ± 0.08b	55.14 ± 1.64b	white	friable

In column, means with the same letters are not significantly different at 5%; BT: Bursting time; IR: Induction rate; FW: Fresh weight; DW: Dry weight; PR: Proliferation rate.



**Figure 4. The response of cotton explant on callogenesis A: hypocotyl; B: cotyledon; C: root**

### 4. DISCUSSION

Photosynthesis is very sluggish *in vitro*, indeed, several authors showed that sugar type is capital in culture medium because they permit tissue differentiation [19, 20]. However, tissue response differed according to medium component. Like this, our study revealed that sugar type was significant effect on cotton callogenesis.

Similar results were obtained by Kouadio *et al.* [21] during their study on pineapple callogenesis. The results indicated that glucose produced the most friable and best callus than other sugars and presented the highest proportion of induction rate, fresh and dry weights of matter. Several authors reported that glucose produced high amounts of energy and it is the most assimilated form of sugar type [13; 22]. The results also showed that glucose is followed by fructose, maltose, and sucrose. Similarly, Zouzou *et al.* [18] showed that glucose promoted cotton cell proliferation and it was followed by fructose, sucrose. Maltose given the least satisfactory results. However in our study, maltose induced more satisfactory results than sucrose. This difference would be linked to the variety studied. In addition, studies showed that the acid medium (pH 5.8) trained sucrose hydrolysis in glucose and fructose. It induces a competition between these sugar types during their assimilation creating an inhibitory effect on callogenesis [23]. These results are in agreement with those of N'cho [5], which reported that sucrose practice an adverse effect on cotton callogenesis and this effect was linked to the low degradation of enzymes. The effect of sugar type depends of the plant material grow. Thus, unlike our study, Kouadio *et al.* [21] showed that sucrose was a better effect on pineapple callogenesis than other sugars. Other hand, Hakam *et al.* [24], indicated that maltose was more favorable to chickpea callus proliferation.

Glucose concentration also influenced callogenesis. Indeed, studies reported that high levels of glucose significantly affected cotton callogenesis. Statistical analysis showed that cell proliferation evolved in the same direction that glucose concentration. These results are in agreement with those of Buffard-Morel [25] and Rabéchault *et al.* [26]. Indeed, these authors have shown that the higher concentration of glucose increases osmotic pressure and promote the sugar and minerals absorption by explant.

The results also showed that at the low concentrations (2 and 3 %), the proliferation rate was 37.5 and 60.17 %, respectively. The callus obtained at these concentrations is friable, white, and green. These results are in conformity with different studies reported by many authors who showed that at 3 % glucose induct friable callus [27-30].

Cotton callogenesis as in several other species is under the influence of sugar type, explant type, and hormonal components [31]. The result of auxin test indicated that low concentrations (0.1 and 0.5 mg L<sup>-1</sup>) of 2,4-D stimulate callogenesis. While the highest concentrations have proved to be inhibitory. Similar results were also obtained by Naz and Khatoon [32] who showed during their studies on *Achyranthes Aspera* that the low concentrations of 2,4-D induce callogenesis. Also, Kheloufi [33] showed that 2,4-D is necessary in the medium culture for a better callogenesis responses in chickpea. The explant response on callogenesis varies on one hand according to species and from one party to another on the same species. Like this, ANA was showed unfavorable on cotton callus for all concentrations used. Similar results were obtained by Lachachi [34]. Indeed, this author showed that ANA did not produce callus and only 2,4-D induced tomato callogenesis. This study also showed that some cytokines are efficient to induce callogenesis. Thereby, KIN at 0.5 mg L<sup>-1</sup> and high concentrations of TDZ (1 and 1.5 mg L<sup>-1</sup>) allowed callogenesis. These results confirm those of Ramadan *et al.* [35], which showed that cytokines practice a positive effect on cell sensitivity stirring an active cell proliferation. Several authors showed that cytokinines can induce callus in other species, such as pistachios and date palm. Indeed, the experiment of Houndonougbo [36] indicated that KIN stimulates cell proliferation and buds formation. So in the culture medium, KIN activates cell metabolism by increase the nucleic acid synthesis, and inhibiting root formation [37]. The highest induction rates were obtained with TDZ. However, this callus is compact and not promote somatic embryogenesis. According to Trolinder and Goodin [27], somatic embryogenesis starts when the tissue produces friable callus. The plausible explanation of callus induction by cytokinins would be that endogenous auxin could exist in cytokinin composition, giving them the ability to induce callus. According to several authors, in cotton culture, 2,4-D is an important hormone for callus growth [32], [38-40]. Thereby, to understand the effect of 2,4-D on cotton callogenesis, three cytokinins at four levels 0.1, 0.5, 1.0 and 1.5 mg L<sup>-1</sup> were tested in combination with 0.1 mg L<sup>-1</sup> of 2,4-D. The results showed that this combination promote cell proliferation. So the induction rate increased significantly in the presence of 2,4-D and the callus are friable. These results are in accordance with those of Zouzou *et al.* [41], who showed that low concentrations of 2,4-D supplemented with high concentrations of KIN in culture medium, stimulate callogenesis. Indeed, BAP alone not induced callus but promoted callogenesis in the presence of 2,4-D. In addition, this association stimulated root formation [42]. TDZ

associated with 2,4-D induced pasty callus unfavorable to somatic embryogenesis. This pasty texture could be explained by the fact that there is an auxin activity with TDZ that allows this cytokinin to induce callus. Thus, the addition of 2,4-D seems to cause an excess of auxin, which would be responsible for the pasty texture of the callus. Abdullatif and Khalafallah [42], reported that another auxin such as NAA associated with KIN or BAP was used to induce callus. In this study, the three parts of plant (root, hypocotyl, and cotyledon) were cultured to evaluate their ability to induce callus. The result showed that the first callus formation was obtained with hypocotyl after seven days of culture. In addition, for all parameters studied, the highest induction rate was obtained by this explant [43; 44]. Similarly, several authors have reported that the induction and proliferation of callus in one species varies with explant type [45, 46]. Thus, the type of explant would have an important influence on callus induction. Indeed, the explants have a reactivity or differential sensibility on culture medium [47]. Moreover, some authors have even reported an influence of the position and type of explant on callogenesis [18, 29, 48]. This material can be considered as an essential element that determines the success of the callogenesis. The search for favorable conditions for best callus induction seems to be a challenge in *in vitro* culture. Indeed, the callus is a starting material for all different *in vitro* technique culture, including somatic embryogenesis [11].

## 5. CONCLUSION

The results obtained in this study based on medium and explants types effect on cotton callogenesis. They showed that the success of callogenesis depends on medium components and explants type. Indeed, our results showed that glucose at 3% allows obtaining the most voluminous and friable callus, favorable for somatic embryogenesis. In addition, 0.1 mg.L<sup>-1</sup> 2,4-D combined with 0.5 mg.L<sup>-1</sup> KIN promotes the callus induction and proliferation of cotton. Following to these results, cotton callus induction and cell proliferation were depended on sugar type, hormonal components, and explant type.

## 6. REFERENCES

1. Kouakou TH, Zouzou M, Kouadio YJ, Anno AP (2008). Embryogenèse somatique chez le cotonnier (*Gossypium hirsutum* L.): évolution des composés lipidiques au cours de la callogenèse et de la culture de suspensions cellulaires. *Afr Sci* 4(3): 147-159.
2. Sekloka E (2006). Amélioration de l'efficacité de la sélection pour le rendement en coton graine du cotonnier *Gossypium hirsutum* L. dans un contexte de nouveaux itinéraires techniques. Thèse de l'École Nationale Supérieure Agronomique de Rennes, France, 192p.
3. FAOSTAT (2016). Coton production par Pays Monde 2016. <http://www.fao.org/3/a-BO104f.pdf>. Accessed on 2018 May 5.
4. Anonymous (2018). Planetoscope-Statistique : Production mondiale de coton <https://www.planetoscope.com/agriculture/1178-production-mondiale-de-conton.htm>. Accessed On 2018 May 2.
5. N'Cho X (2006). Callogenèse chez le cotonnier (*Gossypium hirsutum* L.): effets cultivar, nature et teneur en source de carbone. Mémoire DEA physiologie végétale, UFR biosciences, Université de Cocody, Abidjan, Côte d'Ivoire, 36p.
6. Coulibaly A (2015). Communication de la Côte d'Ivoire à la 74ème plénière du comité exécutif de coton (CCIC). Accessed on 2017 February 02.
7. Miranda JE, Rodrigues SMM, de Almeida RP, da Silva CAD, Togola M (2013). Reconnaissance de ravageurs et ennemis naturels pour les pays C-4. *Empr Pesq Agrop* 25: 74-93.

