

COMMUNAUTE FRANCAISE DE BELGIQUE  
ACADEMIE UNIVERSITAIRE WALLONIE-EUROPE  
FACULTE UNIVERSITAIRE DES SCIENCES AGRONOMIQUES DE GEMBLoux

**UTILISATION DE L'ESPECE SAUVAGE DIPLOIDE *Gossypium australe*  
F. MUELL. POUR L'AMELIORATION DE L'ESPECE CULTIVEE  
TETRAPLOÏDE *G. hirsutum* L. PAR LA METHODE DES LIGNEES  
MONOSOMIQUES D'ADDITION**

Djibril SARR

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

Promoteur : Pr . Guy MERGEAI

2008

SARR Djibril. (2008). Utilisation de l'espèce sauvage diploïde *Gossypium australe* F. Muell. pour l'amélioration de l'espèce cultivée tétraploïde *G. hirsutum* L. par la méthode des lignées monosomiques d'addition. Gembloux, Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques, 74 p., 17 tab. 7 fig.

**Résumé :** L'espèce diploïde sauvage *Gossypium australe* possède des caractères agronomiques d'intérêt tels que la résistance au fusarium et le "retard à la morphogénèse des glandes à gossypol" qui en font une importante source de variabilité pour l'amélioration génétique de la principale espèce de cotonnier cultivé *G. hirsutum*. Une des approches pour l'introgession de ces caractères est la production et l'exploitation de lignées monosomiques d'addition (LMA). Pour isoler les LMA de *G. australe* sur *G. hirsutum*, le pentaploïde [ $2(G.hirsutum \times G.australe) \times G.hirsutum$ ] a été rétrocroisé comme parent mâle avec l'espèce tétraploïde. Sur les 253 graines obtenues, 106 (42%) ont donné des plantes présentant une morphologie nettement distincte de celle de *G. hirsutum*. Cette différence a été attribuée à la présence de chromosomes de *G. australe*.

Afin de définir des groupes de liaison pour chacun des chromosomes de *G. australe*, 42 plantes représentatives de la variabilité phénotypique observée ainsi que 7 lignées d'addition déjà isolées ont été sélectionnées et analysées avec des marqueurs SSR développés sur l'espèce tétraploïde. Tous les 150 marqueurs utilisés ont amplifié l'ADN de *G. australe* et 84 (56%) ont généré 89 loci polymorphes. Tous ces loci, sauf deux, ont pu être assignés, par classification numérique, à 13 groupes de liaison supposés correspondre aux 13 chromosomes de l'espèce diploïde. Sur cette base, 60% des plantes analysées sont des plurisomiques d'addition; 20%, des LMA tandis que 20 % ne portant aucun marqueur ont été supposées euploïdes. Les nouvelles LMA isolées s'étant révélées être identiques à celles déjà isolées, 5 plantes disomiques d'addition portant au moins un chromosome non-encore isolé à l'état monosomique d'addition ont été autofécondées et leur descendance analysée avec des marqueurs SSR et par la GISH. Cinq nouvelles LMA ont pu ainsi être isolées. Afin d'étudier les potentialités d'utilisation de la méthode des LMA pour le transfert de matériel génétique de l'espèce sauvage vers l'espèce cultivée, la fréquence de transmission et l'intégrité du chromosome surnuméraire, a été analysée avec des marqueurs SSR dans une génération autofécondée de cinq LMA. Trois lignées ont donné un taux de transmission inférieur au ratio attendu de 3:1, chez la quatrième lignée le chromosome surnuméraire a été transmis à toute la descendance. Pour ces quatre lignées le chromosome additionnel a été transmis presque inaltéré. Avec la cinquième lignée, le chromosome additionnel a été transmis suivant le taux attendu mais a été altéré dans la moitié des plantes contenant de la chromatine de *G. australe*. Une des lignées analysées caractérisée par la couleur brune de ses fibres a produit quelques plantes portant également des fibres blanches. Il a été montré que ce mosaïcisme de la couleur des fibres était dû à la perte du chromosome additionnel. Cette perte semble être liée à une fragmentation du chromosome.

SARR Djibril. (2008). Use of the wild diploid species *Gossypium australe* F. Muell. for the improvement of the cultivated species *G. hirsutum* L. by the monosomic alien addition lines method (PhD Thesis in French and in English) Gembloux, Belgium  
Gembloux Agricultural University, 74 p., 17 tab., 7 fig.

**Summary :** The wild diploid species *Gossypium australe* carry interesting agronomic characters such as resistance to wilt fusarium and "delay of the gossypol glands morphogenesis in the seed " that makes it an important source of variability for the genetic improvement of the main cultivated cotton species *G. hirsutum*. One of the approach to introgress these characters is to isolate and exploit monosomic alien addition lines (MAAL). In order to isolate new MAAL of *G. australe* in *G. hirsutum*, the  $[2(G.hirsutum \times G.australe) \times G.hirsutum]$  pentaploid was backcrossed as male parent to *G. hirsutum*. Among the 253 BC<sub>1</sub> derivatives obtained, 106 plants (42%) presented morphological alterations attributed to presence of *G. australe* chromatin. To define an SSR linkage group for each of the 13 *G. australe* chromosomes, 42 plants representative of the phenotypic variability observed in the BC<sub>1</sub> generation and seven alien addition lines already isolated in our laboratory were analyzed using SSR markers developed from the *G. hirsutum* species. Out of the 150 SSR markers used, 100 % amplified *G. australe* DNA and 84 (56 %) generated 89 polymorphic loci. All these loci but two have been assigned, by means of an cluster algorithm, to 13 linkage groups assumed to match up to the 13 chromosomes of the diploid species. On this basis, about 60% of the analyzed plants were multisomic addition lines, 20%, MAAL while 20 % carrying no markers were supposed to be euploid. The newly isolated MAAL appeared to be the same as those already available.

Five disomic alien addition plants carrying at least one additional chromosome different from the chromosomes of *G. australe* previously isolated in a monosomic addition configuration were selfed and the BC<sub>1</sub>S<sub>1</sub> progenies obtained have been analyzed with SSR markers and GISH. Five new MAAL of *G. australe* in *G. hirsutum* have thus been isolated. In order to monitor the potentialities of using MAAL for the transfer of genetic material from the additional chromosome to the genetic background, the transmission frequency and integrity of the supernumerary chromosome have been analyzed with SSR markers in the self-progeny of five MAAL. Three of them revealed a transmission frequency significantly lower than the 3:1 expected ratio, one MAAL presented an exclusive preferential transmission of the additional chromosome. In these four MAAL the alien chromosome was transmitted almost unaltered. With the fifth MAAL the alien chromosome was normally transmitted but was altered in half of the plants containing *G. australe* chromatin. One of the investigated MAAL characterized by its brown fiber produced few plants carrying also white fibers. It has been shown that this mosaicism was due to the loss of the alien supernumerary chromosome. The complete loss of this chromosome seems to be linked to its fragmentation.

Copyright. Aux termes de la loi belge du 30 juin 1994, sur le droit d'auteur et les droits voisins, seul l'auteur a le droit de reproduire partiellement ou complètement cet ouvrage de quelque façon et forme que ce soit ou d'en autoriser la reproduction partielle ou complète de quelque manière et sous quelque forme que ce soit. Toute photocopie ou reproduction sous autre forme est donc faite en violation de la dite loi et des modifications ultérieures.

*Ne serait-ce pas aussi que la difficulté du travail nous fait  
illusion sur l'importance de la découverte et qu'ainsi, pour  
être restés longtemps en route, nous croyons avoir fait  
beaucoup de chemin ?*  
(H. Bergson, Dissertation d'Ecole Normale)

## REMERCIEMENTS

Au terme de ce travail je voudrai exprimer mes plus vifs remerciements au professeur Guy Mergeai qui n'a ménagé aucun effort pour que ce travail se déroule dans les meilleures conditions possibles. Ses conseils avisés, ses remarques et suggestions auront grandement contribué à améliorer la qualité de ce travail.

Mes remerciements vont à la Coopération Technique Belge (CTB) qui m'a octroyé la bourse d'études et à la Communauté française de Belgique qui a rendu possible, par une bourse de voyage, mon séjour au CIRAD.

Toute ma gratitude va au Professeur Jean Pierre-Baudoin qui nous a accueilli au niveau de l'unité phytotechnie tropicale et horticulture ainsi que pour ses pertinentes remarques. A travers sa personne je remercie tout le personnel de l'unité.

Mes remerciements vont également au Dr Jean-Marc Lacape pour avoir accepté de nous accueillir au CIRAD, pour la qualité de ses remarques et suggestions ainsi que pour avoir accepté de faire partie de ce jury.

A Messieurs le Recteur A. Thewis, Dr J-M Jacquemain, les professeurs Kettemann, Toussaint, Du Jardin qui ont bien voulu consacrer un peu de leur temps pour juger ce travail, j'exprime toute ma reconnaissance.

Je remercie Maguy et Lolita pour leur aide précieuse dans la réalisation de l'hybridation génomique *in situ*.

Je remercie le Directeur de l'Ecole Nationale Supérieure d'Agriculture de Thiès (ENSA) P. I Samb qui a mis à notre disposition la parcelle où nous avons pu mener nos travaux de terrain au Sénégal.

A mes collègues du labo Olivier, Halima, Bintou, Nafi, Silué, Gwladys, Eugénie, Laurent je renouvelle toute ma reconnaissance pour leur disponibilité et leur amitié sincère.

A mes compatriotes Tanor Ndao, Amadou Gueye, Coly, Michel, Mme Sy et à la belgo-sénégalaise Mme Denise Krecké, j'exprime tous mes remerciements.

Je ne saurai terminer sans remercier MM. Thiam, Mboup et Diop respectivement Directeur de l'Assistance Technique, ex-Directeur de l'enseignement secondaire technique et ex-Adjoint au directeur de l'enseignement secondaire technique qui m'ont fourni une aide précieuse

Je remercie très sincèrement M. Djibril Koné de la DMP pour son aide précieuse dans

A Tandian Diaw, Habib et au Grand Isidore, je dis merci.

## LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Schéma de création de lignées monosomiques d'addition dans le genre <i>Gossypium</i> . .....	6
Figure 2 : Schéma d'exploitation théorique des lignées monosomiques d'addition (d'après Baudoin, 1973). ....	23
Figure 3 : Identification of <i>G. australe</i> chromosomes in <i>G. hirsutum</i> background. ....	38
Figure 4 : Plant #13 of MAL-G <sub>2</sub> -6 carrying white-fibre and brown-fibre bolls .....	51
Figure 5 : Loss of the <i>G. australe</i> -specific fragment produced by the marker BNL3103 in plant #39 of MAL-G <sub>2</sub> -6. ....	51
Figure 6 : Boll with white-fibre and brown-fibre seed-cotton produced in Senegal by a MAL- G <sub>2</sub> -6 plant. ....	53
Figure 7. Deletion mapping of <i>G. australe</i> c6 and its putative condition in plants #13, #37 and #39 before and after ratooning .....	60

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Travaux menés pour l'exploitation des espèces sauvages diploïdes du genre <i>Gossypium</i> par la méthode des lignées monosomiques d'addition.....	7
Table 2 : Segregation of SSR polymorphic loci in the pentaploid progeny and in alien addition lines already isolated .....	30
Table 3 : Assignment of the polymorphic SSR loci to <i>G. australe</i> chromosomes .....	31
Table 4 : Composition of the BC <sub>1</sub> generation .....	33
Table 5 : Frequency of the different <i>G. australe</i> chromosomes in the BC <sub>1</sub> generation. ....	33
Table 6 : Segregation of SSR markers in #24 self-progeny .....	36
Table 7 : Segregation of SSR markers in #14 self-progeny .....	36
Table 8 : Segregation of SSR markers in #11 self-progeny .....	37
Table 9 : Segregation of SSR markers in #7 self-progeny .....	37
Table 10 : Segregation of SSR markers in G2XII self-progeny .....	37
Tableau 11 : SSR linkage group characterizing each of the <i>G. australe</i> chromosome.....	48
Table 12 : Transmission frequency and integrity of the alien chromosome in the five self- pollinated MALs .....	49
Table 13 : Constitution of MAL-G <sub>2</sub> -2 self-progeny carrying altered <i>G. australe</i> chromosome .....	49
Table 14 : Constitution of MAL-G <sub>2</sub> -6 self-progeny carrying altered <i>G. australe</i> chromosome .....	49
Table 15 : Seed fiber color of MAL-G <sub>2</sub> -6 self-progeny.....	51
Table 16 : Screening results of different branches of MAL-G <sub>2</sub> -6 plants #13, #37 and #39 after ratooning showing the chromosome elimination in plant #39. ....	52
Table 17 : Distribution of the different types of bolls found on branches of MAL-G <sub>2</sub> -6 plants #13, #37 and #39. ....	52

## TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE.....	1
CHAPITRE 1 : ELARGISSEMENT DE LA BASE GÉNÉTIQUE DE LA PRINCIPALE ESPÈCE DE COTONNIER CULTIVÉ <i>GOSSYPIUM HIRSUTUM</i> L., PAR LA CRÉATION ET L'EXPLOITATION DE LIGNÉES MONOSOMIQUES D'ADDITION .....	3
1. Introduction .....	3
2. AMELIORATION GENETIQUE DU COTONNIER CULTIVE <i>G. hirsutum</i> L. PAR HYBRIDATION INTERSPECIFIQUE.....	4
3. UTILISATION DE LA MÉTHODE DES LMA POUR L'AMÉLIORATION GÉNÉTIQUE DE <i>G. hirsutum</i> .....	5
3.1. Génomes diploïdes utilisables par la méthode des LMA .....	5
3.2. Utilisation des LMA pour l'introggression de caractères agronomiques d'intérêt .....	5
3.3. Identification de gènes d'intérêt chez les espèces sauvages et cartographie chromosomique .....	8
3.4. Intérêt phylogénétique.....	8
4. PRODUCTION DES LMA.....	9
4.1 Production du triploïde.....	9
4.2 Production de l'hexaploïde et du pentaploïde.....	9
4.3 Production de la descendance de première génération du pentaploïde.....	10
4.4. Origines des plantes euploïdes introgressées de la descendance du pentaploïde.....	11
4.5. Composition, fertilité et fréquence d'apparition des différents aneuploïdes dans la descendance de première génération des pentaploïdes .....	12
4.6. Intégrité des chromosomes surnuméraires dans la descendance aneuploïde de la première génération du pentaploïde .....	13
4.7. Production de la descendance de deuxième génération du pentaploïde.....	14
4.8. Caractéristiques des LMA des espèces diploïdes sauvages de <i>Gossypium</i> sur <i>G.</i> <i>hirsutum</i> .....	14
4.8.1 Morphologie des LMA.....	14
4.8.2 Fertilité des LMA .....	15
4.8.3 Caractéristiques cytologiques des LMA .....	15
4.8.4 Transmission du chromosome surnuméraire par les LMA .....	16
5. IDENTIFICATION DES LMA .....	17
5.1. Approches possibles pour l'indentification des LMA.....	17
5.2. Caractérisation morphologique .....	17
5.3. Caractérisation par la cytogénétique .....	18
5.3.1 Apports de la cytogénétique à la caractérisation des LMA.....	18
5.3.2 Caractérisation par la cytogénétique classique.....	18
5.3.3 Caractérisation par la cytogénétique moléculaire ou hybridation <i>in situ</i> .....	19
5.4 Caractérisation par les marqueurs génomiques de l'ADN.....	21
6. TECHNIQUES D'EXPLOITATION DES LMA POUR L'AMÉLIORATION DU COTONNIER CULTIVÉ.....	22
CHAPITRE 2 : ISOLATION OF FIVE NEW MONOSOMIC ALIEN ADDITION LINES OF <i>Gossypium australe</i> IN <i>G. hirsutum</i> BY SSR AND GISH ANALYSES. ....	25
1. INTRODUCTION.....	25
2. MATERIALS AND METHODS .....	26
2.1 Plant material.....	26
2.2 DNA extraction, PCR amplification and gel electrophoresis .....	26
2.3 SSR genotyping.....	27



2.4 Genomic <i>in situ</i> hybridization analysis .....	27
2.5 Statistical tests .....	28
3. RESULTS.....	28
3.1 Production of the BC <sub>1</sub> derivatives.....	28
3.2 SSR transferability and polymorphism .....	29
3.3 BC <sub>1</sub> genotyping and establishment of the <i>G. australe</i> linkage groups.....	29
3.4 Composition of the BC <sub>1</sub> generation : .....	32
3.5 Sterility in the BC <sub>1</sub> generation and assignment of morphological characteristics to <i>G. australe</i> chromosomes.....	32
3.6 Alien chromosome transmission in BC <sub>1</sub> S <sub>1</sub> generation and isolation of new MAAL.....	34
3.7 Assignment of the marker CIR280 and significance of its segregation pattern in the BC <sub>1</sub> generation and #24 self-progeny .....	35
3.8 Genomic <i>in situ</i> hybridization .....	38
3.9 Conservation of the synteny between <i>G. hirsutum</i> and <i>G. australe</i> chromosomes .....	39
4. DISCUSSION .....	39
4.1 Transferability of SSR markers.....	39
4.2 Frequency and fidelity of alien chromosome transmission.....	40
4.3 Sterility caused by a high number of supernumerary chromosomes and putative genes of sterility .....	42
4.4 Statistical evidences that a recombination had occurred in the hexaploid.....	42
4.5 Some evidences in favor of a polyploidization predating diploid <i>Gossypium</i> species' divergence .....	44
4.6 Some evidences of genomic rearrangements occurred in the allotetraploid cotton.....	44
CHAPITRE 3 : ALIEN CHROMOSOME TRANSMISSION AND SOMATIC ELIMINATION IN MONOSOMIC ADDITION LINES OF <i>Gossypium australe</i> IN <i>Gossypium hirsutum</i> .....	
1. INTRODUCTION.....	46
2. MATERIALS AND METHODS .....	47
2.1 Plant Materials.....	47
2.2 SSR genotyping.....	47
2.3 Statistical tests .....	47
MAAL .....	48
3. RESULTS.....	48
3.1 Alien chromosome transmission in the five self-pollinated MAALs .....	48
3.2 Somatic elimination of the supernumerary chromosome in MAL-G <sub>2</sub> -6.....	50
4. DISCUSSION .....	54
4.1 Alien chromosome transmission in self-pollinated MAALs.....	54
4.2 Integrity of the alien chromosome in the self-pollinated MAALs .....	56
4.3 Somatic elimination of the supernumerary chromosome in MA-G <sub>2</sub> -6 line .....	56
4.4 Timing, origin and mechanisms of the chromosome elimination.....	58
4.5 Mapping of the <i>G. australe</i> chromosome carrying a gene controlling the fiber colour. 59	
4.6 Implications of somatic elimination in the use of MAAL for the improvement of cultivated species.....	59
7. CONCLUSION .....	61
BIBLIOGRAPHIE .....	68

## INTRODUCTION GENERALE

Le genre *Gossypium* est composé d'espèces diploïdes ( $2n = 2x = 26$ ) et tétraploïdes ( $2n = 4x = 52$ ). Tous les deux groupes incluent des espèces cultivées et des espèces sauvages. Les deux seules espèces diploïdes cultivées (*G. arboreum* L. et *G. herbaceum* L.) appartiennent au génome A. En fonction de leur affinité avec ce génome A, la quarantaine d'autres espèces diploïdes sont réparties dans sept autres classes génomiques désignées par les lettres B, C, D, E, F, G et K (Endrizzi et al. 1985 ; Stewart 1995). Les espèces tétraploïdes sont apparues il y a 1 à 2 millions d'années à la suite d'une hybridation entre une espèce de génome A et une espèce de génome D suivie d'un doublement chromosomique (Wendel and Cronn 2003). Parmi les cinq espèces tétraploïdes, deux (*G. barbadense* et *G. hirsutum*) sont cultivées.

A elle seule, l'espèce *G. hirsutum* représente au niveau mondial plus de 85% des superficies cultivées et près de 90% de la production ; ce qui en fait la principale espèce de cotonnier cultivé (Berti et al. 2006). La Chine, les Etats-Unis, l'Inde et le Pakistan, représentent près de 80% de cette production mais c'est dans les pays francophones d'Afrique de l'Ouest, qui ne représentent que 5% de la production mondiale mais 15% des échanges mondiaux, que son poids économique est le plus élevé notamment comme importante pourvoyeuse d'emplois, principale source de devises et facteur essentiel de modernisation des sociétés et économies rurales (Berti et al. 2006 ; Zagbaï et al. 2006).

L'extension de la culture de *G. hirsutum* a été accompagnée d'une importante érosion génétique se traduisant par une faible variabilité génétique (Wendel et al. 1992 ; Tatineni et al. 1996 ; Iqbal et al. 1997 ; Liu et al. 2000). Cependant, même si ce rétrécissement de la base génétique n'a pas empêché des progrès génétiques significatifs (Van Esbrock and Bowman 1998), les nombreuses espèces diploïdes sauvages du genre *Gossypium* constituent une importante source de variabilité pour répondre aux défis que constituent la nécessité d'augmenter la productivité, d'améliorer la qualité des fibres et de mieux valoriser les sous-produits de la récolte (Stewart 1995, Mergeai 2006).