8. Finer JJ, McMullen MD (1990). Transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) via particle bombardment. *Plant Cell Rep* 8: 586-589.
9. Wu J, Zhang X, Nie Y, Jin S, Liang S (2004). Factor affecting somatic embryogenesis and plant regeneration from a range of recalcitrant genotypes of Chinese cottons (*Gossypium hirsutum* L.). *In Vitro Cell Biol* 40: 371-382.
10. Yapo SES (2013). Propagation et régénération in vitro de l'ananas [*Ananas comosus* var. *comosus* L. (Merrill) Coppens & Leal] cultivé en côte d'Ivoire et étude physicochimique des fruits issus des vitrocultures. Thèse de l'Université Nangui Abrogoua, Abidjan, Côte d'Ivoire, 151 p.
11. Kawtar L, Najat H, Brhadda N, Najat A, Gmira N, Elmustapha E, Tarik A, Benyahia H (2015). Optimisation de l'induction de callogenèse à partir des embryons excisés de mandariniers (*Citrus* spp.). *J Appl Biosci* 89: 8300-8310.
12. Kouadio OKS (2018). Effet de la composition du milieu de culture sur la régénération in vitro de l'ananas [*Ananas comosus* (L.) var. *Cayenne lisse*] par embryogenèse somatique indirecte et impact du stress salin sur les paramètres morphophysologiques des vitroplants régénérés. Thèse de l'Université Nangui Abrogoua, Abidjan, Côte d'Ivoire, 206p.
13. Zouzou M, Kouakou TH, Koné M, Peeters MC, Swennen R (1997). Callogenèse chez le Cotonnier cultivé en Côte d'Ivoire: effets position explant hypocotyle, variété, source de carbone et régime hormonal. *Afr Crop Sci Conf Proc* 3: 1489-1494.
14. Murahige T, Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco virus cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497.
15. Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* 50: 151-158.
16. Kouadio JY, Koné M, Djè Y, d'Almeida MA, Zouzou M (2004). L'étiollement est un facteur d'induction de l'embryogenèse somatique au cours de la callogenèse chez deux variétés récalcitrantes de cotonnier (*Gossypium hirsutum* L.) cultivées en Côte d'Ivoire. *Biotechnol Agron Soc Env* 8(3): 155-162.
17. Kouakou TH, Koné D, Zouzou M, Kouadio YJ (2007). Esterase isoenzymes are linked to embryogenic structures induction in cotton cell suspension cultures. *Afr J Agr Res* 2(8): 394-399.
18. Zouzou M, Kouakou TH, Koné M, Amani NG, Kouadio YJ (2008). Effect of genotype, explants, growth regulators and sugars on callus induction in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Aust J Crop Sci* 2(1): 1-9.
19. Pierik RLM (1987). Commercial micropropagation in Western Europe and Israel. In Debergh P.C., Zimmerman R.H. *Micropropagation technology application*. Dordrecht, the Netherlands: Kluwer Academic Publishers, pp 115-165.
20. Swankar P, Bohra SP, Chandra N (1986). Biochemical changes during growth and differentiation of the callus of *Solanum surattense*. *J Plant Physiol* 76: 75-81.
21. Kouadio OKS, Yapo ESS, Silue O, Adou BYC, Kouakou TH (2018). Influence of Carbohydrates on Callus Proliferation during Somatic Embryogenesis in Pineapple [*Ananas Comosus* (L.) Merry. (Bromeliaceae) Var. *Cayenne Smooth Cultivar CI 16*]. *Eur Sci J* 14(15): 287-297.
22. Richter G (1993). Les glucides in *Métabolisme des végétaux*. Physiologie et brochure. Ed Presses Polytechniques et Universitaires. Romandes chap. IV, pp 189-220.

23. Kouakou TH (1996). Effets composition et régime hormonal sur la callogenèse du le cotonnier (*Gossypium hirsutum* L. cv. ISA 205 N). Mémoire DEA Physiologie Végétale, UFR Biosciences, Université de Cocody, Abidjan, Côte d'Ivoire, 32 p.
24. HakamN, Sripada UM, Gaboun F, Rabha A, Ibriz M, Iraqi D (2014). Effect of genotypes and culture media on embryogenic callus induction and plantlet regeneration from mature embryos of durum wheat. *Rom Agr Res* 31: 121-128.
25. Buffard-Morel J (1968). Recherches sur la culture in vitro des embryons de palmier à huile. v. effets du glucose, du lévulose, du maltose et du saccharose. *Oléagineux* 23(12): 707-711.
26. Rabechault H, Buffard-Morel J, Vacheron C (1974). Recherches sur la culture in vitro des embryons de palmier à huile: effets de la pression osmotique sur la croissance et le développement et sur l'absorption des sucres. *Oléagineux* 29(12): 351-356.
27. Trolinder NL, Goodin JR (1988). Somatic embryogenesis in cotton (*Gossypium*). II. The requirement for embryo development and plant regeneration. *Plant Cell Tiss Org Cult* 12: 43-53.
28. Kouakou TH (2003). Contribution à l'étude de l'embryogenèse somatique chez le cotonnier (*Gossypium hirsutum* L.) : Évolution de quelques paramètres biochimiques au cours de la callogenèse et de cultures de suspensions cellulaires. Thèse de 3<sup>e</sup> cycle, Université de Cocody, Abidjan Côte d'Ivoire, 144p.
29. Haouala F, Farhat N, Chabchoub L (2010). Effets du type et de la position de l'explant sur l'induction de cals chez le gerbera (*Gerbera jamesonii* Bolus). *Tropicultura* 28(1) : 57-60.
30. Fotso MS, Donfagsiteli TN, Ndoumou DO (2008). Comparaison des premières étapes de l'embryogenèse somatique chez *Baillonella toxisperma* et *Vitellaria paradoxa* (Sapotacées). *Biotechnol Agron Soc Env* 12(2): 131-138.
31. Ren JP, Wang XG, Yin J (2010). Dicamba and sugar effects on callus induction and plant regeneration from mature embryo culture of wheat. *Agr Sci Chin* 9: 31-37.
32. Naz S, Khatoon K. 2014. The effect of auxins on callus induction in *Achyranthes aspera*. *Pak J. Bot.* 46(6): 2203-2207.
33. Kheloufi A (2006). Induction à la callogenèse chez quelques variétés de pois chiche (*Cicer arietinum* L.). Mémoire de Magister, Université d'Oran-Es Senia, Algérie, 38p.
34. Lachachi S (2010). Organogenèse et embryogenèse somatique directe chez la tomate. Mémoire de Magister, Université d'Oran-ES SENIA, Algérie, 117 p.
35. RamdanR., Handaji N, Beyahia H, Ibriz M (2014). Influence of growth regulators on callus induction from embryos of five citrus rootstocks. *J Appl Biosci* 73: 5959-5965.
36. Houndonougbo A (1989). Influence des différentes concentrations d'acide indole-3-acétique, d'acide naphthalène-acétique, d'acide 2,4-Dichlorophenoxyacétique et de kinétine sur la callogenèse et l'organogenèse in vitro de fragment d'entre nœud de deux variétés de patate douce (*Ipomoea batatas* L.). *Agronomy* 9: 653-660.
37. Semiria L (2013). Contribution à l'amélioration de l'*Atriplex halimifolia* par la culture de tissus in vitro. Mémoire de Magister, Université d'Oran-Es Senia, Algérie, 64p.