Parmi les espèces diploïdes sauvages, les espèces endémiques australiennes montrent un certain nombre de caractères agronomiques intéressants (forte ténacité de la fibre, haut rendement à l'égrenage, tolérance à des facteurs abiotiques et biotiques défavorables, inhibition de la synthèse du gossypol uniquement dans la graine etc.) qu'il serait intéressant d'intégrer dans la principale espèce cultivée (Brubaker et al. 1996 ; Vroh bi et al. 1999 ; McFadden et al. 2004). Une des stratégies consiste à utiliser la méthode des lignées monosomiques d'addition (LMA) (Ahoton et al 2003 ; Becerra Lopez-Lavalle and Brubaker

2007). Celles-ci sont constituées de plantes présentant en plus du jeu chromosomique normal de l'espèce cultivée un chromosome d'une espèce sauvage. Les LMA sont un matériel génétique important aussi bien pour l'introgression de caractères agronomiques d'intérêt que pour l'étude de l'histoire évolutive des espèces.

En limitant le génome de l'espèce donneuse à un seul chromosome, l'utilisation des LMA permet de réduire la quantité de matériel génétique étranger dans le fond génétique et en conséquence permet de réduire le temps nécessaire pour obtenir un génotype équilibré.

Au niveau de l'Unité de Phytotechnie Tropicale a été mis en place un programme d'amélioration génétique de la principale espèce cultivée *Gossypium hirsutum* L. par l'utilisation de l'espèce *G. australe*. Six LMA et une lignée disomique d'addition ayant déjà été isolées, l'objectif de nos travaux est de poursuivre l'isolement de la série complète des LMA de *G. australe* F. Muell. sur *G. hirsutum* L. et d'évaluer les possibilités d'introgression au niveau des LMA par la mesure, en régime d'autofécondation, des transferts du chromosome surnuméraire sur les lignées isolées et les taux de recombinaison allosyndétique. Le présent document s'articulera autour de trois parties. D'abord une synthèse bibliographique où il sera passé en revue la problématique de l'élargissement de la base génétique de la principale espèce de cotonnier cultivé *G. hirsutum* par la création et l'exploitation des lignées monosomiques d'addition. Ensuite nous décrivons dans la deuxième partie les travaux menés et les résultats obtenus pour isoler avec des marqueurs SSR et par hybridation génomique *in situ* (GISH) cinq nouvelles LMA de *G. australe* dans *G. hirsutum*. Enfin dans une troisième partie il sera exposé les résultats obtenus sur la transmission du chromosome surnuméraire dans cinq LMA et sur l'élimination somatique du chromosome surnuméraire qui a été observée dans une des lignées.

# **CHAPITRE 1 : ELARGISSEMENT DE LA BASE GÉNÉTIQUE DE LA PRINCIPALE ESPÈCE DE COTONNIER CULTIVÉ *GOSSYPIUM HIRSUTUM* L., PAR LA CRÉATION ET L'EXPLOITATION DE LIGNÉES MONOSOMIQUES D'ADDITION**

## **1. Introduction**

S'il est sans doute exagéré de dire que la variabilité de la principale espèce de cotonnier cultivé *Gossypium hirsutum* L., est aujourd'hui trop étroite pour permettre des progrès génétiques significatifs, la quarantaine d'espèces diploïdes sauvages que compte le genre pourraient être utilisées comme source de gènes. Ces cottonniers diploïdes présentent en effet une série de caractères agronomiques intéressants dont le transfert dans la principale espèce cultivée permettrait l'augmentation de la productivité, l'amélioration de la qualité et la valorisation des sous-produits. Ce faisant, un grand pas serait ainsi franchi dans l'objectif de maintenir le cotonnier comme première culture textile et comme moteur du développement dans les pays d'Afrique francophone où il occupe une place centrale dans l'économie nationale et dans l'économie rurale, en particulier.

Une voie potentielle de mobilisation des ressources génétiques que constituent ces espèces diploïdes consiste en l'utilisation de la technique des lignées monosomiques d'addition. Comme toute méthode d'amélioration par hybridation interspécifique, celle-ci pose des problèmes liés à l'existence de barrières à la reproduction, à la faiblesse des taux de recombinaison et à la formation de produits non équilibrés qui rendent souvent l'exercice laborieux.

L'identification et l'exploitation de ces lignées ont pendant longtemps été basées sur une caractérisation morphologique peu fiable et sur les techniques de la cytogénétique classique très lourdes à mettre en œuvre. Elles bénéficient aujourd'hui des grandes avancées enregistrées dans le domaine de la biologie moléculaire à travers le développement des marqueurs de l'ADN et de la cytogénétique moléculaire. Ces progrès font de l'exploitation des lignées monosomiques d'addition une voie prometteuse pour l'amélioration génétique de la principale espèce de cotonnier cultivé.

## **2. AMELIORATION GENETIQUE DU COTONNIER CULTIVE *G. hirsutum* L. PAR HYBRIDATION INTERSPECIFIQUE**

Le recours à l'hybridation interspécifique permet d'élargir la base génétique de la principale espèce de cotonnier cultivé en augmentant les possibilités de choix dans une gamme de génotypes plus large que celle permise par l'hybridation intraspécifique qui n'exploite que la variabilité existant à l'intérieur de *G. hirsutum* (Baudoin 2001).

Suivant les principes dégagés par Harlan and De Wet (1971), Stewart (1995) répartit les ressources génétiques de la principale espèce de cotonnier cultivé, en pools géniques primaire, secondaire et tertiaire suivant la difficulté croissante à surmonter les barrières d'incompatibilité qui empêchent le transfert de matériel génétique entre espèces. Le pool génique primaire est constitué de toutes les formes cultivées, subspontanés et sauvages de *G. hirsutum* et de *G. barbadense* ainsi que des trois autres espèces tétraploïdes du genre (*G. tomentosum*, *G. mustelinum* et *G. darwinii*). Les croisements avec ces espèces sont relativement faciles et les fréquences de recombinaison sont élevées. Le pool génique secondaire comprend les espèces diploïdes de génome A, D, B et F. L'obtention d'un hybride avec ces espèces est plus difficile qu'avec le premier pool, mais une fois l'hybride obtenu, les fréquences de recombinaison observées sont élevées. Cependant comme ces espèces sont diploïdes, l'hybride est, à quelques rares exceptions, un triploïde stérile dont le stock chromosomique doit être doublé pour la production d'un hexaploïde fertile. Le pool génique tertiaire renferme toutes les autres espèces du genre *Gossypium* (espèces de génome E, C, G ou K). Ce sont les espèces dont l'utilisation pose le plus de difficultés en raison des obstacles à surmonter pour créer l'hybride et à la faiblesse des taux de recombinaison (Mergeai 1992 ; Brubaker et al. 1999a).

Les premières tentatives d'amélioration par hybridation interspécifique de la principale espèce de cotonnier cultivé ont d'abord fait appel à l'espèce tétraploïde cultivée *G. barbadense* afin de cumuler les bonnes qualités technologiques de la fibre de *G. barbadense* aux qualités agronomiques de *G. hirsutum* (Schwendiman 1978). Ces hybrides n'ont cependant que très rarement donné des résultats intéressants à cause d'un retour rapide vers le parent récurrent.

La mise au point de techniques permettant de contourner les fortes barrières d'incompatibilité existant entre l'espèce cultivée et les quarante-quatre espèces diploïdes du genre *Gossypium* ouvrent d'immenses sources potentielles de variabilité pour la principale espèce cultivée.

Trois principales voies sont utilisées pour exploiter cette source de variabilité (Mergeai 2006) : (i) une voie trispécifique (paraphylétique) qui procède par l'utilisation d'une espèce-pont de génome A ou D croisée avec l'espèce donneuse pour créer par colchipoïdisation un

allotétraploïde qui sera rétrocroisé avec l'espèce cultivée ; (ii) une voie trispécifique (pseudophylétique) au cours de laquelle l'espèce-pont est d'abord croisée avec l'espèce cultivée pour donner un triploïde dont le nombre chromosomique sera ensuite doublé pour fournir un allohexaploïde. Ce dernier sera ensuite croisé avec l'espèce donneuse pour produire un tétraploïde ; (iii) une voie bispécifique ou aphyllétique d'introgession (Figure 1) qui procède par croisement de *G. hirsutum* avec l'espèce donneuse. Le triploïde résultant est colchipoïdisé pour donner un allohexaploïde qui sera croisé avec l'espèce cultivée pour donner un pentaploïde. Des rétrocroisements avec l'espèce tétraploïde ou des autofécondations de ce pentaploïde et de ses descendants donneront des lignées monosomiques d'addition (LMA) constituées de plantes possédant en plus du jeu chromosomique normal de l'espèce cultivée un chromosome additionnel de l'espèce sauvage diploïde. Pour chaque espèce diploïde sauvage il est donc possible d'obtenir treize lignées monosomiques d'addition correspondant au nombre haploïde de chromosomes.

### **3. UTILISATION DE LA MÉTHODE DES LMA POUR L'AMÉLIORATION GÉNÉTIQUE DE *G. hirsutum***

#### **3.1. Génomes diploïdes utilisables par la méthode des LMA**

L'utilisation des LMA pour l'amélioration de la principale espèce de cotonnier cultivé a d'abord concerné les espèces des génomes A, D, B et F (Baudoin 1973 ; Louant et al. 1977 ; Koto 1983) mais elle s'avère également particulièrement appropriée pour l'exploitation des espèces phylogénétiquement plus éloignées (André and Verschraege 1983 ; Rooney et al. 1991a ; Mergeai 1992 ; Brubaker et al. 1999a ; Ahoton et al. 2003). Plusieurs travaux ont déjà été menés pour étudier les possibilités d'utiliser par cette méthode les espèces diploïdes sauvages du genre *Gossypium*. Le Tableau 1 donne un résumé de ces travaux.

#### **3.2. Utilisation des LMA pour l'introgession de caractères agronomiques d'intérêt**

La voie classique d'utilisation de l'hybridation interspécifique consiste à produire par reproduction sexuée ou hybridation somatique un hybride qui est porteur de nombreux gènes indésirables et qui doit par conséquent être rétrocroisé à plusieurs reprises sur l'espèce cultivée. L'objectif d'atteindre la quasi-isogénicité des génotypes introgressés avec les variétés récurrentes de l'espèce cultivée nécessite alors un nombre très élevé de rétrocroisements pour éliminer les fragments de chromosomes indésirables provenant de l'espèce donneuse du caractère d'intérêt recherché. Du fait qu'elles ne portent qu'un seul



**Tableau 1 : Travaux menés pour l'exploitation des espèces sauvages diploïdes du genre *Gossypium* par la méthode des lignées monosomiques d'addition.**

Espèce diploïde sauvage	Objectifs, Résultats	Références
<i>G. anomalum</i>	Etude cytogénétique du pentaploïde et production de LMA	Deodikar (1949, 1950)
<i>Gossypium spp.</i>	Etude théorique sur l'aneuploïdie ; isole des lignées d'addition des espèces de génomes A, B, C, D et E	Brown (1965)
<i>G. stocksii</i>	Etude d'une lignée disomique d'addition	Kammacher and schwendiman (1969)
<i>G. anomalum</i>	Description de 8 lignées d'addition , Etude des taux de transmission, obtention de lignées introgressées	Poisson (1970)
<i>G. raimondii</i>	Description de 7 lignées d'addition	Baudoin (1973)
<i>G. stocksii</i>	Isolement de 6 lignées d'addition	Schwendiman (1978)
<i>G. anomalum</i> <i>G. stocksii</i>	Caractérisation morphologique et identification de lignées d'addition ; Etude des possibilités d'introgression sur plusieurs générations d'autofécondation, Etude des relations phylogénétiques	Hau (1981b ; 1982)
<i>G. areysianum</i>	Création de LMA et introgressions chez deux lignées exceptionnelles	Maréchal (1972) ; André and Verschraege (1983) ; Mergeai (1992)
<i>G. longicalyx</i>	Création et description de 13 lignées	Koto (1983)
<i>G. sturtianum</i>	Description de 4 lignées d'addition, élimination somatique du chromosome additionnel	Rooney and Stelly (1991) Rooney et al. (1991)
<i>G. australe</i> <i>G. sturtianum</i>	Production de la première génération du pentaploïde	Brubaker et al. (1999a)
<i>G. australe</i>	Création, identification et introgressions	Ahoton (2002)



### **3.3. Identification de gènes d'intérêt chez les espèces sauvages et cartographie chromosomique**

Au-delà de son utilisation pour l'introgession de gènes, la production de LMA, comparable à une dissection du génome, permet de soustraire le chromosome de toutes les actions épistatiques des autres chromosomes auxquels il est naturellement confronté et d'analyser l'expression de chacun de ses gènes dans un fonds génétique homogène.

Par comparaison de LMA avec les espèces parentales, des marqueurs ou des gènes peuvent être attribués au chromosome en addition. Les marqueurs ou gènes simultanément présents chez l'espèce sauvage et chez la LMA mais absents de l'espèce cultivée sont considérés comme étant portés par le chromosome surnuméraire.

### **3.4. Intérêt phylogénétique**

Il part de la théorie de Hutchinson et al., (1947) cité par Hau (1981a) sur la faible différenciation du contenu génique des chromosomes des espèces diploïdes du genre *Gossypium* et de l'hypothèse que si celle-ci est valide, la mise en parallèle des lignées d'addition d'une espèce diploïde avec celles d'une autre espèce diploïde doit montrer des ressemblances morphologiques traduisant l'homéologie existant entre les chromosomes surnuméraires. Ce qui semble être vérifié par Koto (1983) qui a observé une similitude d'action du chromosome surnuméraire entre des LMA de *G. longicalyx*, d'une part, et de *G. anomalum* et de *G. stocksii*, d'autre part, aussi bien sur des caractères qualitatifs que quantitatifs. Mergeai (1992) fait la même observation en comparant les phénotypes de deux LMA de *G. areysianum* sur *G. hirsutum* avec ceux de deux lignées impliquant respectivement un chromosome additionnel de *G. longicalyx* et un chromosome additionnel de *G. anomalum* décrites par Hau (1981b) et par Koto (1983).

Poisson (1969) propose en plus des comparaisons de phénotypes la création de disomiques complexes constitués de plantes possédant deux chromosomes supplémentaires supposés homéologues provenant de deux espèces diploïdes différentes. La confrontation de ces chromosomes dans une même plante devrait fournir, par les niveaux d'appariement observés, des résultats plus précis que lors d'une confrontation dans des garnitures chromosomiques entières. Cette méthode lui permet de trouver des relations d'homéologie entre chromosomes de *G. anomalum* et *G. stocksii*.

Les progrès récents réalisés dans le domaine de la biologie moléculaire et particulièrement dans le domaine de la cartographie génétique, permettent grâce à la transférabilité des

marqueurs développés chez l'espèce cultivée tétraploïde vers les espèces diploïdes sauvages, de mesurer le degré de syntenie et de conservation de la colinéarité entre chromosomes des sous-génomes A et D de l'espèce cultivée tétraploïde et leurs homéologues des espèces sauvages isolés sous forme de LMA.

En permettant ainsi l'étude des relations d'homéologie à l'échelle du chromosome, les LMA représentent un outil efficace pour une meilleure compréhension de l'organisation des génomes et de leurs relations dans le genre *Gossypium*.

## **4. PRODUCTION DES LMA**

### **4.1 Production du triploïde**

Presque toutes les espèces diploïdes peuvent être croisées avec l'allotétraploïde pour produire un triploïde. La plus ou moins grande difficulté à créer le triploïde dépend du pool génique auquel appartient l'espèce diploïde. Brubaker et al (1999a) travaillant sur plusieurs espèces appartenant aux 3 génomes australiens C, G et K qu'ils croisent avec *G. hirsutum* dans les deux sens montrent qu'il est plus facile d'obtenir des hybrides avec les espèces de génome C qu'avec les espèces de génome G et que celles de génome K se situent dans une situation intermédiaire entre ces deux génomes. Ils montrent en outre que l'hybride triploïde est plus difficile à obtenir lorsque l'espèce sauvage est utilisée comme parent femelle. Ce qui confirme la théorie de Beasley (1940) selon laquelle dans le genre *Gossypium* les chances de réussite dans les hybridations sont d'autant plus grandes qu'on prendra comme parent femelle la plante qui a le plus haut niveau de ploïdie. L'explication se trouverait dans le rapport de ploïdie entre l'albumen et le zygote qui serait un facteur essentiel pour le développement de ce dernier.

### **4.2 Production de l'hexaploïde et du pentaploïde**

En raison de la forte stérilité du triploïde due aux mésappariements entre chromosomes de génomes différents, le nombre chromosomique de celui-ci doit être doublé à la colchicine pour produire un hexaploïde qui, par rétrocroisement avec l'allotétraploïde donnera un pentaploïde. Même si elle exige parfois beaucoup de croisements, l'obtention de ce pentaploïde ne pose généralement pas de problèmes insurmontables (Koto 1983 ; Brubaker 1999a; Ahoton 2003). Altman et al. (1987), contrairement à d'autres auteurs (Brubaker 1999a ; Ahoton, 2003) ont cependant dû recourir au sauvetage d'embryons pour produire le pentaploïde impliquant l'espèce *G. sturtianum*. Il serait également possible d'obtenir le pentaploïde avec certaines espèces sans passer par l'hexaploïde. Il semble en effet que les

triploïdes impliquant les espèces diploïdes de génome K présentent un fort taux de gamètes non réduits. Partant de ce constat Stewart (1995) prédit l'obtention de pentaploïdes par rétrocroisement de ces triploïdes sur *G.hirsutum*. Brubaker (1999a) rapporte des travaux non publiés de Stewart dans lesquels ce dernier obtient des pentaploïdes par cette méthode.

#### **4.3 Production de la descendance de première génération du pentaploïde**

La fertilité du pentaploïde autofécondé ou rétrocroisé à plusieurs reprises avec *G. hirsutum* pour produire les lignées d'addition apparaît comme la principale contrainte à l'utilisation de certaines espèces diploïdes. S'il est en effet facile pour des pentaploïdes impliquant les espèces diploïdes du pool génique secondaire comme *G. herbaceum*, *G. arboreum* et *G. anomalum* (Brown 1965 ; Poisson 1970) d'obtenir par autofécondation une assez importante descendance, la fertilité est nulle pour le pentaploïde impliquant *G. sturtianum* et très faible pour celui concernant *G. australe*, deux espèces appartenant au pool génique tertiaire (Ahoton 2002 ; Brubaker 1999). Le recours à des croisements avec l'espèce cultivée permet cependant, même pour les pentaploïdes stériles en autofécondation comme celui impliquant l'espèce *G. sturtianum*, d'obtenir une descendance plus ou moins importante selon l'espèce diploïde concernée. Le succès de ces croisements dépend en grande partie du sens du croisement. Comme pour l'obtention des triploïdes, il est généralement admis que les croisements qui donnent les meilleurs résultats correspondent à ceux au cours desquels le parent ayant le niveau de ploïdie le plus élevé est pris comme parent femelle. De ce point de vue le pentaploïde impliquant *G. australe* constitue une exception dans la mesure où toutes les études concernant cette espèce (Ahoton 2002; Brubaker 1999a) ont montré que les meilleurs résultats sont obtenus lorsque le pentaploïde est pris comme parent mâle.

Koto (1983), pour générer des LMA de *G. longicalyx* sur *G. hirsutum* obtient, en partant de plusieurs pentaploïdes des résultats irréguliers : pour certains pentaploïdes aucune descendance n'est obtenue en autofécondation tandis que pour d'autres des plantes viables sont recouvrées. Il obtient des plantes viables en croisement dans les deux sens avec presque toujours une descendance plus importante quand le pentaploïde est pris comme parent femelle plutôt que comme parent mâle. Ahoton (2003) donne la description la plus exhaustive du schéma suivi pour la production de LMA impliquant les espèces *G. australe* et *G. sturtianum*. Pour le pentaploïde impliquant la première espèce, des graines sont obtenues aussi bien en autofécondation qu'en croisement. Par contre avec le pentaploïde impliquant *G. sturtianum*, aucune descendance n'est obtenue par autofécondation alors que des graines sont produites en rétrocroisant le pentaploïde par *G. hirsutum* ; le nombre de graines obtenues quand le

pentaploïde est pris comme parent mâle étant nettement plus faible que lorsqu'il est pris comme parent femelle. Altman et al. (1987) travaillant sur l'hybride *G. hirsutum* x *G. sturtianum* ont recours au sauvetage d'embryons pour recouvrer, avec un taux de réussite de 1 %, des plantes issues du rétrocroisement du pentaploïde pris comme parent femelle.

Les produits issus du pentaploïde sont constitués en plus des plantes euploïdes caractéristiques de l'espèce cultivée, des "souches introgressées" (Louant et al. 1977) composées des plantes euploïdes présentant un phénotype distinct de celui de la variété de l'espèce cultivée impliquée dans la création de l'hybride interspécifique et d'aneuploïdes (les lignées d'addition).

#### **4.4. Origines des plantes euploïdes introgressées de la descendance du pentaploïde**

Il est établi que pour les espèces diploïdes proches de l'espèce cultivée, particulièrement celles de génome A ou D, on observe à la phase triploïde de nombreux multivalents qui témoignent, en dépit l'existence d'un facteur de diploïdisation chez l'espèce cultivée, d'échanges de matériel génétique. Ainsi Baudoin (1973) cite Kammacher qui a observé qu'à la métaphase I de la méiose du triploïde *G.hirsutum* x *G. raimondi*, la presque totalité des chromosomes de *G. raimondii* s'apparient avec ceux du génome D de *G. hirsutum*. Le nombre d'appariements observé en métaphase I tend cependant à diminuer avec l'éloignement génétique de l'espèce diploïde par rapport aux chromosomes des deux sous-génomes constitutifs du tétraploïde cultivé.

Au stade hexaploïde un nombre important d'appariements hétérogénétiques peuvent être observés, particulièrement lorsque l'espèce diploïde appartient aux génomes ancestraux ou dans une moindre mesure aux autres espèces du pool génique secondaire (Kammacher 1956 ; Maréchal 1972). Louant (1977) montre en outre que ce stade est particulièrement propice à des échanges intergénomiques lorsqu'on procède à des générations d'autofécondation, schéma qu'il a d'ailleurs préconisé comme méthode d'introgression. La preuve de l'occurrence de ces échanges est donnée par l'évolution vers la stérilité des hexaploïdes impliquant des espèces des génomes A et D maintenus en autofécondation. Cette stérilité serait le résultat de l'accumulation des échanges intergénomiques qui perturbent la méiose (Baudoin 1973).

La probabilité d'échanges intergénomiques au stade pentaploïde semble être intermédiaire entre celle observée au stade triploïde et celle notée au stade hexaploïde. Elle est d'autant plus grande que l'affinité génomique de l'espèce sauvage avec l'espèce cultivée est importante.

Pour celui qui vise à isoler des LMA, ces échanges intergénomiques, quel que soit le moment auquel ils se produisent, constituent un obstacle à l'isolement de LMA stables.

#### **4.5. Composition, fertilité et fréquence d'apparition des différents aneuploïdes dans la descendance de première génération des pentaploïdes**

Très peu de travaux se sont intéressés à décrire de manière systématique la descendance de première génération des pentaploïdes. Quand ces études ont été menées, elles ont souvent porté sur un faible nombre d'individus. L'explication de cette situation est sans doute à trouver dans la lourdeur des études cytogénétiques nécessaires à mettre en œuvre. Cet obstacle a été souvent contourné en combinant l'observation des caractères morphologiques et l'évaluation de la fertilité pour inférer le génotype des différents individus.

Chez le cotonnier, la fertilité des aneuploïdes est en étroite corrélation avec le nombre de chromosomes qu'ils portent. La stérilité croît régulièrement avec le nombre de chromosomes surnuméraires. Celle-ci pourrait être expliquée par la loi de Darlington qui stipule que la stérilité découle plus d'interactions géniques entre chromosomes qu'à des problèmes de comportement méiotique (Baudoïn 1973 ; Louant et al. 1977). La stérilité la plus sévère traduisant un nombre maximal d'interactions serait alors obtenue lorsque la moitié des gènes est dupliquée. Il faut toutefois noter que la stérilité ne semble pas uniquement liée au nombre de chromosomes additionnels. La spécificité du chromosome semble également jouer un rôle non négligeable (Schwendiman 1978). On peut cependant retenir que l'espèce *G. hirsutum* supporte l'addition d'un assez grand nombre de chromosomes supplémentaires. Schwendiman (1978) indique des lignées d'addition possédant de 1 à 9 chromosomes surnuméraires de *G. stocksii*, Altman et al. (1987) signalent des aneuploïdes qui comportent 10 chromosomes de *G. sturtianum*. Ahoton (2003), analysant 27 plantes de la descendance de première génération du pentaploïde impliquant *G. sturtianum* note 25 individus stériles portant tous plus d'un chromosome surnuméraire. André et Verschraege (1983) observent chez 35 plantes de la descendance de première génération de *G. areysianum* sur *G. hirsutum* une proportion variable de plantes présentant de un à 6 Chromosomes surnuméraires. Tous les travaux portant sur la production de LMA dans le genre *Gossypium* notent aussi des fréquences d'apparition très inégales entre les différentes formules caryologiques. Beccara Lopez-Lavalle et Brubaker (2007) montrent ainsi qu'au niveau de la descendance du pentaploïde *G. hirsutum* x *G. australe*, les fréquences de transmission des 13 groupes de liaison supposés correspondre aux 13 chromosomes de *G. australe* varient entre 11 et 100 % alors que dans la descendance de première génération du pentaploïde *G. hirsutum* x *G. sturtianum*, les fréquences de transmission varient entre 0 et 91 %. Des conclusions similaires peuvent être tirées des observations réalisées par Ahoton (2002) concernant le nombre d'individus au sein des

différentes classes phénotypiques isolées dans la descendance du pentaploïde *G. hirsutum* x *G. australe*. Ces effectifs, reflet du taux de transmission des chromosomes de l'espèce sauvage varient d'un seul individu à 249 pour la classe phénotypique la plus importante.

La constitution caryologique de la descendance de première génération du pentaploïde pourrait dépendre du mode d'obtention de cette descendance. Comme chez le cotonnier le gamète mâle supporte moins de chromosomes supplémentaires que le gamète femelle, on peut supposer que la descendance obtenue en prenant le pentaploïde comme parent mâle donnera des aneuploïdes avec très peu de chromosomes supplémentaires voire uniquement des LMA alors que lorsque le pentaploïde est pris comme parent femelle la descendance aneuploïde sera en majorité constituée de plurisomiques. Altman et al. (1987) obtiennent ainsi par un rétrocroisement du pentaploïde *G. hirsutum* x *G. sturtianum* au cours duquel le pentaploïde a été pris comme parent femelle des plantes portant 6 à 10 chromosomes de *G. sturtianum*. Par contre dans la descendance rétrocroisée du pentaploïde *G. hirsutum* x *G. australe* utilisé comme parent mâle, Ahoton (2003) trouve que la descendance aneuploïde du pentaploïde est essentiellement constituée de plantes monosomiques d'addition.

Dans la plupart des études impliquant des espèces diploïdes du pool génique secondaire au cours desquelles le pentaploïde est pris comme parent femelle, on remarque que la descendance est en majorité stérile ou quasi stérile témoignant ainsi de la présence de plusieurs chromosomes (Poisson 1970 ; Koto 1983 ; André et Verschraege 1983) et de la grande tolérance des gamètes femelles pour les chromosomes additionnels.

#### **4.6. Intégrité des chromosomes surnuméraires dans la descendance aneuploïde de la première génération du pentaploïde**

Jusqu'avant Ahoton et al. (2003) toutes les études concernant les LMA dans le genre *Gossypium*, ont porté sur des analyses morphologiques et/ou cytogénétiques. En utilisant des marqueurs microsatellites cartographiés distribués tout le long du chromosome, les travaux de ces chercheurs intègrent une nouvelle dimension dans l'analyse des aneuploïdes, qui, si elle n'avait pas été ignorée ou était même souvent mise en évidence restait malgré tout difficile à évaluer. Cette nouvelle dimension concerne l'intégrité des chromosomes surnuméraires dans les descendance de première génération du pentaploïde. Partant de 13 plantes possédant un chromosome surnuméraire de *G. australe* mis en évidence par analyse cytogénétique classique, les travaux d'Ahoton et al. (2003) ont permis d'identifier six LMA dont les chromosomes additionnels sont homéologues des groupes de liaison c6-c25, c12-c26, c9-c23, c10-c20, c7-c16 et c3-c17 de *Gossypium hirsutum*. Becerra Lopez-Lavalle et Brubaker (2007)

ont réalisé une étude plus exhaustive en analysant avec des marqueurs AFLP la totalité de la descendance BC1 et BC2 des pentaploïdes impliquant les espèces *G.australe* et *G.sturtianum*.

La conclusion inédite de cette étude est que, s'il existe dans la descendance du pentaploïde des plantes monosomiques et plurisomiques avec des chromosomes entiers, une grande partie des plantes non-euploïdes portent des chromosomes incomplets, fragmentés.

Nos résultats (cf. chapitre 2) portant sur une quarantaine de plantes de la descendance de première génération du pentaploïde *G. hirsutum* x *G. australe* analysées avec des marqueurs SSR cartographiés concluent dans le même sens : une assez forte proportion des plantes aneuploïdes est en réalité constituée de ce que nous appellerons des plurisomiques segmentaires ou fragmentaires. Le nouveau défi consiste à identifier sous quelle forme (libre ou recombinaison) se trouvent ces fragments de chromosomes. Dès à présent de nombreux indices concourent à laisser penser que ces fragments ne sont pas recombinaisonnés.

#### **4.7. Production de la descendance de deuxième génération du pentaploïde**

Lorsque certaines lignées ne sont pas isolées dans la première génération de la descendance du pentaploïde, il est procédé à l'autofécondation ou au croisement (selon le niveau de fertilité) des plantes plurisomiques qui contiennent ces chromosomes non encore isolés. A ce stade, la fertilité s'est parfois améliorée et la production d'une importante descendance permet d'obtenir l'isolement de nombreuses souches monosomiques d'addition.

#### **4.8. Caractéristiques des LMA des espèces diploïdes sauvages de *Gossypium* sur *G. hirsutum***

##### 4.8.1 Morphologie des LMA

Les LMA présentent une très grande variabilité morphologique mais elles ressemblent souvent davantage à l'espèce cultivée qu'à l'espèce donneuse du chromosome en addition (Ahoton 2002). Elles montrent généralement une croissance ralentie comparée à celle de l'espèce cultivée. Chez certaines lignées les variations morphologiques paraissent indépendantes du chromosome en addition et semblent plus liées à leur nature trisomique. Cette configuration trisomique et/ou la faible différenciation génomique dans le genre *Gossypium* pourraient expliquer les grandes similitudes morphologiques parfois observées entre LMA issues d'espèces diploïdes différentes (Hau 1981b ; Koto 1983 ; Mergeai 1992).

#### 4.8.2 Fertilité des LMA

Selon l'espèce diploïde, le chromosome en addition et le gamète considéré, les LMA présentent une grande variabilité quant à leur fertilité (Hau 1982 ; Mergeai 1992). On peut cependant retenir que la fertilité des LMA est généralement moindre comparée à celle des plantes euploïdes mais nettement supérieure à celle des plantes présentant plusieurs chromosomes en addition. La fertilité femelle est généralement plus élevée que la fertilité mâle.

#### 4.8.3 Caractéristiques cytologiques des LMA

Les fréquences d'appariements intergénomiques représentent une mesure importante des possibilités d'introgesser par recombinaison un gène d'intérêt de l'espèce diploïde sauvage vers l'espèce cultivée. Les observations de ces appariements sont effectuées à la métaphase I ou à la prophase.

Les plaques métaphasiques présentent l'avantage d'être plus faciles à obtenir et à observer mais présentent l'inconvénient de ne montrer qu'imparfaitement les appariements qui ont lieu aux stades antérieurs. En effet, le nombre d'appariements homéologues observés a tendance à diminuer au fur et à mesure du déroulement de la première partie de la méiose et plus rapidement lorsque les espèces sont éloignées phylogénétiquement (Endrizzi et al. 1985, Mergeai, 1992). D'où, il apparaît que les appariements visibles à un stade tardif comme la métaphase I ne traduisent que très partiellement le nombre total de recombinaisons. C'est ainsi qu'observant des centaines de plaques métaphasiques, Mergeai (1992) travaillant sur des LMA de *Gossypium areysianum* sur *G. hirsutum* n'observe aucun trivalent alors qu'il note pourtant dans la descendance de ces lignées des euploïdes manifestement introgressés. L'absence de multivalents en métaphase I ne permet donc pas de conclure à une absence d'échanges intergénomiques pendant les étapes antérieures de la méiose. Cette situation s'explique quand on sait que *G. areysianum* appartient au génome E qui fait partie du pool génique tertiaire.

D'une manière générale, à cause des différences d'homologie entre chromosomes du fond génétique et du chromosome additionnel, les taux d'appariements allosyndétiques observés quel que soit le stade méiotique sont souvent très faibles.

Etant donné les difficultés d'évaluation des appariements méiotiques, on peut, pour estimer les chances de succès de transférer un gène d'intérêt, calculer directement le taux de plantes euploïdes recombinées dans la descendance de la LMA. Bien qu'elle soit assez lourde à mettre



en oeuvre, cette solution l'est cependant moins que l'analyse cytogénétique lorsqu'on dispose d'une méthode de criblage à haut débit comme les marqueurs moléculaires.

Rooney et Stelly (1991) soulignent l'élimination somatique du chromosome surnuméraire chez une LMA de *Gossypium sturtianum* sur *G. hirsutum* et proposent l'hypothèse que l'élimination somatique du chromosome surnuméraire doit survenir à un stade précoce. Au cours de nos travaux (cf. chapitre 3) nous avons également noté le même phénomène chez une LMA de *G. australe* sur *G. hirsutum*.

#### 4.8.4 Transmission du chromosome surnuméraire par les LMA

La transmission normale du chromosome additionnel est un phénomène rare. Les facteurs susceptibles d'expliquer ce constat sont les suivants : (i) irrégularités méiotiques qui se traduisent par le rejet du chromosome additionnel suivi de son élimination lors de la formation des gamètes; (ii) manque de viabilité des gamètes aneuploïdes; (iii) plus grande compétitivité des gamètes à  $n$  chromosomes par rapport aux gamètes à  $n+1$  chromosomes; (iv) avortement des zygotes à  $2n + 1$  chromosomes; (v) manque de viabilité des plantules monosomiques d'addition (Mergeai, 1992). Plusieurs autres facteurs influencent la transmission du chromosome surnuméraire.

Selon le chromosome en addition, les LMA présentent des taux de transmission du chromosome surnuméraire différents. Rooney et Stelly (1991) trouvent parmi les 4 LMA qu'ils ont étudiées un taux de transmission moyen de 23 % pour 3 LMA et de 90 % pour la quatrième. Chez une LMA de *G. australe* sur *G. hirsutum* nous avons trouvé un taux de transmission du chromosome additionnel de 100 % (cf. chapitre 3). Ces taux très élevés pourraient s'expliquer par la présence sur ces chromosomes d'un gène distorateur de ségrégation qui entraîne la transmission préférentielle du chromosome qui le porte en rendant non-fonctionnels les gamètes qui ne le contiennent pas. Ce phénomène est assez bien connu chez les espèces du genre *Aegilops* qui portent sur certains chromosomes des facteurs gamétocides qui causent des cassures aléatoires des chromosomes et induisent des aberrations chromosomiques ( Jiang et al. 1994 ; Nasuda et al. 1998).

Chez la plupart des LMA du genre *Gossypium*, le chromosome surnuméraire est mieux transmis par le gamète femelle que par les grains de pollen. Ce qui découle du fait déjà signalé que dans le genre *Gossypium* le gamète femelle supporte mieux les chromosomes supplémentaires que le gamète mâle. Mergeai (1992) note que le taux de transmission en autofécondation dans le genre *Gossypium* est souvent plus élevé que la somme des taux de transmission mâle et femelle.

Le taux de transfert du chromosome surnuméraire dépend de son comportement méiotique qui est influencé par sa nature recombinée ou non. Les recombinaisons subies par le chromosome additionnel, en augmentant son affinité avec les chromosomes de l'espèce cultivée peuvent donc influencer sur son taux de transmission.

Hau (1982) montre que le taux de transmission évolue de manière favorable au cours des générations d'autofécondation.

## **5. IDENTIFICATION DES LMA**

### **5.1. Approches possibles pour l'identification des LMA**

L'identification des LMA est un des aspects les plus importants pour leur utilisation comme moyen de transfert de gènes des espèces sauvages aux espèces cultivées. Cette identification se situe à deux niveaux : (i) identification des plantes monosomiques d'addition et (ii) identification du chromosome en addition. Toute différence morphologique, chromosomique, physiologique ou moléculaire entre plantes peut être utilisée pour procéder à cette identification. Les techniques utilisées se distinguent par leur fiabilité, leur rapidité, le niveau de technicité requis, leur coût, etc. D'abord fondées sur l'évaluation de la morphologie des plantes, elles utilisent aujourd'hui les techniques d'hybridation et de marquage moléculaires qui permettent une identification rapide et précise.

### **5.2. Caractérisation morphologique**

C'est la méthode la plus anciennement utilisée. Elle part du principe qu'un chromosome en addition, étranger de surcroît, par sa seule présence et/ou par l'expression des gènes qu'il porte entraîne une perturbation de l'équilibre génique et/ou de nature épigénétique qui induit des désordres physiologiques se traduisant par des effets phénotypiques visibles à l'œil nu.

Souvent associée à d'autres techniques, elle a servi à l'identification de plusieurs LMA d'espèces sauvages du genre *Gossypium* sur *G. hirsutum* L. (Baudoin 1973 ; Hau 1981b; André et Verschraege 1983 ; Koto 1983 ; Ahoton 2002 ). Cependant la plupart de ces auteurs indiquent l'insuffisance de la caractérisation morphologique. En effet, si les LMA sont souvent caractérisées par une croissance ralentie, un manque de vigueur, une fertilité réduite ou par certains caractères particuliers (coloration particulière de la fibre ou des fleurs, forme des capsules, etc.), les caractères morphologiques sont souvent insuffisants pour permettre de distinguer de manière catégorique et fiable toute la série des LMA d'une espèce.

En effet, les caractères morphologiques analysés sont souvent des caractères quantitatifs donc très influencés par le milieu et la pénétrance des gènes que porte le chromosome n'est pas toujours complète. De plus, quand le fond génétique de l'espèce receveuse est un polyploïde comme l'est celui de *G. hirsutum*, il peut réprimer ou jouer un effet tampon qui empêche l'expression du chromosome surnuméraire. Les changements morphologiques ne sont également pas toujours spécifiques au chromosome en addition et seraient parfois plus liés à la configuration trisomique qu'associés à un chromosome particulier. Une ségrégation de caractères peut aussi s'observer au niveau de LMA dont la constitution a impliqué la réalisation de croisements entre plusieurs variétés et/ou accessions différentes. En outre, le chromosome surnuméraire peut subir au cours de la production de la LMA des remaniements (translocations et recombinaisons) susceptibles de modifier l'expression de ses gènes (Louant et al. 1977). A tous ces inconvénients, il faut ajouter la difficulté de procéder à un criblage précoce dans la mesure où plusieurs caractères descriptifs s'expriment à la fin du cycle de développement de la plante.

La caractérisation morphologique est efficace lorsque le chromosome en addition est stable et porte des gènes qui commandent un caractère qualitatif peu influencé par le milieu.

### **5.3. Caractérisation par la cytogénétique**

#### 5.3.1 Apports de la cytogénétique à la caractérisation des LMA

La cytogénétique est l'étude morphologique du matériel génétique organisé en chromosomes dont elle permet le dénombrement et l'identification (Jahier 1992). Utilisée dans l'identification des lignées monosomiques elle permet de s'assurer de la formule caryologique  $2n+1$ , de distinguer le chromosome en addition des chromosomes du fond génétique et de distinguer des chromosomes en addition entre eux. C'est une technique qui permet, lorsqu'elle s'adresse aux chromosomes mitotiques, un screening très précoce des lignées d'addition. Elle permet également de vérifier l'état recombiné ou en addition d'un fragment de chromosome en addition.

#### 5.3.2 Caractérisation par la cytogénétique classique

A la métaphase de la mitose et à la métaphase I méiotique, les chromosomes sont sur-enroulés et peuvent être intensément colorés avec des produits comme le réactif de Schiff, le carmin acétique, le Giemsa ou l'orcéine acétique.

La coloration simple des chromosomes permet de les compter et de reconnaître le chromosome surnuméraire lorsque : (i) pour cause de différences d'homologie entre les chromosomes du fond génétique et le chromosome additionnel, celui-ci est rejeté lors de la méiose de la plaque métaphasique, (ii) les chromosomes du fond génétique et celui du chromosome surnuméraire présentent une morphologie ou des tailles différentes.