38. Davidonis GH, Hamilton RH (1983). Plant regeneration from Callus tissue of *Gossypium hirsutum* L. *Plant Sci Lett* 32: 89-93.
39. Wang JY, Sun J, Hu J, Cui G (2004). Factors affecting the frequencies of callus induction and plantlet regeneration in maize immature embryo culture. *Acta Agr Sin* 30: 398-402.
40. Cao JL, Zhang XL, Jin SX, Yang XY, Zhu HG, Fu LL (2008). An efficient culture system for synchronization control of somatic embryogenesis in Cotton (*Gossypium hirsutum* L). *Acta Agr Sin* 34 (2): 224-231.
41. Zouzou M, Kouadio YJ, Koné M, Kouakou TH, Dénézon DO (2000). Callogenèse chez *Gossypium hirsutum* L.: effets cultivar, conditions de culture et type de matériel. *Bioterre* 1(1): 48-56.
42. Abdellatef E, Khalafallah, MM (2008). Influence of growth regulators on callus induction from hypocotyls of medium staple cotton (*Gossypium hirsutum* L). *Cultivar Barac B-67. J Soil Res Nat* 2(1): 17-22.
43. Kamal GB, Zahra B, Behrooz A (2011). The effects of hormonal components of nutrient medium, cultivar, and explant type on cotton (*Gossypium hirsutum* L.) callus formation in vitro. *J Appl Biosci* 47: 3256-3263.
44. Kouakou HT, Kouakou LK, Kouassi MK, Koffi EK, Koné, M (2014). Influence de la taille des vitroplants et du type d'explant sur la réponse à la callogenèse chez le cotonnier (*Gossypium hirsutum* L.) cultivé en Côte d'Ivoire. *Int J Biol Chem Sci* 8(2): 588-595.
45. Ishii Y, Takamura T, Goi M, Tanaka M (2004). Callus induction and somatic embryogenesis of *Phalaenopsis*. *Plant Cell Rep* 17(6): 446-450.
46. Bahoya JAL (2012). Potentiel callogène et embryogène de trois géotypes de *Theobroma cacao* L. Mémoire de Magister, Université d'Oran-Es Senia, Algérie, 63p.
47. Kouakou TH (2009). Embryogénèse somatique chez le cotonnier [*Gossypium hirsutum* L.): variation des composés phénoliques au cours de la callogenèse et de la culture des suspensions cellulaires. Thèse d'État de l'Université d'Abobo-Adjamé, Abidjan, Côte d'Ivoire, 137p.
48. Tan ND, Thi TAT., Thi DHN, Trinh DN, Thanh HN, Quoc TN, Hong VN (2007). Effect of genotype, explant size, position, and culture medium on shoot generation of *Gerbera jamesonii* by receptacle transverse thin cell layer culture. *Sci Hort* 111: 146-151.

# OPTIMIZATION OF SOMATIC EMBRYOGENESIS CULTURE MEDIUM INDUCTION IN COTTON (*Gossypium hirsutum* L. CV. Y331B-R5) GROWTH IN CÔTE D'IVOIRE

N'GUESSAN<sup>1</sup> Affoué Sylvie Rachelle, AYOLIE<sup>1</sup> Koutoua, KONAN<sup>1</sup> Yao Kouakou Francois

YAPO<sup>1</sup> Sodie Edwige Salomé, KOUADIO<sup>1</sup> Yatty Justin, KOUAKOU<sup>2</sup> Tanoh Hilaire

<sup>1</sup> Université Jean Lorougnon Guédé, UFR Agroforesterie, BP 150 Daloa, Côte d'Ivoire

<sup>2</sup> Université Nangui Abrogoua, UFR Sciences de la Nature, 02 BP 801 Abidjan 02, Côte d'Ivoire

nguessansylvie322@gmail.com

## Abstract

The development of an efficient protocol for somatic embryogenesis in cotton is an essential prerequisite for the adoption of genetic techniques transformation for varietal improvement. The present study aims to evaluate the responses to somatic embryogenesis of the Y331B-R5 cotton variety widely grown in Côte d'Ivoire. For this purpose, the hypocotyl of the vitroplants was used as an explant to initiate friable callus, which is used for the induction of somatic embryos. The effect of the medium compound on somatic embryogenesis was evaluated. For this purpose, four carbon sources (maltose; sucrose; fructose and glucose) at 30 g.L<sup>-1</sup> were tested. Then, the effect of different concentrations (20; 30; 40 and 50 g.L<sup>-1</sup>) of the best carbon source was evaluated. Then, four amino acids (glutamine; casein hydrolysate; glycine and asparagine) were tested. Finally, phytohormones were added to induce embryos. The results showed that glucose at 30 g.L<sup>-1</sup> induced the highest level of embryogenic cells (67.34 %). Amino acids tests showed that glutamine (0.5 mg.L<sup>-1</sup>) was more beneficial (47.31 %). Finally, hormones combination (0.1 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D + 0.5 mg L<sup>-1</sup> KIN) induced the highest rate (74.25 %). The MIE medium + 30 g.L<sup>-1</sup> glucose + 0.1 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D + 0.5 mg L<sup>-1</sup> KIN was the most effective for the induction of somatic embryogenesis in Y331B-R5.

**Key words** : cotton (*Gossypium hirsutum* L.), carbon source, amino acids, growth regulators, somatic embryogenesis.

## 1. Introduction

Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) occupies an important place in the world economy thanks to its fibre used as a first material in the textile industries (Bachelier, 2016). Four species of cotton are currently cultivated. However, *Gossypium hirsutum* is the most cultivated species and alone covers more than 95 % of world production (Kouakou, 2009). In West Africa, cotton represents a source of income for farmers and contributes to food security in the production areas (ICTSD, 2010).

However, cotton cultivation is appointment abiotic and biotic problems, leading in some cases to a drop in production. These production losses vary from year to year and can reach more than 30 % of production (Miranda *et al.*, 2013). Face at this situation, several solutions (genetic improvement by interspecific hybridizations) have been proposed but have failed due to certain genetic barriers (Haouala *et al.*, 2010). Indeed, in cotton, genotypic barriers strongly limit *in vitro* regeneration. Thus, most cotton varieties are recalcitrant to *in vitro* regeneration (Sakhanokho *et al.*, 2001). However, plant biotechnology through tissue culture is a valuable tool to round these barriers and opens avenues for improvement of this species. Thus, somatic embryos derived from tissue culture represent an ideal material for plant breeding

(Finer and Mc Mullen, 1990). These embryogenic structures lend themselves easily to genetic manipulation and allow the incorporation the interest traits such as resistance to certain diseases (Yapo, 2013). However, the success of somatic embryogenesis depends on several factors that, through their action, can inhibit or promote the induction of embryogenic cells. Thus, in this study, the effect of culture medium composition was evaluated.

This study is a contribution to the establishment of an efficient protocol for somatic embryogenesis and highlights the effect of certains components of the culture medium on the induction of embryogenic cells in cotton.

## 2. Material and methods

### 2.1. Plant material

The plant material consisted of cotton seeds (*Gossypium hirsutum* L. cv. Y331B-R5) supplied by the Compagnie Ivoirienne pour le Développement Textile (CIDT), (Korhogo, Côte D'Ivoire).

### 2.2 Methods

#### 2.2.1. *In vitro* seed disinfection and germination

Cotton seeds, however, were first delinted from the fibres in a glass jar using 30 mL of concentrated sulphuric acid (N'guessan *et al.*, 2019). The fibre-free seeds were rinsed thoroughly with tap water and then placed in a beaker in the presence of water. Submerged (viable) seeds were recovered and dried in the open air before disinfection. Cotton seed germination was carried out according to the modified Kouakou, (2003) method. Cotton seeds were disinfected under a laminar flow hood by soaking in 70 % alcohol for 1 minute, then in sodium hypochlorite with 2.4 % active chlorine for 30 minutes. After three rinses with sterile distilled water for five minutes, the seeds were soaked in 150 × 22 (L × Ø in mm) test tubes containing 30 mL of sterile distilled water at a rate of one seed per tube and placed in the dark for 48 hours. Then, using autoclaved tweezers, the seeds with pointed rootlets were removed from the seed coat under the fume hood and cultured on germination medium (Figure 1). This medium consists of ½ MS medium (Murashige and Skoog, 1962) supplemented with 30 g.L<sup>-1</sup> sucrose (N'guessan *et al.*, 2019).



**Figure 1 : *In vitro* germination of the cotton plant**

A: cotton seed with the radicle pointing after 48 hours in the dark; B: seed with the seed coat removed; C: seed on germination medium, D: 7-day old cotton plant.

### 2.2.2. Callus induction

After one week on the germination medium, hypocotyl explants (5 mm long) from the resulting vitroplants were used to induce callus on the base medium Murashige and Skoog (MS) (1962) supplemented with Gamborg (Gamborg *et al.*, 1968) (MSB5) vitamin B5 supplemented with 30 mg.L<sup>-1</sup> glucose; 0.1 mg.L<sup>-1</sup> 2,4-D and 0.5 mg.L<sup>-1</sup> KIN (N'guessan *et al.*, 2019). The pH of the medium was adjusted to 5.8 with 1N NaOH and/or HCl and solidified with 2.2 g.L<sup>-1</sup> phytigel. After three subcultures of four weeks each on the callogenesis medium, the resulting healthy, friable callus was used as an explant for somatic embryogenesis.