Par contre, quand les chromosomes sont de petite taille et sont uniformément colorés, la distinction des chromosomes devient délicate et nécessite des observations à des phases méiotiques antérieures à la métaphase (pachytène, diacinèse). Ces phases présentent cependant l'inconvénient d'être plus difficiles à observer (Mergeai 1992)

L'appariement entre chromosomes dépend principalement de leur homologie. L'étude du comportement méiotique d'une LMA permet de trouver les relations homéologiques entre le chromosome étranger avec un ou plusieurs chromosomes du fond génétique. La métaphase est évidemment le stade où les chromosomes sont le plus faciles à observer parce que très contractés. Mais elle ne constitue pas le meilleur stade pour une bonne observation de ce que sont réellement les appariements. C'est au pachytène, stade pendant lequel les chromosomes sont appariés sur toute leur longueur, qu'une ressemblance ou une différence précise entre deux chromosomes d'une paire peuvent être observées (Jahier 1992). Les méthodes cytogénétiques classiques constituent dans l'identification des LMA une grande avancée par rapport à la caractérisation morphologique. Cependant, elles présentent le grand inconvénient d'être assez lourdes à mettre en oeuvre surtout lorsqu'il s'agit d'observer des chromosomes aux stades précoces de la méiose (Jahier 1992 ; Haider Ali et al. 2001).

### 5.3.3 Caractérisation par la cytogénétique moléculaire ou hybridation *in situ*

Les limites de la cytogénétique classique posent la nécessité de disposer de techniques d'identification plus précises. Les méthodes moléculaires qui s'adressent à la séquence d'ADN et permettent une coloration différentielle des chromosomes offrent cette précision. Le principe est basé sur la possibilité de rendre simple-brin les molécules d'ADN cibles et de les hybrider, suivant la loi de complémentarité des bases, avec une molécule d'ADN marquée (avec un marqueur radioactif ou chimique), également rendue monocaténaire, appelée sonde. L'hybridation *in situ* s'opère sur une coupe histologique, donnant ainsi des informations précises sur les relations homéologiques entre chromosomes et sur les remaniements d'une certaine taille. Elle permet de repérer ou de rechercher une molécule d'ADN spécifique dans une population hétérogène et de répondre à la question de la présence ou de l'absence d'un génome particulier dans une lignée d'addition ou une lignée recombinée (Tagu 1999). On

l'utilise sur des chromosomes mitotiques ou méiotiques. Le fait de travailler sur des chromosomes mitotiques en métaphase permet de localiser précisément sur des chromosomes les zones où se situent les séquences homologues de la sonde. L'hybridation *in situ* présente de nombreuses variantes selon le système de détection et le type de sonde utilisée (Ahoton 2002). Selon le système de détection on distingue l'hybridation *in situ* isotopique qui utilise des sondes radioactives et l'hybridation *in situ* à fluorescence (FISH) qui utilise des sondes marquées avec des haptènes telles que la biotine ou la digoxygénine. En fonction du type de sonde, on distingue l'hybridation génomique *in situ* (GISH) où la sonde est constituée de l'ADN total d'un parent de l'hybride et les techniques qui utilisent les séquences d'ADN répété.

Le principe de la GISH consiste à prendre comme sonde l'ADN génomique total marqué d'une des espèces (généralement l'espèce en addition) mélangé en excès avec de l'ADN non marqué de l'espèce du fond génétique (ADN compétiteur), à les digérer de sorte que la taille des fragments soit inférieure à 500 pb et à les hybrider sur la coupe histologique. L'ADN compétiteur s'hybridera alors sur toutes les séquences complémentaires communes aux deux espèces tandis que l'ADN marqué s'hybridera sur les séquences complémentaires spécifiques à l'ADN du chromosome en addition qui apparaît ainsi coloré (Ananthawat-Jonsson et al. 1990 ; Schwarzacher et al. 1992 ; Ahoton 2002).

La GISH présente de multiples avantages (Schwarzacher et al. 1992 ; Ahoton 2002) : (i) il n'est pas nécessaire de semer les plantes ni d'extraire l'ADN car le criblage peut se faire sur les cellules de graines pré-germées ; (ii) de faibles remaniements chromosomiques peuvent être détectés (iii) si les deux espèces sont très éloignées, il n'est pas nécessaire d'ajouter de l'ADN compétiteur ; (iv) il n'est pas nécessaire de connaître l'espèce du chromosome en addition pour la détecter. Il suffit juste de marquer l'ADN de l'espèce du fond génétique (ADN compétiteur). Ainsi, ce sera le chromosome en addition qui prendra la couleur de la contre-coloration. Même si elle sert surtout à établir la formule caryologique des plantes, elle peut, combinée à des analyses avec des marqueurs moléculaires, permettre d'identifier le chromosome en addition. Elle a ainsi permis à Ahoton (2002) d'identifier des chromosomes de *Gossypium australe* sur *Gossypium hirsutum*.

Les limites de la GISH sont liées au degré de parenté entre l'espèce receveuse et l'espèce donneuse : un lien de parenté étroit entre les deux espèces empêche une différenciation des deux types de chromatine.

#### 5.4 Caractérisation par les marqueurs génomiques de l'ADN

Les marqueurs génomiques plus communément appelés marqueurs moléculaires révèlent directement le polymorphisme au niveau des séquences de l'ADN. Deux principales techniques sont utilisées pour révéler ce polymorphisme. La première est basée sur l'hybridation moléculaire (RFLP) tandis que la seconde est fondée sur la PCR (RAPD, AFLP, SSR etc.) (De Vienne 1998). L'une des principales voies d'utilisation de ces marqueurs est la réalisation de cartes génétiques denses. Il existe à l'heure actuelle plusieurs cartes de l'espèce *G. hirsutum* (Reinisch et al. 1994 ; Lacape et al. 2003 ; Nguyen et al. 2004 ; Han et al. 2006 ; Jiwen et al. 2007) comportant des marqueurs RFLP, AFLP, SSR etc. Cette profusion de cartes consacrées à la principale espèce cultivée contraste cependant avec la rareté des études consacrées aux espèces diploïdes sauvages (Altaf-Khan et al. 2006). Des marqueurs spécifiques des espèces diploïdes sauvages constitueraient pourtant un instrument fiable et rapide pour déceler les recombinaisons intergénomiques dans la descendance des LMA. Brubaker et al. (2003) ont, les premiers, cartographié à partir de la F2 d'un croisement *G. australe* x *G. nelsonii* le génome G de *Gossypium* avec des marqueurs AFLP qui ont ensuite été utilisés pour cribler des lignées d'addition.

Les marqueurs cartographiés sur l'espèce *G. hirsutum* sont néanmoins utilisables pour l'identification des LMA. Cette utilisation est basée sur leur transférabilité ou portabilité à travers le genre c'est-à-dire sur la possibilité que ces marqueurs développés pour l'espèce cultivée, puissent amplifier d'autres espèces du même genre et montrer du polymorphisme (Peakall et al. 1998). Le principal intérêt de cette portabilité est de disposer de marqueurs pour les espèces sauvages sans passer par le processus long et onéreux du développement des marqueurs qui serait difficile à réaliser pour chacune des espèces diploïdes sauvages. Les travaux de Altaf-Khan et al. (2006) sont les premiers qui aient porté sur la transférabilité vers les espèces diploïdes des marqueurs SSR développés sur *G. hirsutum*. Avec un taux d'amplification croisée de 83 % et 85 % de polymorphisme entre espèces diploïdes, ils démontrent que les séquences flanquantes des microsatellites sont bien conservées entre le tétraploïde et les espèces diploïdes. Guo et al. (2006) en étudiant la transférabilité d'EST-SSR (séquences SSR dérivées de régions codantes) de l'espèce diploïde *G. arboreum* vers 23 autres espèces diploïdes appartenant à 7 génomes différents trouvent encore des taux supérieurs à ceux trouvés avec les SSR génomiques.

L'identification des LMA avec les marqueurs cartographiés se fait par criblage des individus avec des marqueurs répartis sur l'ensemble du chromosome. Toutefois dans le cas où les

marqueurs utilisés n'ont pas été cartographiés sur l'espèce diploïde en addition, Il faut tenir compte du fait qu'entre l'espèce cultivée et l'espèce sauvage, la synténie et la collinéarité des marqueurs entre les deux espèces peuvent ne pas être respectées. Ahoton et al. (2003) sont parvenus avec des marqueurs SSR cartographiés sur l'espèce tétraploïde à identifier des LMA de *G. australe* sur *G. hirsutum*. De même Becerra Lopez-Lavalle et Brubaker (2007) ont identifié des LMA de *G. australe* et de *G. sturtianum* sur *Gossypium hirsutum* avec des marqueurs AFLP.

## **6. TECHNIQUES D'EXPLOITATION DES LMA POUR L'AMÉLIORATION DU COTONNIER CULTIVÉ**

Les LMA constituent un outil de choix pour l'amélioration génétique mais ne peuvent être utilisées telles quelles pour les raisons suivantes : (i) le chromosome surnuméraire porte plusieurs caractères indésirables ; (ii) la présence du chromosome entier signifie une duplication, au niveau de la plante, de tous les gènes situés sur ce chromosome; (iii) la LMA ne peut être maintenue du fait de la ségrégation du chromosome additionnel dont le taux de transfert par reproduction sexuée ne peut excéder plus de 50% (sauf pour les cas de transmission préférentielle du chromosome additionnel); (iv) le chromosome en addition peut perdre son intégrité suite à des recombinaisons avec un chromosome homéologue ou suite à sa fragmentation.

L'exploitation des LMA du genre *Gossypium* passe, après le choix des meilleurs types d'addition, c'est-à-dire ceux présentant des caractères agronomiques intéressants, par la multiplication des générations par autofécondation d'après le schéma proposé par Baudoin (1973) (Figure 2). Le but visé est de favoriser les échanges intergénomiques. Ceux-ci dépendent principalement de la distance phylogénétique entre les deux espèces. Plus elles sont phylogénétiquement proches, plus les probabilités de recombinaison seront élevées.

Le cotonnier étant une espèce tétraploïde mais ayant le comportement d'un diploïde, cette diploïdisation limite les appariements hétérogénétiques. Le facteur à l'origine de cette diploïdisation est spécifique de l'amphidiploïde mais l'intensité de son influence serait déterminée par la spécificité des génomes des espèces diploïdes intervenant dans la constitution de l'hybride (Louant et al. 1977). Cette hypothèse renforcée par le fait que les LMA sont le siège d'échanges géniques limités et qu'elles présentent, d'après la loi de Darlington, un déséquilibre génique minimal, est à la base de l'intérêt de l'utilisation des LMA comme méthode d'introgession de caractères d'intérêt des espèces diploïdes sauvages sur la principale espèce cultivée. Mergeai (1992) a ainsi obtenu par utilisation de LMA de

*Gossypium areysianum* sur *G. hirsutum* l'introgession de gènes induisant une amélioration simultanée de la résistance et de l'allongement de rupture de la fibre, deux caractères corrélés négativement.

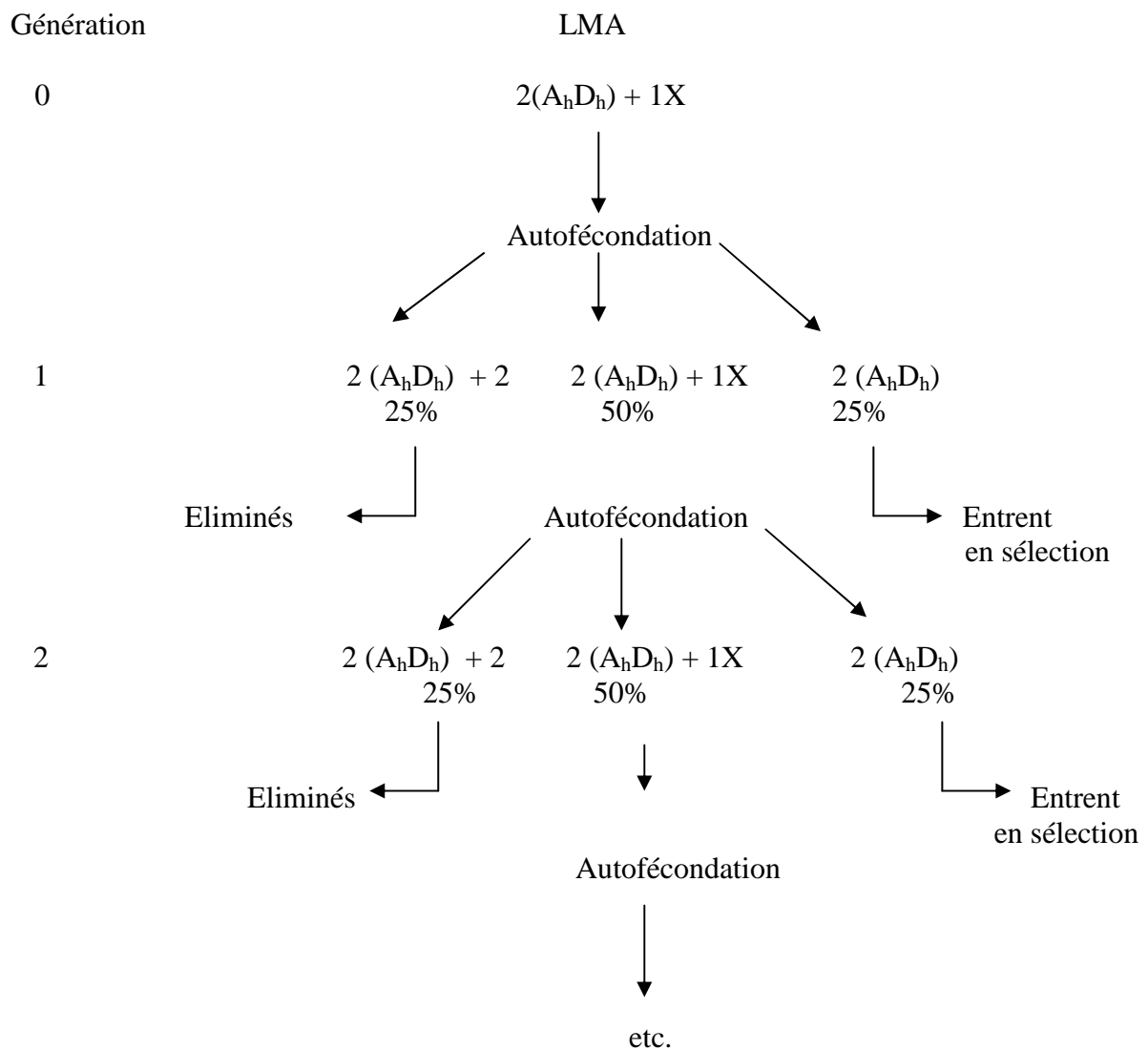


Figure 2 : Schéma d'exploitation théorique des lignées monosomiques d'addition (d'après Baudoin, 1973).

Dans la lignée de substitution un chromosome entier de l'espèce receveuse est remplacé par un chromosome de l'espèce donneuse. Pour obtenir une lignée de substitution on peut croiser une lignée monosomique d'addition avec une lignée monosomique (Koto 1983). La lignée de substitution présente l'inconvénient de perdre les gènes situés sur le chromosome de l'espèce receveuse substitué; situation qui entraîne un déséquilibre génique avec ses effets délétères.



Le chromosome substituant peut également présenter un défaut d'appariement qui induirait une certaine stérilité (Jena et al. 1990). Pour obtenir des lignées recombinées, les lignées de substitution présentent l'avantage par rapport aux LMA de montrer un taux de recombinaison plus élevé. En effet, dans les LMA la présence de deux chromosomes homologues favorise une association entre homologues plutôt qu'entre homéologues alors que dans la lignée substituée un chromosome ne trouvant plus son homologue aura plus tendance à s'apparier avec le chromosome homéologue.

## **CHAPITRE 2 : ISOLATION OF FIVE NEW MONOSOMIC ALIEN ADDITION LINES OF *Gossypium australe* IN *G. hirsutum* BY SSR AND GISH ANALYSES.**

### **1. INTRODUCTION**

Numerous studies focusing on the production and exploitation of diploid *Gossypium* species in *G. hirsutum* have been achieved (Hau 1981a ; Hau 1981b ; Rooney et al. 1991; Mergeai et al. 1993; Ahoton et al. 2003; Brubaker and Brown 2003; Becerra Lopez-lavalle and Brubaker 2007). However despite great efforts, no isolation of the complete set of a diploid *Gossypium* monosomic alien addition lines in *G. hirsutum* has been reported yet.

Because of their ease of generating numerous loci, AFLP markers have been used (Brubaker and Brown 2003 ; Becerra lopez-lavalle and Brubaker 2007) to screen the first and second generation aneuploids of  $2(G. hirsutum \times G. australe)$  and  $2(G. hirsutum \times G. sturtianum)$  hexaploids backcross progenies. These researches allowed the identification of the 13 chromosomes of both diploid species but did not address the question of the homoeological relationships between the chromosomes of the diploid and the allotetraploid species. Considering the numerous SSR markers that have been developed and mapped on the main cultivated species *G. hirsutum* (Lacape et al. 2003; Nguyen et al. 2004; Han et al. 2006), Ahoton et al. (2003) took advantage of their cross-species transportability to unravel their homoeological relationships with *G. australe* chromosomes. From a dozen individuals of the first backcross of the pentaploid [ $2(G. hirsutum \times G. australe) \times G. hirsutum$ ] selected on the basis of their morphology, they isolated six MAAL carrying *G. australe* chromosomes homoeologous to *G. hirsutum* chromosome pair c3-c17, c6-c25, c7-c16, c9-c23, c10-c20, c12-c26 and one disomic addition plant carrying the chromosomes homoeologous to c5-c19 and c13-c18. In the present study we investigate by SSR and GISH analyses the first backcross progeny of the pentaploid [ $2(G. hirsutum \times G. australe) \times G. hirsutum$ ] and a selected number of their selfed progeny in order to isolate the complete set of MAAL of *G. australe* in *G. hirsutum* and to explore the homoeological relationships that exist between the two species.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### **2.1 Plant material**

The pentaploid [2(*G. hirsutum* x *G. australe*) x *G. hirsutum*] obtained by Ahoton et al. (2003) was backcrossed as male parent to *G. hirsutum* cultivar Stam F originating from West Africa to produce BC<sub>1</sub> seeds which were sown during summer 2003 in the glasshouses of Gembloux Agricultural University. The backcrossing scheme was accomplished in the following manner: flowers were emasculated the afternoon before anthesis and the stigma was covered by a small plastic sachet ; pollen was applied to stigmas between 08:00 and 11:00 hour the following morning; to avoid boll shedding, a small piece of cotton wool containing a drop of the growth regulator solution (100 mg L<sup>-1</sup> naphthoxyacetic acid + 50 mg L<sup>-1</sup> gibberellic acid) recommended by Altman (1988) was applied on the ovary just after pollination.

All the BC<sub>1</sub> seeds came from one single pentaploid that has been multiplied by grafting on the *G. hirsutum* cultivar NC8 as root-stock.

The seven alien addition lines of *G. australe* in *G. hirsutum* previously isolated by Ahoton et al. (2003) were also included in the SSR analysis.

### **2.2 DNA extraction, PCR amplification and gel electrophoresis**

Total genomic DNA was extracted from fresh leaves placed in a 2.5 ml eppendorf tube frozen in liquid nitrogen and ground into powder with a mixer-mill (Qiagen). Ground leaf material was extracted in a 300 µl lysis buffer (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 1.5 M NaCl, 20 mM EDTA pH 8, 2% MATAB, 0.5 % Sodium Sulfite, 1% Polyethylene Glycol 6000), incubated 60 mn at 72°C, extracted with Chloroform Isoamyl Alcohol (24:1) and precipitated with isopropanol. PCR amplifications were performed following Nguyen et al. (2004) in 10 µl reaction mixture containing 25 ng of DNA, 0.2 mM dNTP, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH8.3), 0.2 µM of radiolabeled primer, 0.1 µM of unlabeled primer, 0.6 U *Taq* DNA polymerase. All PCR amplifications were performed using a PTC100 Thermal Cycler (MJ Research, USA), under the following conditions: an initial denaturation step at 94°C for 5 min, followed by 35 cycles of denaturation at 94°C for 30s, annealing temperature for 1 min, and extension at 72°C for 1 min. A final extension step of 8 min at 72°C was included. Radiolabeled PCR products were obtained by 5'-end labelling one of the primers with [<sup>33</sup>P]dATP using T4 polynucleotide kinase (Fermentas GmbH, Germany). After adding 20 µl of loading buffer (98% formamide, 10 mM EDTA, bromophenol blue, xylene cyanol) to the PCR reactions, the mixture was denaturated at 94°C for 3 min, and 5 µl of each sample was

loaded onto a 5% (w/v) polyacrylamide gel containing 7.5 M urea and electrophoresed in 1X TBE buffer at 55 W for 1 h 20 min to 1 h 50 min. After the run, gels were transferred onto Whatman 3MM paper, dried at 80°C for 20 min in a gel dryer, and exposed to X-Ray films (Kodak, X-Omat) for 2 to 3 days. Fragment sizes were determined by comparison with a [ $\gamma^{33}\text{P}$ ]dATP labelled 30-330 bp AFLP Ladder (Invitrogen, France) used as a size marker. The sorting out of SSR markers for search of polymorphism between *G. hirsutum* and *G. australe* was carried out with primers labeled with [ $\alpha^{33}\text{P}$ ]-dCTP.