### 2.2.3. Embryogenic cells induction

#### 2.2.3.1. Medium preparation

The basic somatic embryo induction medium (EIM) is MSB5 free of ammonium nitrate (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>) and with a double concentration of potassium nitrate (KNO<sub>3</sub>) EIM: (MSB5 - NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> + 2 KNO<sub>3</sub>) (Trolinder and Goodin, 1988). All media were solidified with 2.2 g.L<sup>-1</sup> phytigel and the pH was adjusted to 5.8 with 1 N NaOH and/or HCl. The prepared media were boiled on a hot plate and dispensed into jars at 30 mL/jar. Sterilisation of the media was carried out in an autoclave for 20 min at 121 °C under a pressure of 1 bar.

#### 2.2.3.1.1. Influence of carbon source on embryogenic cells induction

The medium used for this study was the MIE to which four carbon sources, glucose, fructose, maltose, and sucrose (30 g.L<sup>-1</sup>) were added separately to evaluate their effect on embryo induction. No growth hormones were added to the culture medium. A control medium was prepared with the basal medium, without any carbon source. The carbon source that induced the greatest number of embryos was selected. This carbon source was then tested at different concentrations (20, 30, 40 and 50 g.L<sup>-1</sup>) on the same basal medium (EIM) as before.

### 2.2.3.1.2. Influence of hormonal regime on embryo induction

The effect of hormonal regimen was evaluated through several combinations of auxins and cytokinins added to the embryo induction medium (EIM). Depending on the combinations made, the different embryogenesis media are designated as follows:

ME1: EIM + carbon source + 2 mg.L<sup>-1</sup> ANA + 0.5 mg.L<sup>-1</sup> KIN  
ME2: EIM + carbon source + 2 mg.L<sup>-1</sup> ANA + 0.1 mg.L<sup>-1</sup> 2,4-D  
ME3: EIM + carbon source + 0.1 mg.L<sup>-1</sup> 2,4-D + 0.5 mg.L<sup>-1</sup> KIN  
MIE4: MIE + carbon source + 0.1 mg.L<sup>-1</sup> 2,4-D + 0.5 mg.L<sup>-1</sup> KIN + 0.1 mg.L<sup>-1</sup> Zeatin  
ME5: EIM + carbon source + 0.1 mg.L<sup>-1</sup> AIA + 0.1 mg.L<sup>-1</sup> 2,4-D  
A control test was carried out without any hormones.

### 2.2.3.1.3. Influence of amino acids on the induction of embryogenic cells

The effect of amino acids on the induction of embryogenic cells was tested on the same base medium as previously without hormone and with the addition of the best concentration of the carbon source (MIE2). The MIE2 medium was supplemented with glutamine, asparagine, casein hydrolysate, and glycine alone or in combination to induce embryos. The various amino acids were added to the culture medium as follows:

Aa1: MIE2 + 0.5 mg.L<sup>-1</sup> glutamine  
Aa2: MIE2 + 0.5 mg.L<sup>-1</sup> glutamine + 0.2 mg.L<sup>-1</sup> asparagine  
Aa3: MIE2 + 0.5 mg.L<sup>-1</sup> glutamine + 0.2 mg.L<sup>-1</sup> casein hydrolysate  
Aa4: MIE2 + 0.5 mg.L<sup>-1</sup> glutamine + 0.2 mg.L<sup>-1</sup> asparagine + 2 mg.L<sup>-1</sup> glycine  
Aa5: MIE2 + 0.5 mg.L<sup>-1</sup> glutamine + 0.2 mg.L<sup>-1</sup> casein hydrolysate + 2 mg.L<sup>-1</sup> glycine

### 2.2.3.2. Growing and growth condition

Embryo induction has been carried out according to the method of Kouadio (2018). Approximately 1 g of healthy, friable calluses were weighed into sterile centrifuge tubes under the hood. Callus were cultured in jars containing 30 mL of EIM at a rate of two explants per jar. The jars containing the explants were closed, sealed with parafilm and incubated in the culture chamber. After two subcultures of two weeks each, the jars were tested for evidence of embryogenic or proembryonic structures. All media were incubated in growth room at under a 12 h photoperiod with cool white fluorescent light at 2000 lux of intensity, and the temperature was maintained at 28 ± 2 °C with 70 % relative humidity

### 2.2.3.3. Microscopic observations of embryogenic cells

After four weeks of growing, the embryogenic structures were observed on optical microscope DC5.5V/200 mA Lamp: LED (white). For this purpose, callus tweezers from the embryo induction media were taken from each jar and mounted in a drop of distilled water between slide and lamina. Microscopic observations were made at 400 magnification (G x 400). The shape of the embryogenic structures (elongated, round, oval) and their consistency (dense or aerated cytoplasm) were investigated. Eight observations were made for each treatment.

### 2.2.3.4. Study of embryogenic cells viability

The viability of embryogenic cells was tested using a solution of trypan blue (0.2 %) according to the method of Sumantran (2011). This stain makes it possible to assess the viability of the cells by staining the dead cells blue. Thus, 5 mg of embryogenic callus were weighed and placed in 5 mL of distilled water and gently homogenized by shaking. The resulting suspension was added to 5 mL of the 0.2 % trypan

blue solution and homogenized using a vortex. The resulting homogenate was incubated for 5 minutes. After three successive rinses with distilled water on filter paper, callus tweezers were mounted in a drop of distilled water between slide and slide. Observations were made using the DC5.5V/200 mA microscope, at magnification (Gx400) on a malassez slide.

Each experiment was repeated eight times and viable cells were counted. Cells stained blue are dead cells and those not stained blue are alive.

### 2.2.3.5. Embryos maturation and germination.

After embryo induction, 500 mg of embryos with nodules were transplanted onto the best embryo induction medium for 4 weeks to induce embryo maturation. At the end of maturation, the embryos are transferred to new medium for another four weeks to initiate embryo germination. The stages of development of the embryos have been investigated using the method of Thiruvengadame *et al* (2006).

### 2.2.4. Statistical analyses

For each experiment, the rate of embryogenic cell induction, the number of viable and non-viable cells and embryogenic index were determined. To normalize the data, all percentage values were subjected to arcsin ( $\sqrt{x}$ ) transformation before statistical analysis. The analyses were performed with Statistica version 7.1 software. Analysis of variance (ANOVA) was used to calculate the means. Analyses with one and two classification standard were performed on the mean values of the measured parameters. When a significant difference was found between two means, Newman-Keuls test at 5 % threshold was used to classify the means.

## 3. Results

### 3.1. Effect of the carbon source on embryogenic cells induction

The results of carbon sources effect reported in Table 1 and showed that the response of explants of embryogenic cell induction was significantly influenced by the carbon source ( $p < 0.05$ ). Thus, glucose induced the highest rate of embryos (64.58 %), followed by sucrose (46.7 %), fructose (30.4 %) and maltose (29.94 %). The results of viability test showed that the medium supplemented with glucose induce highest viability rate of induced embryos. Glucose was therefore selected as the best carbon source to assess the effect of glucose concentration on embryogenesis. Thus, analysis of the table 2 shows that 30 g.L<sup>-1</sup> of glucose gives the highest embryogenic index and embryogenic cell count (0.67 and 67.34 %, respectively). 30 g.L<sup>-1</sup> glucose was selected for further work.

**Table 1. Evaluation of carbon source effect on embryogenic cells induction.**

Paramètres			
carbone source (g.L <sup>-1</sup> )	Embryogenic cell induction rate	Viable cells number	No viable cells number
Indicator	00 ± 00 d	5.9 ± 00 d	94.9 ± 0.21 a
maltose	29.94 ± 0.02 c	37.01 ± 0,04 c	62.99 ± 0.13 b
sucrose	46.74 ± 0.07 b	46.6 ± 0.07 c	53.4 ± 0.08 c
fructose	30.40 ± 0.03 c	60.3 ± 0.12 b	39.7 ± 0.04 c
glucose	64.58 ± 0.15 a	85.9 ± 0.19 a	14.1 ± 0.01 d

In the same column, the means followed by the same letter are not significantly different (Newman-Keuls test at the 5%).