### 2.3 SSR genotyping

From the website <http://www.cottonmarker.org>, 150 SSR markers mapped on the 26 chromosomes of *G. hirsutum* and evenly distributed on the whole genome have been chosen according to their position on three maps (namely Lacape, Zhang and Ulloa groups) also available in this website. Establishment of the 13 homoeologous chromosome pairs of *G. hirsutum* is based on Reinisch et al. (1994) completed by Wang et al. (2006). The 150 markers have been first tested on *G. hirsutum* and *G. australe* to detect polymorphism. Those showing unambiguous polymorphism were retained for further screening of the BC<sub>1</sub> generation. Adding the hexaploid to the two parents, an SSR locus was considered *G. australe*-specific when it yielded a PCR fragment simultaneously present in *G. australe* and in the bispecific hexaploid but absent from *G. hirsutum*. Two RFLP-derived SSR markers named UGA13 and UGA51 respectively drawn from the probes GateCD12 and pGH322 (Rong et al. 2004) and already known as producing polymorphic bands between *G. australe* and *G. hirsutum* (Lacape, unpublished data) have been both used. Except for these two markers, positions and sequences of all others SSR are available at the website address given above.

### 2.4 Genomic *in situ* hybridization analysis

To identify *G. australe* chromosomes in plants carrying *G. australe*-specific SSR loci, genomic *in situ* hybridisation (GISH) analysis has been realized at CIRAD (Montpellier, France) on selected individual plants already characterized with SSR markers. GISH has also been performed on plants carrying restructured chromosomes to determine if they were recombined or not. GISH was performed following D'Hont et al. (1995). Mitotic chromosomes were prepared from root tip cells. Total genomic DNA of *G. hirsutum* was labeled with digoxigenin-11-dUTP (Roche) and total genomic DNA of *G. australe* with

biotin-16-dUTP (Roche) by the nick translation method following the manufacturer instructions. Chromosomes were counterstained with DAPI and Slides were analyzed using a Leica epifluorescence microscope with filter blocks for DAPI, FITC and Texas red. Photographs were taken with a JVC KY-F58E (JVC, Japan) camera. Images were processed using the Microsoft Photo Editor software.

## **2.5 Statistical tests**

To assemble SSR loci markers in linkage groups from the BC<sub>1</sub> genotyping results, an hierarchical cluster analysis including all individuals carrying at least one marker was performed with the program SAS System (SAS institute). The cluster algorithm used was the average linkage based on the dissimilarities between markers defined as 1-j with j representing Jaccard coefficient. For detection of biased transmission of *G. australe* chromosomes  $\chi^2$  tests ( $\alpha = 0.05$ ) were applied.

## **3. RESULTS**

### **3.1 Production of the BC<sub>1</sub> derivatives**

An average of 1.43 seed per pollination was obtained by backcrossing the pentaploid [ $2(G. hirsutum \times G. australe) \times G. hirsutum$ ]. Among a total of 274 BC<sub>1</sub> seeds sown in May 2003 in the glasshouses of Gembloux Agricultural University, 21 (7%) did not germinate or gave rise to plantlets which died before flowering. The remaining 253 plants grew vigorously but five of them were self-sterile. The BC<sub>1</sub> plants presented a very wide variability in morphology and phenology. They were distributed in 44 distinct phenotypic classes. All the plants grouped in a class presented similar qualitative morphological (growth habit, color and shape of the leaves, color of the flowers, relative position of the stigma and the staminal column, size and shape of the bolls) and phenological traits (days to flowering and days to harvest). Among these 44 phenotypic classes, the one which presented the highest number of individuals (111 plants out of 253) showed a very high level of self-fertility and qualitative traits similar to those of *G. hirsutum*. Due to its phenotypic similarity with the upland cotton control cultivar, this first group was supposed to be composed of *G. hirsutum* euploid non-introgressed plants. A second group of 36 plants presented a phenotype similar to the already isolated MAAL designated G2I and carrying the *G. australe* chromosome homoeologous to the c10-c20 pair chromosome of *G. hirsutum* (Ahoton et al. 2003). None of the remaining 106 BC<sub>1</sub> plants was completely identical to the five other MAAL already isolated by Ahoton et al. (2003). We

selected among them 42 plants that were the most morphologically distant from *G. hirsutum* assuming that this divergence covered the whole existing diversity regarding the number and nature of additional alien chromosomes. The 42 plants analyzed comprised the 5 BC<sub>1</sub> sterile individuals.

### **3.2 SSR transferability and polymorphism**

All the 150 SSRs amplified *G. australe* DNA and 84 revealed clear polymorphism between *G. hirsutum* and *G. australe*. These 84 markers produced overall 89 polymorphic loci. Among these 84 markers, 81 produced a single polymorphic locus, 2 markers (BNL1227 and BNL3992) yielded two polymorphic loci and one marker (BNL3537) generated four loci.

### **3.3 BC<sub>1</sub> genotyping and establishment of the *G. australe* linkage groups**

Among the 89 polymorphic loci, two generated by the markers CIR047 and CIR110 were not carried by the hexaploid nor by any of the 42 BC<sub>1</sub> plants. Among the remaining 87 loci, 64 were clustered in 13 linkage groups of two to ten loci with a Root-mean-square ( $R^2$ ) equal to 1, meaning a complete co-segregation of the loci assembled together in the same linkage group. Thus, these linkage groups constituted a solid framework that could be assumed to represent the 13 chromosomes of *G. australe*. Twenty-one loci were then added to 8 of the 13 previous linkage groups with an  $R^2$  ranging from 0.999 to 0.976. These markers consistently completed the previously defined linkage groups. The marker BNL3436 was assigned to one linkage group with an  $R^2$  of 0.952 but a close observation of its segregation revealed that it was also co-segregating with another linkage group indicative of its duplication on two chromosomes. The marker CIR280 with an  $R^2$  of 0.691 was the only one that could not be reliably assigned to a linkage group. Segregation of the 87 polymorphic loci in the pentaploid progeny and in alien addition lines already isolated is presented in Table 2.

Among the markers yielding one polymorphic locus, only BNL3436 appeared to be duplicated (on c6 and c12) (Table 2). Segregation of the four loci generated by BNL3537 allowed to establish that the two loci yielding the 139 and 141bp fragments were mapped on c6 whereas the two other loci producing the 170 and 177bp fragments were mapped on c12. For the marker BNL3992 the locus yielding the 135bp fragment was located on c5 while the locus yielding the 315bp fragment was located on c4.

Assignment of all the polymorphic loci but one (CIR280) to the thirteen linkage groups assumed to correspond to the 13 chromosomes of *G. australe* is given in Table 3.



**Table 3 : Assignment of the polymorphic SSR loci to *G. australe* chromosomes**

<i>G. australe</i> chromosome	c1	c2	c3	c4	c5	c6	c7	c8	c9	c10	c11	c12	c13
<i>G. hirsutum</i> homologous pair chromosome	c1-c15	c2-c14	c3-c17	c4-c22	c5-c19	c6-c25	c7-c16	c8-c24	c9-c23	c10-c20	c11-c21	c12-c26	c13-c18
NAU2083	CIR202 (195)	MUSS073 (210)	BNL3992a (315)	NAU2014 (219)	BNL3359 (187)	BNL1694 (230)	BNL3257 (172)	BNL2847 (220)	CIR171 (218)	UGA51(157)	BNL1227a (170)	BNL2571 (240)	
CIR411 (188)	BNL3989 (245)	MUCS620 (237)	CIR253 (190)	BNL3992b (135)	BNL1047 (155)	BNL1604 (104)	CIR119 (274)	BNL1317 (195)	NAU1182(228)	CIR196 (210)	BNL1227b (172)	UGA13 (245)	
MUSS422	JESPR231	BNL3413 (112)	BNL3995 (170)	NAU2231(216)	<b>BNL3436 (190)</b>	NAU2186(144)	BNL3556 (134)	CIR372 (168)	BNL3563 (210)	NAU2110 (315)	BNL1679 (137)	MUSS140 (206)	
	BNL1897 (118)	BNL2443 (124)	NAU2121 (235)	BNL2448 (127)	BNL1440 (210)	NAU2432(151)	CIR289(221)	BNL4053 (188)	BNL119(130)	MUSS092 (303)	<b>BNL3537c (170)</b>		
	CIR228 (192)	CIR180	NAU2474 (178)		CIR407 (157)		NAU2439 (138)	BNL2590 (193)	CIR187 (290)	NAU1366	<b>BNL3537d (177)</b>		
	CIR210 (102)		BNL4030 (106)		BNL1061 (155)		BNL252(165)	BNL597 (188)		BNL1408 (176)	BNL1673 (185)		
	CIR292 (202)		CIR122 (138)		BNL3103 (180)		MUSS500(226)	MUSS22 (128)			BNL3599 (175)		
	BNL3259 (198)		CIR218 (185)		BNL2884(175)		BNL3084 (166)	BNL686 (140)			BNL3261 (190)		
			NAU2291 (214)		<b>BNL3537a (139)</b>						CIR272 (223)		
			NAU869 (180)		<b>BNL3537b (141)</b>						<b>BNL3436 (190)</b>		
			MUSB1093 (255)		BNL2569 (152)								
			NAU2235 (146)										
Total number of polymorphic loci	3	8	5	12	4	11	4	8	8	5	6	10	3

Note : Chromosome designation and homoeological relationships of *G. australe* chromosomes with tetraploid cotton chromosome pairs are based on the positions of loci on the published *G. hirsutum* maps (cf.<http://www.cottonmarmer.org>).



### **3.4 Composition of the BC<sub>1</sub> generation :**

Assuming that the 13 linkage groups corresponded to the 13 complete *G. australe* chromosomes, composition of the BC<sub>1</sub> generation is given in Table 4. The BC<sub>1</sub> generation overall contained 77 *G. australe* chromosomes with 45 complete chromosomes and 32 fragments (Table 5) distributed in 33 plants. Among the plants with at least one alien chromosome (complete or not) those with 2 chromosomes appeared to be the most frequent with 14 plants (33%) (Table 4). The second group with one alien chromosome included 9 individuals. The maximum number of alien chromosomes carried by a plant was eight. However it must be noted that plants with 4 to 8 chromosomes carried a great number of altered chromosomes. Nine BC<sub>1</sub> derivatives presented a divergent morphology from *G. hirsutum* but carried none of the marker tested. These plants probably harbor chromosome fragments that are not tightly linked with any of the markers used. In the analyzed BC<sub>1</sub> generation, the most frequent *G. australe* chromosome, carried by 14 plants, is c9. It is followed by c12 (13 plants). C1 and c13 were each carried by only one plant. The other chromosomes are present in a number of plants ranging from 3 to 9. The most frequent chromosome, c9, appeared also to be the most prone to be altered : it is incomplete in 71.5 % of the plants carrying it (Table 5).

### **3.5 Sterility in the BC<sub>1</sub> generation and assignment of morphological characteristics to *G. australe* chromosomes**

Five years after sowing five BC<sub>1</sub> plants still showed complete self-sterility. Three of these plants (#20, #31 and #21) were those carrying the maximum chromosome numbers (respectively 5, 7 and 8 chromosomes), the fourth was a trisomic addition plant (#5) and the last a disomic addition plant (#41). These latter two plants shared the common characteristic of carrying c11. All the fertile plants carrying *G. australe* c6 produced brown lint and all the plants carrying the complete c7 showed pink flower. This suggests that c6 and c7 respectively carry gene(s) for brown lint and pink flower.

**Table 4 : Composition of the BC<sub>1</sub> generation**

Number of supernumerary chromosomes	Number of plants (%)
0	9 (21.4)
1	8 (19)
2	14 (33.3)
3	7 (16.7)
4	1 (2.4)
5	1 (2.4)
7	1 (2.4)
8	1 (2.4)
Total	42 (100)

**Table 5 : Frequency of the different *G. australe* chromosomes in the BC<sub>1</sub> generation.**

<i>G. australe</i> chromosome	Total number of chromosomes	Number of complete chromosomes (%)	Number of chromosome fragments* (%)
c1	1	1 (100)	0 (0)
c2	4	3 (75)	1 (25)
c3	4	2 (50)	2 (50)
c4	3	2 (66.6)	1 (33)
c5	4	4 (100)	0 (0)
c6	8	7 (87.5)	1 (12.5)
c7	5	2 (40)	3 (60)
c8	7	2 (28.5)	5 (71.5)
c9	14	4 (28.5)	10 (71.5)
c10	9	7 (77.8)	2 (22.2)
c11	4	3 (75)	1 (25)
c12	13	7 (53.8)	6 (46.2)
c13	1	1 (100)	0 (0)
Total	77	45 (58.5)	32 (41.5)

**Note :** \* Assuming that each linkage group defined a complete chromosome, a chromosome fragment is defined as a linkage group lacking at least one SSR marker without taking into account the marker CIR280.

### 3.6 Alien chromosome transmission in BC<sub>1</sub>S<sub>1</sub> generation and isolation of new MAAL

Results of the BC<sub>1</sub> genotyping revealed that none of the seven *G. australe* chromosomes remaining to be isolated was in a monosomic addition configuration. The four plants with only one complete supernumerary chromosome were listed among the already isolated MAAL (Table 2). However it appeared that the chromosomes c2, c4, c5 and c8, could be respectively isolated from the disomic plants #14, #24, #7 and #11 (Table 2). Consequently the self-progeny of these plants were sown in summer 2007 in the glasshouses of CIRAD in Montpellier for SSR genotyping and GISH analysis. Since the only plant carrying c13 (#31) showed complete self-sterility, we choose to isolate this chromosome from the disomic alien addition line G2XII of Ahoton et al. (2003) (Table 2). The *G. australe* c11 could be isolated from the plant #5 or #41 and c1 from #21 but all these three plants were completely self-sterile. The results of the genotyping of the four disomic BC<sub>1</sub> plants self-progeny (#14, #24, #7 and #11) and of the disomic alien addition line G2XII are presented in Tables 6-10.

These results confirmed the validity of the established linkage groups. Markers already assembled in a linkage group always co-segregated together. In the most frequent cases, alien chromosomes were transmitted unmodified, except in some plants containing altered chromosomes. Two plants (N°4 and N°30) out of the 31 derivatives of plant #14 (Table 7) and three plants (N°17, N°23 and N°27) out of the 46 derivatives of plant #24 (Table 6) carried restructured chromosomes. In the progeny of #11 the incomplete c9 and c8 were transmitted unaltered (Table 8).

Co-segregation of the marker CIR280 with *G. australe* c5 (Table 9) allowed to eventually assign it to this chromosome. None of the derivatives of G2XII carried c5 but three plants out of 11 carried c13 (Table 10).

Transmission frequency of the alien chromosomes in the self-progeny of the 5 disomic addition lines #14, #24, #7, #11 and G2XII significantly differed from the 3:1 expected ratio. Due to the selfing, this bias must have been amplified by the fact that in the genus *Gossypium*, disomic addition plants carrying the same chromosome in duplicate are extremely counter-selected (Hau 1981a). If disomic addition plants carrying the same alien chromosome in duplicate are not viable, the proportion of plants carrying the markers of a specific alien chromosome in the self-progeny of an addition line should be 2:1. This hypothesis was verified only for the chromosomes c2 in #14 self-progeny ( $\chi^2 = 3.16$ ;  $p = 0.075$ ) and c9 in #11 self-progeny ( $\chi^2 = 3.75$ ;  $p = 0.052$ ). Among the 6 complete *G. australe* chromosomes (c2, c4,

c5, c6, c8, c9) carried by the 5 BC<sub>1</sub> disomic addition lines analyzed, c2 proved to be the best transmitted alien chromosome.

Differences observed in the transmission frequency of the chromosome c9 between #11 and #14 disomic addition lines can be attributed to the fact that this alien chromosome was not complete in #11 where it lacked four SSR markers out of eight.

### **3.7 Assignment of the marker CIR280 and significance of its segregation pattern in the BC<sub>1</sub> generation and #24 self-progeny**

Analysis of the pentaploid progeny didn't allow to assign the marker CIR280 to any of the *G. australe* chromosome. However its close association with c5 (CIR280 is present in 4 of the 5 plants carrying c5) hinted at the possibility that it was carried by this chromosome. Its segregation in the self-progeny of #7 confirmed that this marker was carried by c5 (Table 9). Its high frequency in the BC<sub>1</sub> generation (17 plants out of 42) suggests that this marker represents a chromosome fragment preferentially transmitted or recombined in the *G. hirsutum* background genome. The chi-square test ( $\chi^2 = 1,52$  ;  $p = 0,217$ ) is in agreement with an expected transmission ratio of 1:2 indicative of a recombination that would have taken place in the hexaploid.

The hypothesis that segregation of CIR280 in the pentaploid progeny is an indication of the introgression of a *G. australe* fragment is reinforced when its segregation in #24 self-progeny is considered (Table 6). Thirty-eight plants out of 46 (82 %) carry the marker CIR280. This number is equivalent to the expected 3:4 ratio in the transmission frequency ( $\chi^2 = 1.42$ ;  $p = 0.75$ ) if #24 is heterozygous.

**Table 6 : Segregation of SSR markers in #24 self-progeny**

		#24 self-Progeny																																															
<i>G. australe</i> chromosome	Markers	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	<u>17</u>	18	19	20	21	22	<u>23</u>	24	25	26	<u>27</u>	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46		
c4	BNL3995		+	+						+				+	+					+				+						+	+					+				+							+		
	CIR253		+	+						+				+	+					+				+						+	+					+				+								+	
	MUSB1093		+	+						+				+	+					+				+						+	+					+				+								+	
	CIR200		+	+						+				+	+					+				+						+	+					+				+								+	
	BNL4030		+	+						+				+	+					+				+						+	+					+				+								+	
	NAU2121		+	+						+				+	+					+				+						+	+					+				+								+	
	NAU869		+	+						+				+	+					+				+						+	+					+				+								+	
	NAU2474		+	+						+				+	+					+				+						+	+					+				+								+	
	BNL3992 -2		+	+						+				+	+					+				+						+	+					+				+								+	
	CIR218		+	+						+				+	+					+				+						+	+					+				+								+	
	NAU2291		+	+						+				+	+					+				+						+	+					+				+									+
	NAU2235		+	+						+				+	+					+				+						+	+					+				+									+
	CIR122		+	+						+				+	+					+				+						+	+					+				+									+
	c6	BNL3359													+	+							+	+																	+	+	+						
BNL1047														+	+							+	+																	+	+	+							
BNL3103														+	+							+	+																	+	+	+							
CIR407														+	+							+	+																	+	+	+							
BNL1061														+	+							+	+																	+	+	+							
BNL3537														+	+							+	+																	+	+	+							
BNL2884														+	+							+	+																	+	+	+							
BNL3436														+	+							+	+																	+	+	+							
BNL2569														+	+							+	+																	+	+	+							
BNL1440														+	+							+	+																	+	+	+							
CIR280		+			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

Note: Underlined individuals indicate those containing altered *G. australe* chromosome

**Table 7 : Segregation of SSR markers in #14 self-progeny**

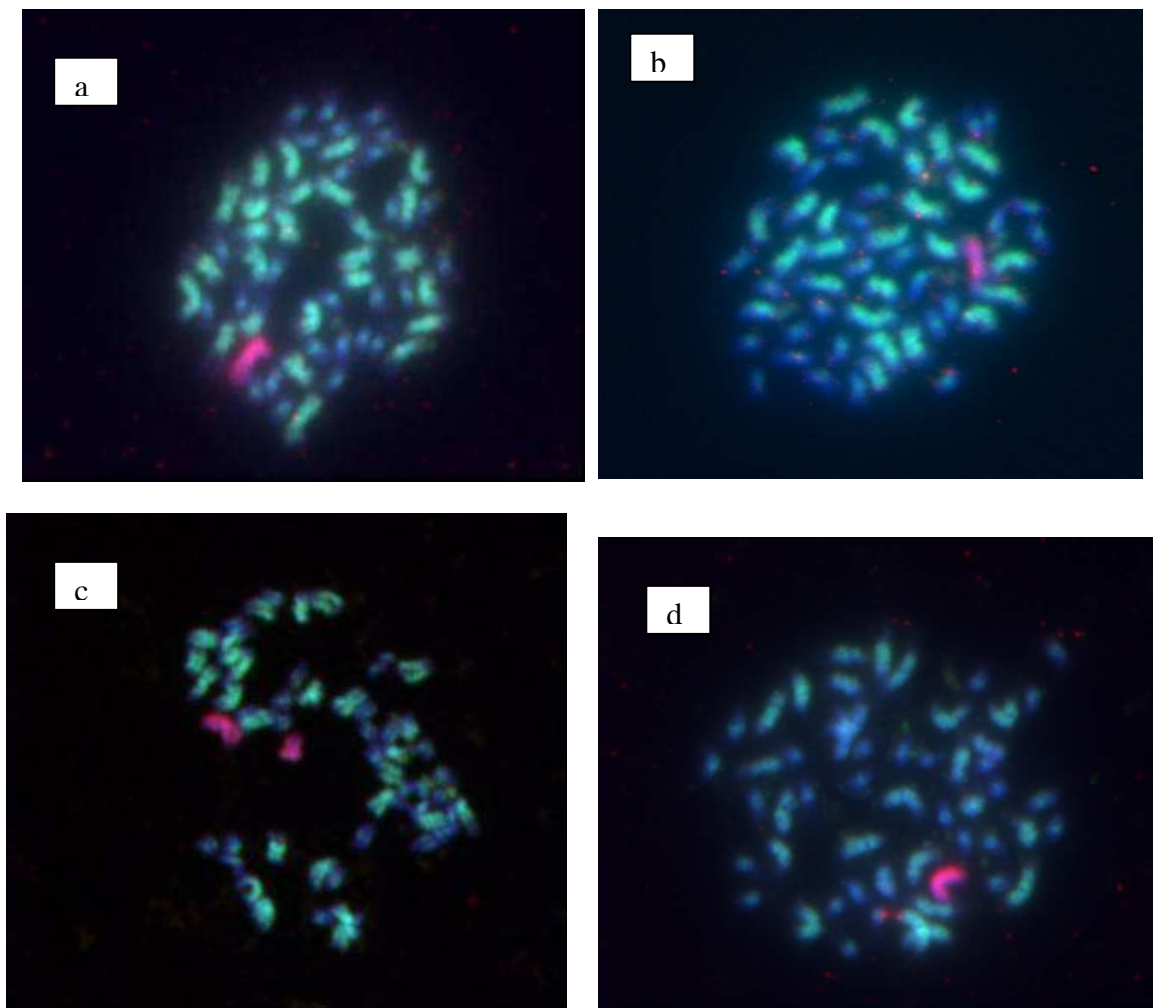
		#14 self-Progeny																																														
<i>G. australe</i> chromosome	Markers	1	2	3	<u>4</u>	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	<u>30</u>	31	32															
C9	BNL2847		+			+	+	+				+	+						+		+																											
	BNL597		+			+	+	+				+	+							+		+																										
	BNL2590		+			+	+	+				+	+							+		+																										
	CIR019		+			+	+	+				+	+							+		+																										
	BNL3031		+			+	+	+				+	+							+		+																										
	CIR372		+			+	+	+				+	+							+		+																										
	BNL1317		+			+	+	+				+	+							+		+																										
	BNL4053		+			+	+	+				+	+							+		+																										
	CIR282		+			+	+	+				+	+							+		+																										
C2	CIR228		+	+	+					+	+			+	+											+	+	+	+	+	+																	
	BNL3259		+	+	+					+	+			+	+											+	+	+	+	+	+																	
	CIR292		+	+	+					+	+			+	+											+	+	+	+	+	+																	
	BNL3989		+	+	+					+	+			+	+											+	+	+	+	+	+																	
	CIR202		+	+	+					+	+			+	+											+	+	+	+	+	+																	
	JESPR231		+	+	+					+	+			+	+											+	+	+	+	+	+																	
	CIR210		+	+	+					+	+			+	+											+	+	+	+	+	+																	
	BNL1897		+	+	+					+	+			+	+											+	+	+	+	+	+																	

Note: Underlined individuals indicate those containing altered *G. australe* chromosome



### 3.8 Genomic *in situ* hybridization

GISH analysis was performed on the self-progeny of the disomic addition plants #14, #24, #7, #11 and G2XII carrying markers of only one linkage group (Figure 3). Correspondence of the five linkage groups 2, 4, 5, 8, 13 with individual *G. australe* chromosomes was established. The analyzed derivatives of #24 plant carrying only the marker CIR280 showed no *G. australe* segment, recombined or not.



**Figure 3 : Identification of *G. australe* chromosomes in *G. hirsutum* background.**

(a) Metaphase of #24-2 with the *G. australe* chromosome c4. (b) Metaphase of #14-3 with the *G. australe* chromosome c2. (c) Metaphase of #11-4 with a complete *G. australe* chromosome c8 and a chromosome fragment of c9. (d) Metaphase of #14-18 with the *G. australe* chromosome c9.

### **3.9 Conservation of the synteny between *G. hirsutum* and *G. australe* chromosomes**

For the nine chromosomes of *G. australe* homoeologous to the *G. hirsutum* chromosome pairs c1-c15, c5-c19, c6-c25, c7-c16, c8-c24, c10-c20, c11-c21, c12-c26 and c13-c18, the synteny is conserved between the two *Gossypium* species (Table 2). However for the *G. australe* chromosome homoeologous to c2-c14, three markers (BNL1897, CIR210, CIR292) are mapped on *G. hirsutum* c14 or/and c2, two markers (CIR202 and BNL3989) on c3, whereas two others (CIR228 and BNL3259) are duplicated on c3 and c14. If these last two markers already duplicated on *G. hirsutum* on two non-homoeological chromosomes are excluded, 40 % (2/5) of the characteristic markers of *G. australe* c2 were expected to be positioned on *G. australe* c3.

For the *G. australe* chromosome homoeologous to c3-c17, two markers (CIR180 and BNL2443) are mapped on *G. hirsutum* c17 and/or c3, two markers (MUSS073 and MUCS620) on c2 and one marker (BNL3413) on c2 and c17, two non-homoeological chromosomes. If this marker, already-duplicated on *G. hirsutum*, is excluded, 50% (2/4) of the markers assigned to the *G. australe* c3 do not conserve the synteny with the *G. hirsutum* homoeological chromosomes and were expected to be positioned on the *G. australe* c2.

For the *G. australe* chromosome homoeologous to c4-c22, seven markers (NAU2235, BNL4030, CIR122, CIR218, NAU2291, NAU869 and MUSB1093) are assigned to the chromosome homoeologous to c4-c22, four markers (CIR253, NAU2121, BNL3995, BNL3992) to c5 and one marker (NAU2474) to c1. So if this latter is excluded, 36% (4/11) of the markers assigned to *G. australe* c4 were expected to be mapped on *G. australe* c5.

## **4. DISCUSSION**

### **4.1 Transferability of SSR markers**

Transferability of SSR markers is based on the conservation in related species of the regions flanking the microsatellite sequences. The 100 % rate of cross-species amplification of *G. hirsutum* and *G. arboreum* derived microsatellite in *G. australe* showed the great conservation of the priming sequences between the A and D-genome of the two allotetraploid's diploid progenitor and the G-genome of the Australian diploid species despite their evolutionary divergence that is reckoned to date back 6-11 million years ago. Altaf-Khan et al. (2006) analyzing 255 primers derived from *G. hirsutum* on two *Gossypium* G-genome species (*G. australe* and *G. nelsonii*) and on the two putative diploid ancestors of the tetraploid found out that 19 % of the primers did not amplify the diploid species. But in the same time they found



that 17 % of these markers did not amplify their *G. hirsutum* DNA either. The non-amplification of these SSR should be thus less due to non-conservation of the priming regions than to the conditions of the PCR consisting of a touchdown method with an annealing temperature of 65°C during the first cycles. The high cross-species amplification in the *Gossypium* genus is confirmed by the results of Guo et al. (2006) who transferred *G. arboreum*-derived EST-SSR to 25 accessions of 7 genomes and found that 96,5 % primers amplified the tested species. The good transferability of SSR is also supported by results obtained in other genera. Guyomarc'h et al. (2002) reported that 92 % SSR markers developed from *Aegilops tauschii* amplified the bread wheat *Triticum aestivum*.

Among the 150 markers sorted out 84 (56 %) showed at least one *G. australe*-specific DNA fragment. Altaf-Khan et al. (2006) found out that 68 % (85/255) of the SSR that amplified the diploid species were polymorphic.

SSR polymorphism comes from variations in the flanking regions by base substitutions, insertion or deletion mutations or by differences in the length of repeat sequences. In the transfer of *G. arboreum* EST-derived SSR from *G. arboreum* to other species of the genus, differences were attributed mainly to differences in repeat type and length in the microsatellite regions (Guo et al. 2006).

#### **4.2 Frequency and fidelity of alien chromosome transmission**

Because all the BC<sub>1</sub> derivatives haven't been analyzed, it is difficult to know to what extent the results obtained with the selected plants can be referred to the whole BC<sub>1</sub> generation.

Nevertheless if the non-analyzed 36 BC<sub>1</sub> derivatives with the G2I phenotype (Ahoton et al. 2003) were added to the 9 plants among the 42 analyzed BC<sub>1</sub> carrying c10, then this chromosome would appear to be the best transmitted alien chromosome.

Considering the entire BC<sub>1</sub> generation, the rate of transmission of chromosome c10 equals 17.7 % (45/253) which is very far from the 100 % transmission rate obtained by Brubaker and Brown (2003) for their best transmitted *G. australe* chromosome (designated Aust-M). Ahoton et al. (2003) observed a lower rate (7%) for the transmission of *G. australe* c10 assessed in the BC<sub>1</sub> progeny of the *G. hirsutum* x *G. australe* pentaploid.

In the genus *Gossypium* the transmission frequencies of alien chromosomes in the progeny of pentaploid interspecific hybrids seem to be very irregular and to vary according to the chromosome. Becerra Lopez-Lavalle and Brubaker (2007) found that while the *G. australe* chromosome Aust-M was fully transmitted to all the *G. hirsutum* x *G. australe* BC<sub>1</sub> plants, the *G. sturtianum* chromosome Sturt-A was completely lost in the *G. hirsutum* x *G. sturtianum*

BC<sub>1</sub> progeny. In the BC<sub>1</sub> plants carrying *G. sturtianum* chromosomes they found a transmission frequency ranging from 0 % to 91 % and in the BC<sub>1</sub> population carrying *G. australe* chromosomes the transmission frequency varied from 11 to 100%.

Overall, the aneuploid BC<sub>1</sub> generation analyzed here contained a relatively low number of chromosomes compared to the results obtained by Brubaker and Brown (2003) and by Becerra Lopez-Lavalle and Brubaker (2007). In these latter studies, 18 *G. hirsutum* x *G. australe* BC<sub>1</sub> plants corresponding to multiple alien addition lines carried 3 to 8 (average 6.1) supernumerary chromosomes and 11 *G. hirsutum* x *G. sturtianum* BC<sub>1</sub> carried 4 to 9 (average 6.5). These differences can be explained by the fact that the BC<sub>1</sub> generation analyzed here was generated by backcrossing the pentaploid as male parent to *G. hirsutum* whereas the multiple alien addition lines produced by Brubaker and Brown (2003) and by Becerra Lopez-Lavalle and Brubaker (2007) were produced by backcrossing the pentaploid as female parent (Brubaker et al. 1999). This observation confirms the well established fact that in the genus *Gossypium* female gametes can harbor more additional chromosomes than male gametes (Beasley 1940).

Thirty-three BC<sub>1</sub> plants out of the 42 analyzed individuals contained overall 77 *G. australe* chromosomes among which 32 were restructured (41.5%). This number is much higher than that reported by Brubaker and Brown (2003) who found that 18 BC<sub>1</sub> plants inherited 108 *G. australe* chromosomes which were all transmitted intact except for 5 chromosomes (4.6%). To explain these differences, it must be remembered that not all the BC<sub>1</sub> generation was analyzed but only those showing an altered-morphology supposed to indicate *G. australe* chromatin presence. When the whole BC<sub>1</sub> generation is considered, and not only the analyzed plants, the rate of restructured chromosome is reduced to 12.25 % (31/253).

The *G. australe* specific loci markers CIR047 and CIR110 deficient in the hexaploid as well as in all the pentaploid progeny indicate that the *G. australe* chromosome homoelogenous to c1-c15 was not complete in the only individual that contained it (#21). If the absence of this marker is not due to a polymorphism between the *G. australe* accession that was used to create the hexaploid and the one that was used in our study, then it should be considered that this *G. australe* chromosome underwent a deletion followed by an elimination. The elimination of the deleted fragment likely occurred in the triploid generation before the colchicine-doubling since the hexaploid is fully fertile and shows no sign of genetic instability. This deletion may explain the low frequency of the remaining fragment in the BC<sub>1</sub> generation.

Disregarding the occurrence of disomic addition plants with the same chromosome in duplicate, a significant difference was found between the two disomic addition lines #14 and #11 regarding the transmission frequency of the alien chromosome c9. This difference may be explained by an interference of the second alien chromosome (c2 in #14 and c8 in #11). But most likely it was the size reduction caused by the loss of a fragment that influenced favorably the transmission of the broken c9 chromosome in the plant #11self-progeny. The fact that the remaining part of the chromosome was stabilized and continues to be transmitted to the progeny let us suppose that it might be a centric fragment.

#### **4.3 Sterility caused by a high number of supernumerary chromosomes and putative genes of sterility**

The three BC1 plants that carried more than four chromosomes (#20, #21 and #31) were completely self-sterile. The BC1 plant with four chromosomes and some plants carrying three chromosomes were fertile but took sometimes up to 3 years to produce their first seeds. These observations corroborate the tight link that exists between sterility and number of supernumerary chromosomes (Louant et al. 1977). However it must be noted that sterility is not associated only with the number of supernumerary chromosomes. The only disomic (#41) and trisomic addition plants (#5) that showed complete self-sterility had the particularity to carry *G. australe* c11. Thus this chromosome seems to carry genes causing sterility. The fact that sterility of aneuploid is not only correlated with the number of additional chromosomes but can also be chromosome-specific was demonstrated in alien addition lines of barley in wheat. The alien addition line carrying the barley chromosome 5 (1H) could not be generated due to the presence of one or more genes causing sterility when present in wheat (Islam et al. 1981).

#### **4.4 Statistical evidences that a recombination had occurred in the hexaploid**

CIR280 co-segregating with c5 in #7 self-progeny has been reliably assigned to this chromosome. His apparently erratic segregation in the BC1 derivatives (that had first prevented its assignment) and in #24 self-progeny is statistically in accordance with the hypothesis of an allosyndetic recombination that would have occurred in the hexaploid. It is known that in the course of MAAL production, intergenomic exchanges may occur at the hexaploid or pentaploid stages at a rate depending on the pairing affinities between the two genomes of the bispecific hybrid (Beasley 1942 ; Brown and Menzel 1952 ; Mergeai 2006). In the present case this heterogenetic recombination cannot have occurred in the pentaploid,

because in this case, due to the low frequency of allosyndetic recombinations, it would have been unlikely to observe such a high transmission frequency of the marker in the BC<sub>1</sub> generation.

In the analysis of 11 BC<sub>1</sub> multiple addition lines of *G. sturtianum* in *G. hirsutum*, Becerra Lopez-Lavalle and Brubaker (2007) obtained a linkage group designated Sturt-B that could not be linked to any of the 13 AFLP-linkage groups assumed to correspond to the 13 chromosomes of *G. sturtianum* and hypothesized that this linkage group represented an introgressed segment. Hexaploids involving Australian diploid species show usually regular pairing but sometimes some irregular pairings are observed. Beasley (1942) indicated that with the hexaploid involving *G. sturtianum* 39 pairs of chromosomes are regularly observed, although some are usually involved in tetravalents. Brown and Menzel (1952) however found these associations so rare that they suggested to consider them as virtually negligible and predicted this stage to be of no interest for introgression. On the contrary Louant et al. (1977) argued that the hexaploid, being the only balanced, euploid, and fertile stage in the scheme of MAAL production, instead of being considered useless for introgression and only necessary for restoring the fertility, should be considered like an important stage for intergenomic exchanges and predicted that selfing for several generations of the hexaploid would increase recombination potential. Studying chromosome pairing in selfed hexaploid involving *G. sturtianum* during three generations, Da silva et al. (1975) found out that chromosome pairing in the first generation hexaploid was almost wholly homogenetic. This regular pairing did not significantly differ from that observed in the second and third generation of selfing. Like Brown and Menzel (1952) they concluded on the difficulty to use the hexaploid as a mean to transfer conventionally genetic material from *G. sturtianum* to *G. hirsutum*.

Though there is no general agreement on the importance of allosyndetic recombinations in the hexaploid stage and its possible enhancement with the increase of selfing-generations, our results confirm that introgression can take place in the *G. hirsutum* x *G. australe* hexaploid.

Introgression between the background genome and the alien chromosome(s) can occur by recombination or by centromeric or non-centromeric breakage and reunion. Becerra Lopez-Lavalle and Brubaker (2007) discussed the relationship between size of introgressed segment and the probable mechanism involved. For these authors large segments are expected to be introgressed when chromosomes experience chiasmata during meiosis while small introgressed segments are to be awaited when introgression results from repaired chromosome breakage after homoeologous interactions. The fact that the fragment carrying the marker CIR280 has not been detected by GISH indicates that it is likely of a small size

and highlights one of the limit of this technique which is the difficulty of detecting introgression of small chromosome fragments (Pedersen and Linde-Laursen 1995). Resolution of GISH depends on cytological targets (interphase nuclei, metaphase chromosomes, meiotic pachytene chromosomes, extended DNA fibers etc.) among which, mitotic metaphase chromosomes, the most condensed chromosomes, have the lowest resolving power (Jiang and Gill 2006). To our knowledge this resolving power has not yet been studied in the genus *Gossypium* but in the genus *Hordeum* for example, this distance has been estimated to a minimum of 5-10 Mb (Pedersen and Linde-Laursen 1995).

#### **4.5 Some evidences in favor of a polyploidization predating diploid *Gossypium* species' divergence**

The polyploidization that resulted in the formation of the New World allotetraploid *Gossypium* species from the merger of an Old World A-genome diploid species and a New World D-genome species 1-2 million years ago is well established (Jiang et al. 1998; Wendel and Cronn 2003). Based on cytogenetic observations and comparative mapping, hypotheses that *Gossypium* diploid species too originated from a more ancient polyploidization have been gathered (Reinisch et al. 1994 ; Rong et al. 2004). This paleopolyploidization is estimated to have taken place 13-15 million years ago from the combination of two species of  $2n=2x=12$  and/or  $2n=2x=14$  chromosomes (Reinisch et al. 1994 ; Adams and Wendel 2005). The fact that two markers BNL3436 and BNL3537 respectively mapped on the *G. hirsutum* homeologous chromosome pairs c6-c25 and c12-c26 were each duplicated on the same two *G. australe* chromosomes c6 and c12 support this hypothesis.

#### **4.6 Some evidences of genomic rearrangements occurred in the allotetraploid cotton**

Onset of polyploidy is known to be often followed by genomic changes (elimination of duplicated genes, sequence homogenization), epigenetic changes (massive gene silencing by DNA methylation) and rapid genomic rearrangements (exchanges between genomes) (Blanc and Wolfe 2004; Adams and Wendel 2005; Devos 2005; Moore and Purugganan 2005). From chromosome pairing studies hybrids involving the AD allotetraploid and the A-genome diploid species (Beasley 1942; Menzel and brown 1954), it has already been shown that the A-genome of the allotetraploid species ( $A_t$ ) differed from the two closest living relatives of its diploid A-genome progenitor (A) by two to three translocations. Based on comparative genetic linkage mapping, recent investigations demonstrated that A and  $A_t$  genome differed

by 7 inversions and two reciprocal translocations between c2 and c3 on the one hand and between c4 and c5 on the other hand (Brubaker et al. 1999b ; Rong et al. 2004 ; Desai et al. 2006). In the present study the non-conservation of the synteny between markers of *G. australe* c2, c3 and c4 and their respective *G. hirsutum* homoelogs contribute to reinforce the give evidence that the *Gossypium australe* G-genome differed from A<sub>t</sub> by a translocation between c2 and c3 and by a translocation of c5 to c4. The low number of SSR markers assigned to *G. australe* c5 could explain the fact that translocation of c4 to c5 was not brought to the fore.

# CHAPITRE 3 : ALIEN CHROMOSOME TRANSMISSION AND SOMATIC ELIMINATION IN MONOSOMIC ADDITION LINES OF *Gossypium australe* IN *Gossypium hirsutum*

## 1. INTRODUCTION

The efficiency of using monosomic alien addition lines (MAALs) to introgress agronomical traits of interest carried by wild diploid *Gossypium* species into the main cultivated cotton species depends on the opportunities of confronting the alien chromosome and the recipient background genome at each generation (*i.e* the transmission frequency of the alien chromosome) and on the occurrence of translocations or homoeologous recombinations. The selfed-progeny of five MAALs of *G. australe* in *G. hirsutum* was screened with SSR markers to determine the transmission frequency of the alien chromosome and monitor its integrity. With a species like wheat that possesses a meiotic pairing genetic system (Chen et al. 1994 ; Jiang et al. 1994), chromosomes can be engineered to induce homoeologous recombination and minimize the linkage drag. With the genus *Gossypium*, which lacks such a system, the only available solution to induce heterogenetic associations has been to proceed by repeated selfing in order to multiply meiotic events confronting the donor chromosome and the recipient genome (Baudoin 1973, Stewart 1995; Mergeai 2006). In this perspective, identification of the rare recovered recombinants, with a high-throughput procedure is of a major importance. But until recently detection of the recombinants has been based on the time-consuming and painstaking classical cytogenetic techniques combined with analysis of the plant morphology (Rooney and Stelly 1991). Molecular markers such as SSR, owing to their PCR-based technique, wide distribution in the genome and cost-effectiveness are very useful in overcoming these impediments.