**Table 2. Effect of glucose concentration on embryogenic cells induction**

Paramètres		
Glucose concentration (g.L <sup>-1</sup> )	Embryogenic Index	Embryogenic cell induction rate
Indicator	00 ± 00 d	00 ± 00 d
20	0.39 ± 0.001 c	39.06 ± 0.03 c
30	0.67 ± 0.007 a	67.34 ± 0.17 a
40	0.51 ± 0.003 b	51.47 ± 0.1 b
50	0.47 ± 0.002 c	47.54 ± 0.06 b

In the same column, the means followed by the same letter are not significantly different (Newman-Keuls Test 5%).

### 3.2. Effect of amino acids on embryogenic cells induction

The analysis of Table 3 shows that amino acids have a significant effect ( $p < 0.002$ ) on embryogenic cells induction. Thus, the medium Aa<sub>1</sub> (MIE + 30 g.L<sup>-1</sup> glucose + 0.5 mg.L<sup>-1</sup> glutamine) induced the highest level of embryogenic cells (47.31 %). It is followed by medium Aa<sub>5</sub> (MIE + 30 g.L<sup>-1</sup> glucose + 0.5 mg.L<sup>-1</sup> glutamine + 0.2 mg.L<sup>-1</sup> casein hydrolysate + 2 mg.L<sup>-1</sup> glycine) with 37.26 %. The media Aa<sub>3</sub> (MIE + 30 g.L<sup>-1</sup> glucose + 0.5 mg.L<sup>-1</sup> glutamine + 0.2 mg.L<sup>-1</sup> casein hydrolysate); Aa<sub>4</sub> (MIE + 30 g.L<sup>-1</sup> glucose + 0.5 mg.L<sup>-1</sup> glutamine + 0.2 mg.L<sup>-1</sup> asparagine + 2 mg.L<sup>-1</sup> glycine) and Aa<sub>2</sub> (MIE + 30 g.L<sup>-1</sup> glucose + 0.5 mg.L<sup>-1</sup> glutamine + 0.2 mg.L<sup>-1</sup> asparagine) induced the lowest levels of embryogenic cells (21.47; 25.94 and 27.28 %). The embryogenic index study showed that the Aa<sub>1</sub> medium containing glutamine induce highest embryogenic index (0.47). In contrast, the lowest embryogenic index was recorded with Aa<sub>3</sub> medium (0.21).

Viability tests showed that Aa<sub>1</sub> medium (EIM + 30 g.L<sup>-1</sup> glucose + 0.5 mg.L<sup>-1</sup> glutamine) induced the highest number of viable cells (81.35 cells) and the lowest number of viable cells was recorded on the control medium (4 cells). The control medium induced the highest number of non-viable cells.

**Table 3. Influence of amino acids on the induction of embryogenic cells in the cotton plant**

Paramètres				
Amino Acids	Embryogenic index	Embryogenic cells induction rate	Viable cells number	No viables cells number
Indicator	00 ± 00	00 ± 00 d	04 ± 0.00 d	96.01 ± 0.23 a
Aa <sub>1</sub>	0.47 ± 0.003 a	47.31 ± 0.07 a	81.35 ± 0.17 a	18.65 ± 0.04 d
Aa <sub>2</sub>	0.27 ± 0.001 c	27.28 ± 0.02 c	31.88 ± 0.03 c	68.12 ± 0.14 b
Aa <sub>3</sub>	0.21 ± 0.001 c	21.47 ± 0.02 c	27.86 ± 0.02 c	72.14 ± 0.15 b
Aa <sub>4</sub>	0.25 ± 0.001 c	25.91 ± 0.02 c	37.51 ± 0.04 c	62.49 ± 0.13 b
Aa <sub>5</sub>	0.37 ± 0.002 b	37.26 ± 0.03 b	66.25 ± 0.13 b	33.75 ± 0.04 c

In the same column, the means followed by the same letter are not significantly different (Newman-Keuls test at the 5%). Aa<sub>1</sub> (MIE + 30 g.L<sup>-1</sup> glucose + 0.5 mg.L<sup>-1</sup> glutamine); Aa<sub>2</sub> (MIE + 30 g.L<sup>-1</sup> glucose + 0.5 mg.L<sup>-1</sup> glutamine + 0.2 mg.L<sup>-1</sup> asparagine); Aa<sub>3</sub> (MIE + 30 g.L<sup>-1</sup> glucose + 0.5 mg.L<sup>-1</sup> glutamine + 0.2 mg.L<sup>-1</sup> casein hydrolysate); Aa<sub>4</sub> (MIE + 30 g.L<sup>-1</sup> glucose + 0.5 mg.L<sup>-1</sup> glutamine + 0.2 mg.L<sup>-1</sup> asparagine + 2 mg.L<sup>-1</sup> glycine); Aa<sub>5</sub> (MIE + 30 g.L<sup>-1</sup> glucose + 0.5 mg.L<sup>-1</sup> glutamine + 0.2 g.L<sup>-1</sup> casein hydrolysate + 2 mg.L<sup>-1</sup> glycine)

### 3.3. Effect of hormonal combination on embryogenic cells induction

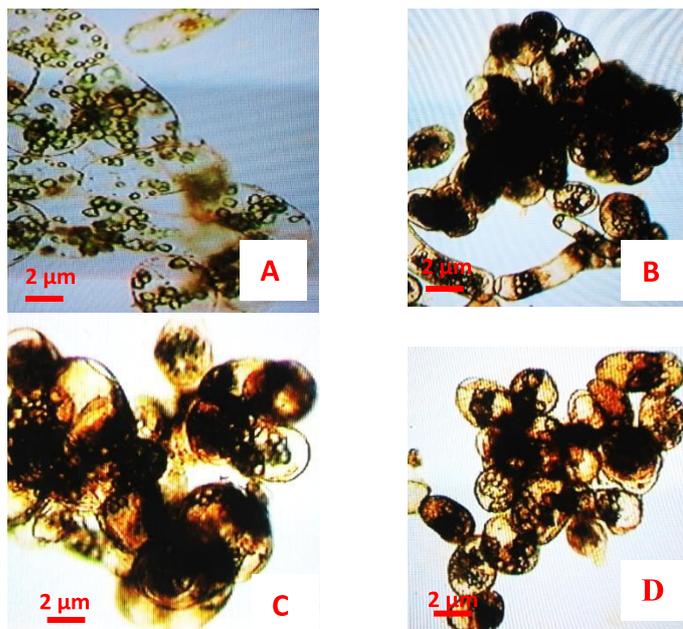
The results show that the hormonal combination influenced significantly induction rate and embryogenic index (Table 4). Thus, the medium supplemented with 0.5 mg.L<sup>-1</sup> 2,4D + 0.5 mg.L<sup>-1</sup> KIN

induced the highest rate of embryos (74.52 %). The medium add 2 mg.L<sup>-1</sup> ANA + 0.1 mg.L<sup>-1</sup> KIN induced the lowest rate induction (26.94 %). Similarly, the highest embryogenic index (0.74) was recorded on medium containing 0.5 mg.L<sup>-1</sup> 2,4-D + 0.5 mg.L<sup>-1</sup> KIN and the lowest embryogenic index (0.26) was obtained on medium containing 2 mg.L<sup>-1</sup> ANA + 0.1 mg.L<sup>-1</sup> KIN. No embryogenic cells were observed on the control medium (Figure 2). The highest number of viable cells (88.79) was induced on medium containing 0.1 mg.L<sup>-1</sup> 2,4D + 0.5 mg.L<sup>-1</sup> KIN.

**Table 4. Effect of hormonal compound on the induction of embryogenic cells**

Hormonale compound	Paramètres			
	Embryogenic Index	Embryogenic cell induction rate	Viable cells number	No viable cells number
<b>Indicator</b>	00 ± 00 d	00 ± 00 d	06 ± 0,001 d	94 ± 0.25 a
<b>H<sub>1</sub></b>	0.42 ± 0.006 b	42.57 ± 3.15 b	59.66 ± 0.09 b	40.34 ± 0.05 c
<b>H<sub>2</sub></b>	0.26 ± 0.001c	26.94 ± 2.39 c	36.42 ± 0.04 c	63.58 ± 0.14 b
<b>H<sub>3</sub></b>	0.74 ± 0.08 a	74.52 ± 1.49 a	88.79 ± 0.2 a	11.21 ± 0.01d
<b>H<sub>4</sub></b>	0.43 ± 0.004 b	43.89 ± 2.66 b	64.78 ± 0.13 b	35.22 ± 0.04 c
<b>H<sub>5</sub></b>	0.37 ± 0.001 b	37.10 ± 3.20 b	58.9 ± 0.09 b	41.1 ± 0.08 c

In the same column, the means followed by the same letter are not significantly different (Newman-Keuls test at 5%). H<sub>1</sub>: (MIE + 30 g.L<sup>-1</sup> glucose + 2 mg.L<sup>-1</sup> ANA+0.1 mg.L<sup>-1</sup> KIN); H<sub>2</sub>: (MIE + 30 g.L<sup>-1</sup> glucose + 4 mg.L<sup>-1</sup> ANA+1 mg.L<sup>-1</sup> KIN); H<sub>3</sub>: (MIE + 30 g.L<sup>-1</sup> glucose + 0.1 mg.L<sup>-1</sup> 2,4-D+0.5 mg.L<sup>-1</sup> KIN); H<sub>4</sub>: (MIE + 30 g.L<sup>-1</sup> glucose + 0.1 mg.L<sup>-1</sup> 2,4-D+0.5 mg.L<sup>-1</sup> KIN+0.1 mg.L<sup>-1</sup> Zéatine); H<sub>5</sub>: (MIE + 30 g.L<sup>-1</sup> glucose + 0.1 mg.L<sup>-1</sup> AIA+0.1 mg.L<sup>-1</sup> 2,4-D).

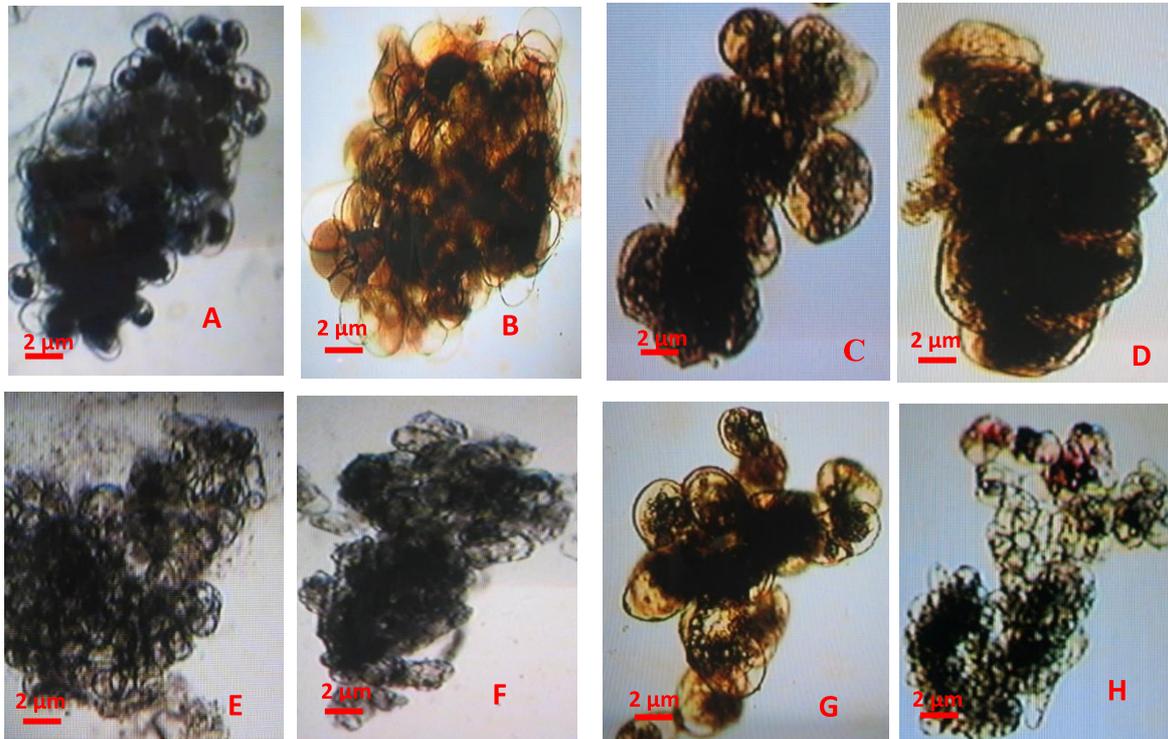


**Figure 2 : Cotton embryo induced on different media culture**

A: Non-embryonogenic cell control; B: MIE + 30 g.L<sup>-1</sup> glucose; C: MIE + 30 g.L<sup>-1</sup> glucose + 0.5 mg.L<sup>-1</sup> glutamine; D: MIE + 30 g.L<sup>-1</sup> glucose + 0.1 mg.L<sup>-1</sup> + 0.5 mg.L<sup>-1</sup> KIN; GX400

### 3.4. Embryos maturation and germination

The results of embryo maturation reveal that embryos evolve progressively with the appearance of certain stages of somatic embryogenesis. Culture on the germination medium revealed that these embryos did not germinate, but were alive, as certain stages of somatic embryogenesis were observed (Figure 3).



**Figure 2: Embryos maturation**

A-B: embryo in globular stage; C-D: embryo in cordate stage; E-F: heart stage; G-H: embryo in torpedo/cotyledonary stage; GX400

## 4. Discussion

Somatic embryogenesis is artificially induced and leads to the formation of an embryo from a somatic cell. The cells nature, culture conditions and other factors play an important role in the acquisition of embryogenic capacity (Najiba *et al.*, 2008; Yapo, 2013; Kouadio *et al.*, 2017). This study highlights the influence of the composition of the medium on somatic embryogenesis. The results show that the carbon source influences embryogenic cells induction. In *in vitro* culture, sugars are indispensable as they are the only source of energy for the explant. They induce osmotic stress which would be at the basis of the induction of embryogenic structure. Similar observations have been reported by Kouakou, (2009). Similarly, Koné (2010) showed in voandzou that callus regular subcultures in the presence of 30 g.L<sup>-1</sup> sugar favoured the induction of embryogenic structure. However, cells react differently depending on the source of carbon present in the culture medium. For example, glucose has been shown to have the highest rate of induction of embryogenic cells. Indeed, among carbon sources, glucose is the form most assimilable by plants (Richter, 1993). This would explain the results obtained. Similar results were obtained by Firoozabady and Deboer (2006) and Kouakou (2009) who showed that, glucose used as a carbon source favours the induction of somatic embryos in the cotton. So, in peaches, Declerck *et al*

(1986) showed that glucose and sorbitol gave better results than fructose and sucrose. The action of carbon sources on embryo induction appears to be species-specific. Indeed, in pineapple and olive (*Olea europaea*) Brhadda *et al* (2006); Yapo (2013), and Kouadio (2018) have shown that sucrose promotes the induction and proliferation of embryogenic cells. Glucose appears to be the best source of carbon to induce embryos in cotton.

In terms of glucose concentration, the results showed that a concentration of 30 g.L<sup>-1</sup> resulted in the highest level of embryogenic cells. The concentration of 30 g.L<sup>-1</sup> seems to be the best to induce embryos in a cotton plant. Indeed, high concentrations would lead to an increase in osmotic pressure inducing stress in medium culture. This osmotic pressure leads to a strong absorption of sugars and minerals. It result is an accumulation of sugar in the cells which gives the brown colouring of callus. On the other hand, an increase in osmotic pressure would be harmful to embryos, which are fragile structures. Kumar *et al* (2013) obtained similar results on MS medium supplemented with 30 g.L<sup>-1</sup> of glucose. In cotton, work has shown that glucose at the concentration of 30 g.L<sup>-1</sup> is ideal for cell proliferation and embryo induction (Trolinder and Goodin, 1988; Koné, 2010; Kouakou, 2009). In olive trees, Brhadda *et al.* (2008) showed that sucrose at 30 g.L<sup>-1</sup> concentration is more favourable for the development of somatic embryos. In addition, authors have shown that the sugar concentration generally used for embryo induction and development in several species is between 20 and 30 g.L<sup>-1</sup> (Han *et al.*, 1989; Rout *et al.*, 1991). Moreover, some species (asparagus and chrysanthemum) require higher sugar concentrations of up to 50 g.L<sup>-1</sup> (Komura *et al.*, 1990; May *et al.*, 1991). This means that the effect of carbon source concentration is strongly influenced by genotype.