The objectives of this study were to investigate with SSR markers the transmission frequency and integrity of the alien supernumerary chromosome carried by five of the eleven isolated MAALs.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### **2.1 Plant Materials**

The selfed-progeny of 5 MAALs of *G. australe* in *G. hirsutum* was grown in pots in the tropical greenhouses of Gembloux Agricultural University (GAU). Three MAALs, out of the five, were isolated by Ahoton et al. (2003) and carried the *G. australe* chromosomes homoeologous to the *G. hirsutum* chromosome pairs c10-c20, c6-c25 and c12-c26. The two remaining MAALs carried the *G. australe* chromosomes homoeologous to the *G. hirsutum* chromosome pairs c2-c14 and c3-c17. In this paper the five MAALs will be identified by the combination of the prefix MAL-G<sub>2</sub> (for Monosomic Addition Line of an alien chromosome of the G<sub>2</sub>-genome species) with the lowest number of the *G. hirsutum* chromosome to which the *G. australe* chromosome is homoeologous (e.g the MAAL carrying the *G. australe* chromosome homoeologous to c10-c20 will be designated MAL-G<sub>2</sub>-10). All the MAALs have been produced according to the scheme described in Figure 1. Each of them was characterized by a more or less marked altered-morphology when compared to *G. hirsutum*. MAL-G<sub>2</sub>-6 and MAL-G<sub>2</sub>-10 were particularly easily identified. The alien chromosome carried by MAL-G<sub>2</sub>-6 turned into brown the color of the fiber. MAL-G<sub>2</sub>-10 plants presented a bushy growth habit, small leaves and bolls (Ahoton et al. 2003). The selfed-progeny of each MAL analyzed came from a unique plant. Self-pollination was forced by clipping the flower bud at candle stage. Sixteen to 98 derivatives were analysed for each MAL.

### **2.2 SSR genotyping**

The selfed-progeny of each of the 5 MAALs was analyzed with SSR markers specific to the involved *G. australe* chromosome. DNA extraction was carried out from sampled leaves of 30-day-old seedlings according to Benbouza et al. (2006a). PCR amplification, gel electrophoresis and silver staining detection were performed according to Benbouza et al. (2006b). The SSR linkage groups characterizing each of the *G. australe* chromosome were established from the progeny analysis of the [2(*G. hirsutum* x *G. australe*)x *G. hirsutum*] pentaploid and are given in Table 11. All these markers are available on the website <http://www.cottonmarker.org>.

### **2.3 Statistical tests**

$\chi^2$  tests were performed to detect bias from the expected ratio in the alien chromosome transmission.



**Tableau 11 : SSR linkage group characterizing each of the *G. australe* chromosome**

MAAL	MAL-G <sub>2</sub> -2	MAL-G <sub>2</sub> -3	MAL-G <sub>2</sub> -6	MAL-G <sub>2</sub> -10	MAL-G <sub>2</sub> -12
	CIR202 (195)	MUSS073 (210)	BNL3436_(190)	NAU1182	BNL1679 (137)
	BNL3989 (245)	MUCS620 (237)	BNL3359 (187)	CIR187 (290)	BNL3537-2 (170)
	JESPR231	CIR180	BNL2569 (152)	CIR171 (218)	BNL1673(185)
	BNL1897 (118)	BNL2443 (124)	BNL3103 (180)	BNL3563 (210)	BNL3599 (175)
	CIR228 (192)	BNL3413 (112)	BNL3594	BNL119	BNL3261(190)
	CIR210 (102)		CIR407 (157)		
	CIR292 (202)		BNL2884 (175)		
	BNL3259( 198)				
Total	8	5	7	5	5

**Note :** Number in parenthesis gives the *G. australe*-specific fragment size in base pairs (cf. chapter 2).

### **3. RESULTS**

#### **3.1 Alien chromosome transmission in the five self-pollinated MAALs**

Taking into account all plants with a *G. australe* chromosome, whether altered or not, the alien chromosome transmission frequency of all the MALs but MAL-G<sub>2</sub>-2 ( $\chi^2 = 0.6$ ;  $p = 0.438$ ) were significantly different from the 3:1 expected ratio. But while MAL-G<sub>2</sub>-10 showed exclusive preferential transmission of the supernumerary chromosome, MAL-G<sub>2</sub>-3, MAL-G<sub>2</sub>-6 and MAL-G<sub>2</sub>-12 presented an alien chromosome transmission frequency lower than the expected ratio (Table 12). Considering that each SSR linkage group defines a complete *G. australe* chromosome, only seventeen plants of MAL-G<sub>2</sub>-2 (38%) and two plants of MAL-G<sub>2</sub>-6 (2%) carried incomplete *G. australe* chromosomes (Table 12). The altered chromosomes of MAL-G<sub>2</sub>-2 appeared strikingly complementary and could be distinguished in two groups depending on whether the *G. australe* chromosome carried or not the marker JESPR231 (Table 13). Eight plants carried the marker and exactly the same number of plants lacked it. This observation suggests that this *G. australe* chromosome has a hotspot of recombination or of breakage in a region near this marker. Constitution of the two altered plants of MAL-G<sub>2</sub>-6 is given in Table 14.

**Table 12 : Transmission frequency and integrity of the alien chromosome in the five self-pollinated MALs**

	MAL-G <sub>2</sub> -2	MAL-G <sub>2</sub> -3	MAL-G <sub>2</sub> -6	MAL-G <sub>2</sub> -10	MAL-G <sub>2</sub> -12
Number of plants without alien chromosome	9 (20)	19 (51)	52 (53)	0 (0)	57 (66)
Number of plants with the complete alien chromosome	19 (42)	18 (49)	45 (45)	16 (100)	30 (34)
Number of plants with an altered alien chromosome	17 (38)	0 (0)	2 (2)	0 (0)	0 (0)
Total number of plants	45	37	98	16	87

Note : Number in parenthesis indicates the percentage

**Table 13 : Constitution of MAL-G<sub>2</sub>-2 self-progeny carrying altered *G. australe* chromosome**

	MAL-G <sub>2</sub> -2 derivatives																
	2	7	9	10	13	14	20	23	31	33	35	36	37	39	40	42	45
BNL1897	+			+			+		+	+		+		+	+		
BNL3259	+	+		+			+		+	+		+		+	+		+
CIR228	+	+		+			+		+	+		+		+	+		+
CIR210	+	+		+			+		+	+	+	+		+	+		+
CIR202	+			+			+		+	+		+		+	+		+
BNL3989	+			+			+		+	+		+		+	+		+
CIR292	+			+			+		+	+		+		+	+		+
JESPR231			+		+	+		+			+		+			+	+

Note : The sign "+" indicates presence of the *G. australe*-specific marker

**Table 14 : Constitution of MAL-G<sub>2</sub>-6 self-progeny carrying altered *G. australe* chromosome**

	MAL-G <sub>2</sub> -6	
	37	39
BNL3436		
BNL3359		+
BNL 2569		+
BNL 3103	+	+
BNL 3594	+	+
CIR407	+	+
BNL2884	+	+

Note : The sign "+" indicates presence of the *G. australe*-specific marker

### 3.2 Somatic elimination of the supernumerary chromosome in MAL-G<sub>2</sub>-6

Among the 98 plants of MAL-G<sub>2</sub>-6 self-progeny, the 52 plants that did not carry any of the alien chromosome markers harbored only bolls with white fiber. Except for one plant (#13), the 44 plants carrying all the markers specific to the alien chromosome carried only bolls with brown fiber. The plant #13 gave brown-fiber and white-fiber bolls (Figure 4). Similarly to plant #13, the plant #39 which lacked some markers (Table 14) gave brown-fiber and white-fiber bolls. All the three bolls produced by #37 which also lacked some markers of the alien linkage group (Table 14) carried only white fibers. Half of the six bolls produced by #39 contained brown fibers while four out of the five bolls produced by plant #13 carried brown fibers. The Table 15 recapitulates the type of fiber produced by the different derivatives of MAL-G<sub>2</sub>-6.

The production of fiber of different color by plants #39 and #13 was surprising as well as the exclusive production of white-fiber bolls by #37. This could be a case of variegation due to a genic position effect or to changes in the chromosome complement. Mosaicism has been reported to occur from chromosomal rearrangements that brought a gene normally located in the euchromatin in the neighborhood of the constitutive heterochromatin or conversely, the dislocation in the neighborhood of the euchromatin, of a gene normally located in the heterochromatin (Menzel and Brown 1952 ; Eberl et al. 1993). Variegation by position effect can also be caused by transposable elements. The first discovered Ac/Ds system that elucidated the mosaic color of maize is a well-known example (McClintock 1950). Changes in the chromosome complement leading to mosaicism could be explained by a late elimination of the alien chromosome (Rooney and Stelly 1991 ; Gupta and Gupta 1973).

In a first step the hypothesis of the additional chromosome elimination has been tested. The three plants #37, #39 and #13 were ratooned to produce new fresh leaves that were sampled on different branches for DNA extraction and SSR analysis. On all branches of the plant #39 the markers BNL3359 and BNL2569 were completely lost. The remaining markers were lost on certain branches and retained on others (Figure 5). All the samples from plants #13 and #37 gave results identical to the initial analysis. Results of the genotyping of these samples are given in Table 16.

After ratooning the plants #13 and #37 produced only bolls containing white-fiber seed-cotton as bolls carried by the branches of the plant #39 that lost all the *G. australe* markers. The two branches of the plant #39 that retained the *G. australe* markers carried the two types of bolls (Table 16).

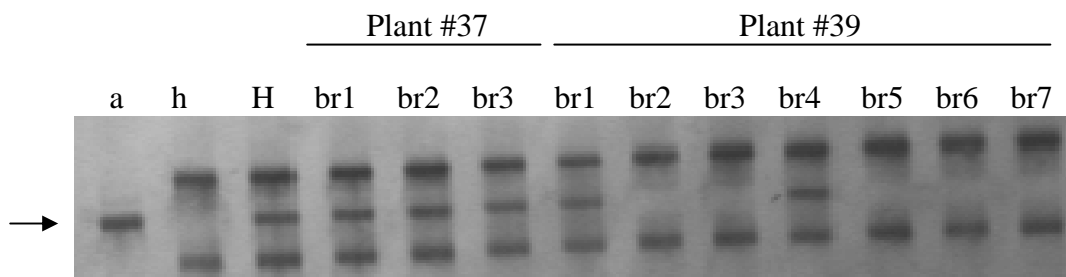


Figure 4 : Plant #13 of MAL-G<sub>2</sub>-6 carrying white-fibre and brown-fibre bolls

Table 15 : Seed fiber color of MAL-G<sub>2</sub>-6 self-progeny

	Color of the fiber *
52 Plants without any marker	white
43 Plants with all the markers	brown
Plant #13 (carry all the markers)	white and brown
Plant #37 (lacks some markers)	white
Plant #39 (lacks some markers)	white and brown

Note : \*All the seeds of a boll carry fibers of the same color.



Note : a : *G. australe* ; h = *G. hirsutum* ; H = Hexaploid. br = branch ; Arrow indicates the *G. australe*-specific locus.

Figure 5 : Loss of the *G. australe*-specific fragment produced by the marker BNL3103 in plant #39 of MAL-G<sub>2</sub>-6.

**Table 16 : Screening results of different branches of MAL-G<sub>2</sub>-6 plants #13, #37 and #39 after ratooning showing the chromosome elimination in plant #39.**

Markers	Results of the initial screening			Branches															
				#13						#37			#39						
	#13	#37	#39	1	2	3	4	5	6	1	2	3	1	2	3	4	5	6	7
BNL3436	+			+	+	+	+	+	+										
BNL3359	+		+	+	+	+	+	+	+										
BNL2569	+		+	+	+	+	+	+	+										
BNL3103	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+						+
BNL3594	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+					+
CIR407	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+					+
BNL2884	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+					+

Note : The sign "+" indicates presence of the *G. australe*-specific marker

**Table 17 : Distribution of the different types of bolls found on branches of MAL-G<sub>2</sub>-6 plants #13, #37 and #39.**

Plant Number	Branches																
	#13						#37			#39							
Branch Number	1	2	3	4	5	6	1	2	3	1	2	3	4	5	6	7	
Total number of bolls	3	0	2	2	1	0	2	2	0	4	1	0	4	1	0	0	
Number of white-fiber bolls	3	0	2	2	1	0	2	2	0	3	1	0	2	1	0	0	
Number of brown fiber bolls	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2	0	0	0	

The systematic absence of brown-fiber bolls on branches of plant #39 without any marker and the irregular presence of bolls containing brown fiber seed-cotton on branches with the chromosome fragment revealed clearly that the return to the white-fiber *G. hirsutum* character was due to the elimination of the alien chromosome. These results also indicate that the gene responsible of the brown color of the fiber is located on the retained fragment carrying the markers BNL3103, BNL3594, CIR407 and BNL2884. The production of white fiber seed-cotton by plants #13, #37 and on two branches of plant #39 despite the presence of all the markers in the first plant and of the fragment carrying the gene responsible for the brown

colour in the two last plants is comprehensible if one keeps in mind the fact that the SSR genotype of the leaves does not necessarily reflect the genotype of the fibers which are epidermal cells of the seed coat (see discussion below : timing of the loss of the *G. australe* chromosome).

As the low number of bolls carried by the plants grown in pots (0-4 bolls per branch) (Table 17) did not allow a real grasp of the pattern of the supernumerary chromosome elimination, a total of 104 plants of MAL-G<sub>2</sub>-6 self-progeny were grown in the field during summer 2007 in Senegal. Out of the 104 plants, only two revealed mosaicism. With branches much longer and carrying more bolls than branches of the plants grown in pots, we observed that some branches carried bolls containing seeds with all of the same color of fiber (brown or white) while other branches carried bolls containing only brown-fibre seed-cotton and bolls with white-fibre seed-cotton.

Of two consecutive branches the first could carry white-fiber bolls and the second brown-fiber bolls and for two consecutive bolls within a branch, the first could carry white-fiber bolls whereas the second carried brown fiber bolls. Therefore we conclude that the chromosome elimination, either inter-branch or intra-branch, occurred completely at random. Moreover, one of the two mosaic plants observed in Senegal produced one boll containing white and brown seed-cotton. All seeds in each loculus were however of the same color of fiber (Figure 6).



**Figure 6 : Boll with white-fibre and brown-fibre seed-cotton produced in Senegal by a MAL-G<sub>2</sub>-6 plant.**

## **4. DISCUSSION**

### **4.1 Alien chromosome transmission in self-pollinated MAALs**

Alien chromosome transmission in the self-progeny of MAL-G<sub>2</sub>-3, MAL-G<sub>2</sub>-6 and MAL-G<sub>2</sub>-12 was significantly lower than the expected 3:1 ratio. Distortion in the segregation ratios of MAALs in the genus *Gossypium* is a rather common observation. Rooney and Stelly (1991) found in the self-progeny of 3 MAALs of *G. sturtianum* in *G. hirsutum* an average alien chromosome transmission of 23 %. Mergeai (1992) reported transmission frequencies of 52 % and 53.8 % in two MAALs involving the diploid species *G. areysianum*. It is also well known that self-pollination in the genus *Gossypium* is likely to overestimate the bias of the alien chromosome transmission because of the differential ability to transmit the alien chromosome between the male and the female gametes on the one hand and because of the strong selection against disomic alien addition lines with the same chromosome in duplicate on the other hand (Hau 1981a). Female gametes are better suited for transmission of the alien chromosome than male gametes. Poisson (1970) reported transmission frequencies by the female gamete ranging from 26.2 % to 39.2 % for six MAALs of *G. anomalum* in *G. hirsutum* and from 0 to 5.89 % by the male gamete. The four MAALs of *G. sturtianum* in *G. hirsutum* studied by Rooney and Stelly (1991) transmitted the alien chromosome exclusively by the female gamete. The two MAALs described by Mergeai (1992) transmitted the alien chromosome through the male gamete at 2.6 % and 6.2% only. The lower transmission of the alien chromosome by male gamete could be attributed to a lesser viability and/or competitiveness of male gametophyte with additional chromosome in the pollen tube growth. On the contrary to the three previous MALs, MAL-G<sub>2</sub>-10 showed an exclusive preferential transmission of the supernumerary chromosome. This preferential transmission was already observed by Rooney and Stelly (1991) in one MAAL of *G. sturtianum* in *G. hirsutum* with a transmission rate through the male gamete of 90 %. Becerra Lopez-lavalle and Brubaker (2007) also identified a *G. australe* chromosome designated Aust-M (which could be the same than the one carried by our MAL-G<sub>2</sub>-10) transmitted at a rate of 100 % by the female gamete. Preferential transmission of a supernumerary chromosome in MAALs was also observed in other species. Cameron and Moav (1957) described a MAAL of *Nicotiana plumbaginifolia* in *N. tabacum* whose alien chromosome was transmitted at 100% by male gamete ; alien chromosomes of *Aegilops sharonensis* and of *A. longissima* in the wheat background were reported to be selectively retained in wheat by both male gamete and female

gamete (Maan 1975 ; Miller et al. 1982). Maguire (1963) reported a MAAL of *Tripsacum* in corn whose alien chromosome was transmitted at 91% by the female gamete.

If a low transmission of the alien chromosome can be explained by prezygotic (meiotic irregularities resulting in the loss of the alien chromosome, unviability and lack of competitiveness of the male gamete) or postzygotic phenomena (less viability of zygotes or plants with an alien chromosome) (Rooney and Stelly 1991), other mechanisms such as apomixis, preferential segregation or gametocidal genes are put forward to explain preferential transmission of the alien chromosome (Maguire et al. 1963 ; Rhoades 1942 ; Miller et al. 1982 ; Gao et al, 2002). Apomixis has been reported to occasionally occur in hybrids of *Beta vulgaris* with species of the section *corrolineae*. It has been assumed to cause the transmission of the alien chromosome in a MAAL of *Beta corolliflora* on *B. vulgaris* at a rate of 60% through the female gamete (Gao et al, 2002). Preferential segregation was described by Rhoades (1942) as the passage of a specific chromosome to a specific pole. He found that the abnormal maize chromosome 10 with an extra piece of chromatin attached to the end of the long arm, observed in some strains grown in the southwestern of the USA, was transmitted at more than 70 % in the ovules. He explained this distorted ratio by the fact that the abnormal chromosome passed preferentially to the lower pole of the spindle from which the basal megaspore that gives the embryo sac arises while the three other megaspores degenerate. Gametocidal chromosomes carry genes that make non-functional the gametes not carrying them (Cameron and Moav 1957; Jiang et al. 1994 ; Nasuda et al. 1998). Numerous *Aegilops* species (*A. cylindrica*, *A. triuncialis*, *A. sharonensis* etc.) are known to carry these genes. The *G. australe* chromosome designated Aust-M by Becerra Lopez-lavalle and Brubaker (2007) is suspected to carry gametocidal genes as it could also be the case with the alien chromosome carried by MAL-G<sub>2</sub>-10. If that turned out to be true, a powerful means will be at the disposal of cotton breeders to exploit *G. australe* for the improvement of the main cultivated species. For example, gametocidal chromosomes from *Aegilops* species have been used for mapping as an alternative to radiation (Masoudi-Nedjad et al. 2005) and for introgression in wheat (Masoudi-Nedjad et al. 2002 ; Shi and Endo 1999 ; Shi and Endo 2000).

Determination of the factors causing distorted transmission in MAL-G<sub>2</sub>-3, MAL-G<sub>2</sub>-6, MAL-G<sub>2</sub>-10, and MAL-G<sub>2</sub>-12 will need to test the progeny obtained by backcrossing them to *G. hirsutum* as male and female parent and to carry out cytogenetic studies.



#### **4.2 Integrity of the alien chromosome in the self-pollinated MAALs**

Of the five MALs, only MAL-G<sub>2</sub>-2 and MAL-G<sub>2</sub>-6 carried altered chromosomes that could be identified using SSR markers. The fragments carried by MAL-G<sub>2</sub>-6 plants seemed not to be recombined (see discussion on the somatic elimination). As far as the status of the fragments carried by the MA-G<sub>2</sub>-2 line is concerned, one can suppose that the altered chromosomes we observed in 38% of the progeny are not recombined since *G. australe* belongs to the tertiary gene-pool of the cultivated species which is characterized by the lowest level of homoeology and pairing affinity with *G. hirsutum* chromosomes (Stewart 1995). The achievement of genomic *in situ* hybridization (GISH) analysis on the progeny of these plants has to be carried out to confirm this hypothesis.