In terms of amino acids, the addition of 0.5 mg.L<sup>-1</sup> glutamine induced the highest level of embryogenic cells compared to the other media tested. Indeed, once in the culture medium, the amino acids provide a source of nitrogen for the cells to use to stimulate embryogenesis. Likewise, Yapo (2013) uses nitrogen selectively in the form of nitrate for embryo induction. Therefore, the high level of nitrate would have a significant effect on the induction of embryogenic cells. Our results are in agreement with those of Price and Smith (1979), Davidonis and Hamilton (1983) who showed in *Gossypium klotzschianum* that the presence of glutamine in the medium allows a high number of embryos to be obtained. Finer (1988) reported that glutamine promotes embryo induction and proliferation. The presence of casein hydrolysate associated with glycine appears to stimulate the formation of embryogenic cells. These results corroborate those of Rangan, (1984) who observed that casein hydrolysate stimulates embryo induction.

The media Aa<sub>4</sub> (0.5 mg.L<sup>-1</sup> glutamine + 0.2 mg.L<sup>-1</sup> asparagine + 2 mg.L<sup>-1</sup> glycine); Aa<sub>2</sub> (MIE + 0.5 mg.L<sup>-1</sup> glutamine + 0.2 mg.L<sup>-1</sup> asparagine) and Aa<sub>3</sub> (MIE + 0.5 mg.L<sup>-1</sup> glutamine + 0.2 mg.L<sup>-1</sup> casein hydrolysate) have been shown to be unfavourable for embryo induction. This could be explained by the different combinations performed. According to Finer (1988), glutamine stimulates embryo induction. However, when it is combined with asparagine, a decrease in the number of embryogenic cells is observed. Embryo induction medium (EIM) with the addition of 0.5 mg L<sup>-1</sup> glutamine is more embryogenic in cotton.

The hormonal compound test show that medium supply 0.1 mg L<sup>-1</sup> 2,4D + 0.5 mg L<sup>-1</sup> KIN induced the highest level of embryogenic cells. This beneficial effect of this hormonal combination on embryo cells induction is explained by the fact that the absence of NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> in the culture medium causes stress. Thus, in the presence of the 2,4D/KIN couple, which is the reference hormone in the *in vitro* culture of cotton, the induction of embryogenic structures would be favoured. On the other hand, the stress caused by the absence of NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> and the high concentration of KNO<sub>3</sub> increases the number of embryos

(Davidonis and Hamilton (1983); Kumar *et al.*, 2013). These results are in agreement with those of Zouzou *et al.* (2008); Kouakou *et al.* (2009); Robinson *et al.* (2011) who showed that in cotton plants the 2,4-D/KIN combination is beneficial for embryos induction. In *in vitro* culture, hormones and more particularly the auxin/cytokinin couple plays an important role in the induction of embryogenesis. Their presence allows the initiation of embryogenesis competence according to Koné (2010). Among synthetic auxins, 2,4D is a hormone capable of inducing somatic embryos when used alone or in combination (Rathore *et al.*, 2015; Raju *et al.*, 2013). H<sub>1</sub> medium containing 2 mg L<sup>-1</sup> ANA and 0.5 mg L<sup>-1</sup> KIN has also been shown to induce embryos. Our results coincide with those of Davidonis and Hamilton (1983) who showed that the ANA/KIN combination was favourable to the induction and proliferation of somatic embryos in certain cotton varieties.

The results of previous tests have clearly shown the ability of callus to induce embryos. Thus, after induction a maturation and germination test was carried out. The results showed that the embryos were able to reach certain stages of embryogenesis but did not germinate. This means that embryogenesis in cotton is strongly linked to the genotype. This genotype effect on *in vitro* regeneration of cotton has already been reported by the work of Trolinder and Goding, (1962); Kouadio, (2004); Kouakou, (2009).

## 5. Conclusion

The primary objective of this study is to propose a favourable culture medium to somatic embryogenesis in cotton. The results clearly showed that glucose at a concentration of 30 g.L<sup>-1</sup> is conducive to the induction of somatic embryos, glutamine, induces somatic embryos. Finally, the 2,4-D/KIN combination represents the best hormonal combination for the induction of somatic embryos in cotton plants. At the end of this study, we conclude that glucose (MIE + 30 g.L<sup>-1</sup> glucose), H<sub>3</sub> (MIE + 30 g.L<sup>-1</sup> glucose + 0.1 mg.L<sup>-1</sup> 2,4-D + 0.5 mg.L<sup>-1</sup> KIN) and (MIE + 30 g.L<sup>-1</sup> glucose + 0.5 mg.L<sup>-1</sup> glutamine) are the best media for inducing somatic embryos in cotton.

## 6. Reference

- Bachelier, B. (2016). *Coton: suivez le fil. Dossier Fibres et teintures végétales - Jardins de France*, 644, 3 p.
- Davidonis, G., H. & Hamilton, R., H. (1983). *Plant regeneration from Callus tissue of Gossypium klotzchianum L. Plant Science Letter*, 32, 89-93.
- Declerck, V. & Korbon, S. S. (1986). *Influence of growth regulators and carbon sources on induction growth and morphogenesis from leaf tissues of peach (Prunus persica L. Batsch). Journal of Horticultural Sciences*, 71(1), 49-50.
- Finer, J. J. & McMullen, M. D. (1990). *Transformation of cotton (Gossypium hirsutum L.) via particle bombardment. Plant Cell Report*, 8, 586-589.
- Finer, S. E. (1988). *The Man on Horseback (2nd Edition Ed.)*. Boulder, Colorado: Westview Press.
- Firoozabady, E., Heckert, M. & Gutterson, N. (2006). *Transformation and regeneration of pineapple. Plant Cell, Tissue and Organe Culture*, 4 1-16.
- Gamborg, O., Miller, R. & Ojima, K., 1968. *Nutriments requirements of suspension cultures of soybean root cells. Experimental Cell Research*, 50, 151-158.
- Han, H. & Xi, T. (1989). *Rapid propagation of lettuce by embryos. Plant Physiology*, 2, 17-20.
- Haouala, F., farhat, N. & Chabchoub, L. (2010). *Effets du type et de la position de l'explant sur l'induction de cals chez le gerbera (Gerbera jamesonii Bolus). Tropicultura*, 28(1), 57-60.
- ICTSD (Intertional Centre for Trade and Sustainable Development). 2010. *Sustainable Development In International Intellectual Property Law – New Approaches From EU Economic Partnership Agreements*. 45 p.

Komura, H., Chokyu, S., & Ikeda, Y. (1990). Micropropagation of *Asparagus* through somatic embryogenesis and plant regeneration from seedling. *Bulletin. Hiroshima Prefect. Agricultural Experimental Station*, 53, 43-50.

Koné, M. 2010. Développement de méthodes de régénération *in vitro* du voandzou [*Vigna subterranea* (L.) Verdc. (fabaceae)] et analyse de l'homogénéité variétale des plantules régénérées, Thèse de Doctorat, 214p.

Kouadio, J. Y., Mongomaké, K., Djè, Y., D'Almeida, M. A. & Zouzou, M. (2004). L'étiollement est un facteur d'induction de l'embryogenèse somatique au cours de la callogenèse chez deux variétés récalcitrantes de cotonnier (*Gossypium hirsutum* L.) cultivées en Côte d'Ivoire. *Biotechnologie Agronomie Société et Environnement*, 8(3), 155-162.

Kouadio, O. K. S. (2018). Effet de la composition du milieu de culture sur la régénération *in vitro* de l'ananas [*Ananas comosus* (L.) var. Cayenne lisse] par embryogenèse somatique indirecte et impact du stress salin sur les paramètres morphophysologiques des vitroplants régénérés. Thèse de Doctorat, 206 p.

Kouadio, O. K. S., Yapo, E. S. S., Kouassi, K. M., Silue, O., Koffi, E. & Kouakou, T. H. (2017). Improved callogenesis and somatic embryogenesis using amino acids plant growth regulators combination in pineapple [*Ananas comosus* (L.) merr. (Bromeliaceae)]. *European Journal of Biotechnologie and Bioscience*, 5(5), 06-16.

Kouakou, K. L. (2009). Optimisation de la production de plantules de deux espèces de rotin *Laccosperma secundiflorum* (P. Beauv) Kuntze et *Eremospatha macrocarpa* (G. Mann & Wendl.) H. Wendl commercialisées en Afrique tropicale. Thèse de Doctorat, 154 p.

Kouakou, T. H. (2003). Contribution à l'étude de l'embryogenèse somatique chez le cotonnier (*Gossypium hirsutum* L.) : évolution de quelques paramètres biochimiques au cours de la callogénèse et de cultures de suspensions cellulaires. Thèse de Doctorat, 144 p.

Kumar, M., Singh, H., Shukla, A. K., Verma, P. C. & Singh, P. K. (2013). Induction and establishment of somatic embryogenesis in elite Indian cotton cultivar (*Gossypium hirsutum* L. cv Khandwa-2). *Plant signaling & Behavior*, 8(10), 26762-26767.

May, R. A., & Trigiano, R. N., (1991). Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaves of *Dendranthema grandifloro*. *Journal of American Society for Horticultural Science*, 116 (2), 366-371.

Miranda, J. E., Rodrigues, S. M. M., De Almeida, R. P., Da Silva, C. A. D. & Togola, M. (2013). Reconnaissance de ravageurs et ennemis naturels pour les pays C-4. *Embrapa Brasília, DF, Brésil*, 25, 74 p

Murahige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco virus cultures. *Physiology plant*, 15, 473-497.

Najiba, B., Dou, E. & Abdelhadi, A. (2008). Effet du sucre sur l'embryogenèse somatique de l'olivier (*Olea europaea* L.) cv. «Picholine marocaine» *Biotechnol. Agronomy and Society and Environ*, 12(3), 245-250.

N'guessan, A. S. R., Ayolie, K., Yapo, S. E. S., Konan, Y. K. F., N'cho, A. L., N'goran, K. D., Kone, D., Kouadio, Y. J. & Kouakou, T. H. (2019). Induction of High-Frequency Callus with an Elite Cotton (*Gossypium Hirsutum* L.) from Côte d'Ivoire. *Journal of Advances in Biotechnology*, 8, 1104-1117.

Price, H. J. & Smith, R. H. (1979). Somatic embryogenesis in suspension cultures of *Gossypium klotzschianum* Anderss. *Planta*, 145, 305-307.

Raju, C. S., Kathiravan, K., Aslam, A. & Shajahan, A. (2013). An efficient regeneration system via somatic embryogenesis in mango ginger (*Curcuma amada* Roxb.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 112(3), 387-393.

Rangan, T. S., Zvala, T. & Ip, A. (1984). Somatic embryogenesis in *Gossypium klotzschianum* L. *in vitro*, 20, 256 p.

Rathore, M. S., Paliwal, N., Anand, K. V. & Agarwal, P. K. (2015). Somatic embryogenesis and *in vitro* plantlet regeneration in *Salicornia brachiata* Roxb. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 120(1), 355-360.

Richter, G. (1993). *Les glucides in Métabolisme des végétaux. Physiologie et brochure. Ed Presses Polytechniques et Universitaires. Romandes chap. IV, pp 189-220.*

Robinson, P. J., Srivardhini, S. & Sasikumar, G. (2011). *Somatic embryogenesis and plant regeneration from cotyledon tissue of Arachis hypogaea L. Research in Plant Biology, 1(3), 21-27.*

Rout, G. R., Debata, B. K. & Das, P. (1991). *Somatic embryogenesis in callus culture of Rosa hybrida L. cv. Landora. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 27(1), 65-69.*

Sakhanokho, H. F., Zipf, A., Rajasekaran, K., Saha, S. & Sharma, G. C. (2001). *Induction of highly embryogenic calli and plant regeneration in Upland (Gossypium hirsutum L.) and Pima (Gossypium barbadense L.) cotton. Crop Science, 41, 1235-1240.*

Thiruwengadam, M., Mohamed, S., Yang, C. & Jayabalan, N. (2006). *Development of an embryogenic suspension culture of bitter melon (Momordica charantia L). Scientia Horticulturae, 109, 123-129.*

Trolinder, N. L. & Goodin, J. R. (1988). *Somatic embryogenesis in cotton (Gossypium): Requirement for embryo development and plant regeneration. Plant Cell, Tissue Organe Culture, 12, 43-53.*

Yapo, S. E. S. (2013). *Propagation et régénération in vitro de l'ananas (ananas comosus var. comosus (l. merrill) coppers & leal) cultivé en côte d'ivoire et étude physicochimique des fruits issus des vitrocultures. Thèse de Doctorat, 151p.*

Zouzou, M., Kouakou, T. H., Koné, M., Amani, N. G., & Kouadio, Y. J. (2008). *Effect of genotype, explants, growth regulators and sugars on callus induction in cotton (Gossypium hirsutum L.). Australian Journal of Crop Science, 2(1), 1-9,*

## RÉSUMÉ

Le cotonnier (*Gossypium hirsutum* L.) occupe une place importante dans l'économie mondiale. Sa fibre couvre plus de 50 % du marché des fibres textiles. En Côte d'Ivoire, le coton représente environ 10 % du volume d'exportation et contribue à 1,7 % du PIB. Cependant, les problèmes liés à la régénération *in vitro* de cette plante limite les possibilités d'amélioration. Il serait donc important de comprendre les facteurs limitant la régénération *in vitro* du cotonnier. Pour ce faire, la biotechnologie à travers ses diverses méthodes nous a servi d'outil de travail. Cette étude a consisté à rechercher les conditions idéales pour la production de cellules embryogènes, et de proposer une alternative de multiplication du cotonnier à travers la micropropagation chez le cotonnier. Pour atteindre ce but, différents milieux de culture ont été testés. Les résultats ont permis d'identifier le milieu MSB5 + 30 g.L<sup>-1</sup> glucose + 0,75 g.L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub> + 0,1 mg.L<sup>-1</sup> 2,4-D + 0,5 mg.L<sup>-1</sup> KIN comme ayant une potentialité callogénique supérieur aux autres milieux. Les tests réalisés sur le type d'explant ont indiqués que la partie basale de l'hypocotyle est plus bénéfiques pour induire des cals. De même, l'induction de cellule embryogène a été plus favorable sur le milieu MIE additionné de MSB5 - NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> + 2 KNO<sub>3</sub> + 0,1 mg.L<sup>-1</sup> 2,4-D + 0,5 mg.L<sup>-1</sup> KIN (74 %). La maturation et la germination s'est révélée sans effet. L'analyse UHPLC de composés des cals embryogènes et non embryogènes a permis d'identifier l'acide salicylique et la catéchine comme marqueur phénoliques de l'embryogenèse somatique chez le cotonnier. Par ailleurs les résultats de la micropropagation ont révélé que la combinaison BAP/KIN a induit le plus grand nombre de bourgeons. Enfin, les vitroplants provenant des embryons immatures ont répondu plus favorablement à l'acclimation.

Mots clés: Embryogenèse somatique, micropropagation, *Gossypium hirsutum*, facteurs limitants, paramètres biochimiques.

## ABSTRACT

Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) holds an important place in the world economy. Its fiber covers more than 50 % of the textile fiber market. In Côte d'Ivoire, cotton accounts for about 10 % of the export volume and contributes to 1.7 % of GDP. However, problems related to the *in vitro* regeneration of this plant limit the possibilities for improvement. It would therefore be important to understand the factors limiting the *in vitro* regeneration of the cotton plant. To this end, biotechnology through its various methods has been used as a working tool. This study consisted of researching the ideal conditions for the production of embryogenic cells, and proposing an alternative for cotton multiplication through micropropagation in the cotton plant. To achieve this goal, different culture media were tested. The results identified the medium MSB5 + 30 g.L<sup>-1</sup> glucose + 0.75 g.L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub> + 0.1 mg.L<sup>-1</sup> 2,4-D + 0.5 mg.L<sup>-1</sup> KIN as having a higher callogenic potential than other media. Tests performed on the type of explant indicated that the basal part of the hypocotyl is more beneficial in inducing calluses. Similarly, embryogenic cell induction was more favourable on the MIE medium with the addition of MSB5 - NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> + 2 KNO<sub>3</sub> + 0.1 mg.L<sup>-1</sup> 2,4-D + 0.5 mg.L<sup>-1</sup> KIN (74%). Maturation and germination were without effect. UHPLC analysis of embryogenic and non-embryonogenic callus compounds identified salicylic acid and catechin as phenolic markers of somatic embryogenesis in cotton. Furthermore, the results of micropropagation revealed that the BAP/KIN combination induced the highest number of buds. Finally, vitroplants from immature embryos responded more favourably to acclimation.

**Key words:** Somatic embryogenesis, micropropagation, *Gossypium hirsutum*, limiting factors, biochemical parameters.