#### **4.3 Somatic elimination of the supernumerary chromosome in MAL-G<sub>2</sub>-6 line**

Fiber color mosaicism and loss of the *G. australe* specific SSR markers in some leaves in plant #39 of MAL-G<sub>2</sub>-6 clearly revealed an elimination of the *G. australe* chromosome and allowed to locate the gene on a fragment carrying also the markers BNL3103, BNL3594, CIR407 and BNL2884.

Somatic elimination of the supernumerary chromosome has been already reported by Rooney et al. (1991) in a monosomic addition line of *Gossypium sturtianum* in *G. hirsutum*. Menzel (1952) also noted somatic elimination in a three-species hexaploid hybrid.

Complete or partial uniparental chromosome elimination following an interspecific hybridization, whether by sexual or somatic fusion hybridization, is a frequently observed phenomenon which has even been used to produce haploid or aneuploid plants (Koba et al. 1991; Riera-Lizarazu et al. 1996; Garriga calderé et al. 1998; Kynast et al. 2001). But usually it is during the first zygotic division of the hybrid embryo development, that the chromosome elimination takes place. For example in wheat and maize hybrids, all maize chromosomes are eliminated during the first three-cell division cycles in the embryo (Laurie and Bennett 1989); in hybrids between wheat and pearl millet, all pearl millet chromosomes are eliminated between 6 and 23 days after pollination (Gernand et al. 2005). When the chromosomes are lost in the early stages of the embryo development, the derived-plant can grow with the same number of chromosomes in all its cells. The very peculiarity of the chromosome elimination reported here is its late occurrence, during the adult plant growth.

Complete loss of the fragment carrying the markers BNL2569 and BNL3359 was observed after ratooning while the fragment with the markers BNL3103, BNL3594, CIR407 and

BNL2884 was still retained in some branches. This observation revealed that the first segment was less stable than the second.

The apparent inconsistency observed between the results obtained with the SSR markers and the colour of the fiber in the plants #13 and #37 produced by MAL-G<sub>2</sub>-6 have to be interpreted considering the results obtained from plant #39. Two important conclusions can be drawn from these results: (i) the chromosome elimination can occur at any moment in the growing plant, (ii) the chromosome can be gradually lost.

Because the chromosome elimination can occur at any moment no relation may exist between the genotype of the leaves that gave the DNA analyzed with the SSR markers and the other parts of the plant, notably the fiber constituted by epidermal cells of the seed coat. This discrepancy is all the more likely since fibers are among, if not, the latest produced cells.

The plant #37 carried only white-fibre bolls, despite the fact that it carried the two same *G. australe* specific-SSR markers as the branches of the plant #39 that gave some brown-fibre bolls. The number of two SSRs being too low to characterize satisfactorily a chromosome fragment it is likely that the fragments present in the two plants carry the same two markers but are not identical.

Consequences of these differences could be that (i) chromosome elimination in plant #37 is more severe in the fibers than in the leaves or (ii) the chromosome elimination severity is the same whatever the type of cell, but the fragment carried by the plant #37 has in fact lost the region carrying the gene. Considering the pattern of the chromosome elimination in the plant #39, instability in leaves being accompanied by instability in the fibres, there is no reason to think that the chromosome elimination varies according to the type of cell. So the persistence of the four markers BNL3103, BNL3594, CIR407 and BNL2884 in the leaves combined with the regular production of white fibre in plant #37 could be explained by a breakage resulting in the instability of a fragment (carrying the marker gene) which is easily lost and in a stabilized fragment which did not undergo somatic elimination. Thus, there seems to be a variation in the level of stability according to the nature of the *G. australe* fragment.

Before ratooning, the plant #13 possessed 16.6 % (1/6) of white-fibre boll. After ratooning, all the eight bolls produced white seed-cotton while all the sampled leaves still carried all the five markers. Assuming as previously that there is no difference in the elimination rate of the alien chromosome fragments between the leaves and the fibres, this indicates an intensive elimination of the region carrying the gene and corroborates the hypothesis of the existence of a stabilized *G. australe* fragment which lacked the region carrying the gene.

#### **4.4 Timing, origin and mechanisms of the chromosome elimination**

The configuration of a mosaic formation due to chromosome elimination allows the determination of the timing of the chromosome loss. Since a sector is constituted by a cell lineage originating from the same cell, the size of a sector depends on the moment when the chromosome is eliminated. The largest a sector is, the earliest the chromosome has been eliminated. Based on this principle, Rooney and Stelly (1991), observing no intra-branch mosaicism, concluded that somatic elimination of the supernumerary chromosome happened at a precocious stage, during the formation of the branches developed from a single adventitious bud. In the case studied here, the existence of inter-branch, intra-branch and even an intra-boll mosaicism revealed clearly that the chromosome can be lost at every moment in the growing plant even until flowering. .

It is most likely that the *G. australe* chromosome elimination has been triggered by its previous breakage. Correlation between chromosome breakage and instability is a well-known fact. McClintock (1941) described how breakage of a single chromatid results, after division, in the fusion of the two sister halves of the broken chromosome creating a dicentric bridge that will break during poleward migration in the following mitotic anaphase. This breakage-fusion-bridge (BFB) sequence will continue in each successive nuclear division until the broken chromosome end is healed. This BFB cycle can occur at meiosis as well as in mitosis of somatic cells. An important question to be answered in the present study, because it would help understanding the mechanisms of the somatic elimination, is to determine whether the breakage of the chromosome undergoing elimination occurred after fertilization in the sporophytic tissues (maybe even beginning in the embryo) or before (during gametogenesis). In the first case, the chromosome is not expected to be healed. Though healing of broken chromosome ends in the sporophytic tissues is not impossible, it is very rare and is thought to occur only in certain physiological conditions (McClintock 1941). It is also known that breaks induced by mechanical rupture, as it is the case here, and by X-ray, contrary to those caused by ultraviolet radiation, are followed by fusions of broken ends of the chromosomes (McClintock 1941). So in the present situation the mosaicism could be explained by instability due to the BFB cycle. But this explanation should result in a high-intensity of variegation (Moav 1961) and for example more intra-boll and even intra-loculus variegation should be observed. In the second case the centric fragment of the broken chromosome is not expected to undergo a BFB cycle but should be transmitted normally like a complete chromosome because the broken end of a chromosome is known to be permanently healed

after its passage in the embryo. So if the broken chromosome is unstable in the sporophytic tissues causing mosaicism, it is more likely because the chromosome fragment undergo rare aberrant mitotic-anaphase (non-disjunction of sister chromatids and lagging or migration of both chromatids to one daughter cell) resulting in the deficiency of the fragment in some cell lineages expressed by the mosaicism. Gupta (1968) studying different plants with a chromosome fragment of *Nicotiana plumbaginifolia* in *N. tabacum* found out a frequency of mitotic anaphase bridges formed by the *N. plumbaginifolia* chromosome ranging from 2.6% to 20.9 % positively correlated with the intensity of the variegation. The apparently stable *G. australe* chromosome fragment carried by plant #13 might be a telocentric chromosome (deficient for one complete arm) or a secondarily-transformed isochromosome (duplication of the telocentric chromosome) resulting from the misdivision of the centromere.

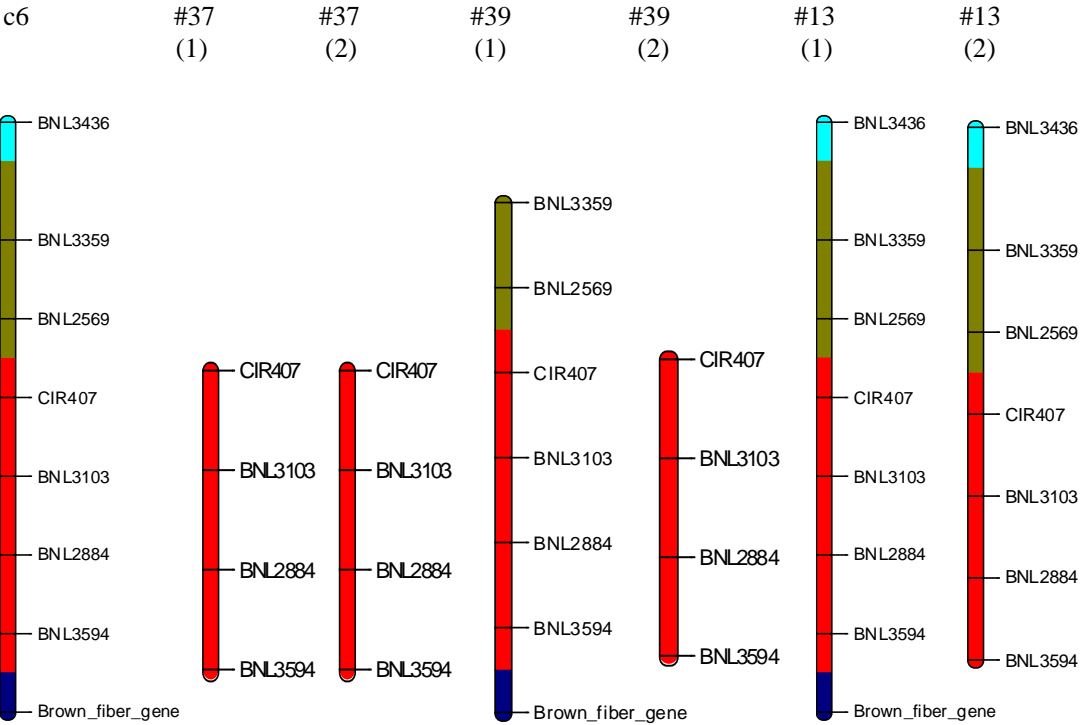
#### **4.5 Mapping of the *G. australe* chromosome carrying a gene controlling the fiber colour**

From all the observations and considerations discussed above, a linkage map of the *G. australe* chromosome homoeologous to c6 and its constitution in the three plants investigated before and after ratooning is proposed in Figure 7. It should be however noted that when the gene is lost the somatic elimination cannot be detected in the fiber. So due to a possible gradual fragmentation and loss of the chromosome, the fibers could present a different chromosome constitution. If the hypothesis that the fragment carried by plant #13 was a telocentric chromosome (or an isochromosome) proved to be exact, then the centromere has to be positioned between the marker BNL3594 and the region carrying the brown-fiber gene.

#### **4.6 Implications of somatic elimination in the use of MAAL for the improvement of cultivated species**

Presence of a dominant marker gene in the *G. australe* c6 provided an opportunity to detect the alien chromosome somatic elimination. The frequencies obtained in the greenhouse and in the field are consistent and are around 2% of a self-progeny. Because it reduces the meiotic events confronting the donor chromosome and the recipient genome, the chromosome elimination is an obstacle for the achievement of homoeologous recombination. However, given the low rate of its occurrence, this drawback can be considered negligible. What really would be dramatic in terms of waste of time and resources is to use, on the basis of the results

obtained from leaves indicating presence of the alien chromosome, bolls that lost the alien chromosome, in an introgressive cotton-breeding program by selfing. So one important question to be adressed in the future is to determine if this phenomenon is chromosome-specific in order to know how much attention will have to be paid to the choice of the seeds that will be used in a breeding program involving a MAAL without a morphological marker.



**Figure 7. Deletion mapping of *G. australe* c6 and its putative condition in plants #13, #37 and #39 before and after ratooning**

Note : (1) and (2) indicates respectively the alien chromosome structure before and after ratooning. Arrangement of markers within a fragment is according to their location on the *G. hirsutum* pair chromosome c6-c25 map (Lacape et al. 2003)

## **7. CONCLUSION**

Dans les pays francophones d'Afrique subsaharienne près de 10 millions d'individus vivent directement ou indirectement du coton qui assure aussi à certains Etats jusqu'à 60% de leurs recettes d'exportation. Le succès de la culture du coton en Afrique s'explique en grande partie par une organisation en une filière intégrée depuis la recherche jusqu'à l'exportation. Les producteurs bénéficient d'un encadrement technique, d'un débouché garanti, d'un prix stable et ont accès à un système de crédit qui leur permet d'acquérir des intrants. Cette organisation a permis de sortir de la logique d'une agriculture vivrière de subsistance exclusive, marquée par de faibles rendements et une faible productivité du travail. Les producteurs de coton sont parmi les plus dynamiques et les plus ouverts aux innovations. Ils ont recours à la mécanisation, à la fertilisation, aux variétés améliorées etc.

Malgré ce succès, la filière est cependant confrontée à de réels problèmes : les sociétés cotonnières, établissements publics ou à participation étatique majoritaire et au crédit desquelles il faut mettre en grande partie les performances observées sont en train d'être démantelées et privatisées. Les subventions aux producteurs nord-américains et la productivité toujours plus grande des pays émergents (Brésil, Chine, Inde) font baisser les prix du marché mondial en même temps que la concurrence des fibres synthétiques contribue à accentuer cette tendance en réduisant la demande.

Aujourd'hui, avec la crise énergétique qui tire à la hausse les prix des facteurs de production et la crise économique mondiale qui ne manquera pas de déprimer les marchés, les petits producteurs constatent déjà que leurs conditions de vie se dégradent et les Etats constatent un tarissement de leurs sources de devises. Et aucune prévision n'annonce à l'heure actuelle une quelconque éclaircie à l'horizon.

Résoudre les problèmes auxquels est confrontée la filière passera sans doute par l'arrêt de l'exportation de la matière première brute et la mise en place dans les pays producteurs d'une industrie qui accroîtra la valeur ajoutée du coton produit ainsi que d'une réglementation plus équitable du commerce mondial. Mais au delà de ces problèmes subsiste la nécessité d'augmenter la productivité et la qualité du coton. Les leviers sur lesquels on peut agir sont nombreux et multiformes, allant de la mécanisation à la maîtrise de l'eau en passant par l'amélioration des techniques culturales. Mais l'une des voies privilégiée demeure la création variétale qui répond aux contraintes et exigences des producteurs. L'intérêt de cette voie pour les petites exploitations qui assurent la production est que c'est un investissement dont elles ne

supportent pas seules le coût (du moins dans le cadre de la recherche publique) et dont les effets sont durables.

Les grandes firmes agro-industrielles proposent déjà des OGM, principalement pour la résistance à des herbicides et à des ravageurs. Ces nouvelles variétés bien qu'elles gagnent beaucoup de terrain sont cependant fréquemment dénoncées en raison de la dépendance des producteurs aux firmes semencières qu'elles impliquent, de la forte réticence des consommateurs et des Etats (bien que ce problème soit moins aigu avec le coton comparé aux cultures vivrières), ainsi que des inquiétudes que tout contrôle soit perdu sur les plantes OGM qui pourraient contaminer l'environnement et auraient un impact négatif sur la biodiversité.

Une voie moins sujette à polémique et plus durable consisterait à explorer et à exploiter davantage la biodiversité du genre *Gossypium* par le recours aux espèces diploïdes sauvages. Une des méthodes utilisées pour transférer des gènes de ces espèces vers la principale espèce cultivée passe par la production de lignées monosomiques d'addition.

En admettant que le processus d'amélioration génétique d'une plante se compose de deux étapes complémentaires consistant en une recherche et une création de variabilité, d'une part, et en une création variétale, d'autre part, la production de LMA se situe alors clairement dans la première phase. Elle vise à isoler chacun des chromosomes d'une espèce sauvage donneuse dans un fond génétique uniforme constitué par l'espèce cultivée receveuse. Elle se présente ainsi comme une méthode de dissection du génome de l'espèce sauvage dont les effets de chaque chromosome ainsi que ses interactions avec le fond génétique de l'espèce receveuse peuvent être étudiés individuellement. Dès lors, les gènes intéressants identifiés peuvent être transférés avec une grande précision dans l'espèce receveuse tandis qu'un nombre relativement faible de rétrocroisements doit pouvoir permettre de réduire le "linkage drag". En dehors de son intérêt direct pour l'amélioration génétique des plantes cultivées, la création de LMA permet aussi de tracer l'histoire évolutive d'une lignée (genre et même famille) en plaçant l'échelle de l'analyse au niveau chromosomique.

A partir du pentaploïde impliquant l'espèce diploïde sauvage *G. australe* et la principale espèce cultivée tétraploïde *G. hirsutum*, notre objectif a été d'isoler toutes les 13 LMA de *G. australe* sur *G. hirsutum* et d'évaluer les possibilités de les utiliser pour l'amélioration de la principale espèce cultivée.

En utilisant le pentaploïde comme parent mâle, une importante descendance a pu être obtenue. Il avait été généralement admis que la meilleure méthode pour produire une importante descendance du pentaploïde était de rétrocroiser le pentaploïde en le prenant comme parent femelle. Les résultats obtenus montrent que cette loi, même si elle est largement vérifiée chez

plusieurs espèces, n'est pas générale et ne s'applique pas au pentaploïde impliquant l'espèce *G. australe*. Une grande variabilité morphologique, indiquant la diversité des combinaisons de chromosomes de *G. australe* présents dans le fond génétique de l'espèce cultivée a été observée dans la descendance du pentaploïde.

Afin de pouvoir analyser cette descendance avec des marqueurs SSR développés sur *G. hirsutum*, des marqueurs répartis sur tous les chromosomes de *G. hirsutum* ont été sélectionnés et leur comparaison avec l'espèce *G. australe* a montré un taux de trans-amplification de 100% et un taux de polymorphisme de 56% entre les deux espèces.

La possibilité de transférer des marqueurs SSR développés sur une espèce d'intérêt majeur telle que *G. hirsutum*, largement étudiée et pour laquelle il existe des milliers de marqueurs et des cartes de plus en plus saturées, vers une espèce diploïde sauvage, d'un intérêt secondaire, est d'une importance capitale. Elle permet de disposer pour une espèce "orpheline" d'un grand nombre de marqueurs sans nécessiter l'effort et le coût exorbitants qu'impliqueraient leur développement pour cette espèce.

Par une analyse hiérarchique il a été possible d'assigner les marqueurs à des chromosomes de *G. australe* et de définir ainsi pour chacun d'eux un groupe de liaison.

La majorité des aneuploïdes retrouvés dans cette première descendance du pentaploïde se composaient de plurisomiques alors que les quelques LMA recouvrées se révélaient identiques à celles déjà isolées par Ahoton et al. (2003). Le premier constat montre que le gamète mâle de *G. hirsutum* peut supporter un nombre relativement élevé de chromosomes de *G. australe* (de 3 chromosomes complets à 8 chromosomes dont une grande partie serait incomplète).

Que les seuls chromosomes retrouvés à l'état monosomique d'addition dans la première génération du pentaploïde aient été les mêmes que ceux qui avaient été déjà isolés dans une précédente étude (Ahoton et al. 2003) laisse suggérer que ces chromosomes seraient, dans une configuration aneuploïde, peu compatibles avec d'autres chromosomes et se retrouveraient ainsi plus facilement isolés dès la première génération de la descendance du pentaploïde. Une autre explication serait que les chromosomes non-isolés dans la première génération du pentaploïde ont un effet très peu marqué sur la morphologie, créant ainsi un biais lorsqu'il est procédé à une sélection des plantes basée sur le phénotype comme cela a été le cas dans les deux études.

Un certain nombre des chromosomes de l'espèce sauvage sont retrouvés fragmentés dans la première génération de la descendance du pentaploïde. Ce fait qui ne pouvait être mis en évidence avec les anciennes méthodes d'isolement des LMA basées sur la morphologie et la



cytogénétique montre les limites de l'utilisation exclusive de celles-ci. Cette fragmentation s'explique sans aucun doute par la configuration particulière du pentaploïde dans lequel aucun chromosome de l'espèce diploïde ne trouve de partenaire avec qui s'apparier. Les irrégularités méiotiques qui en découlent pourraient entraîner la fragmentation des chromosomes.

Une question longtemps débattue a été de savoir si des échanges intergénomiques survenaient dans les stades antérieurs à l'isolement des LMA (pentaploïde et hexaploïde surtout). Les enjeux de cette controverse portent sur l'opportunité d'utiliser ces étapes pour réaliser des introgressions beaucoup plus facilement qu'à partir des LMA et sur les risques d'isoler des LMA avec des chromosomes tronqués ou ayant perdu leur intégrité.

Sur ces points, la ségrégation du marqueur CIR280 dans la descendance du pentaploïde et celle autofécondée de la plante #24 plaide en faveur d'une introgression intervenue au niveau hexaploïde et semble donner raison aux tenants de la possibilité d'une utilisation de cette phase comme étape d'introgression (Louant et al. 1977). Quant à l'absence des deux marqueurs CIR047 et CIR110 chez l'hexaploïde, le pentaploïde et la descendance de celui-ci, à moins qu'elle ne traduise un polymorphisme entre la plante de *G. australe* utilisée pour créer l'hybride triploïde et celle utilisée pour déterminer les marqueurs polymorphes entre *G. australe* et *G. hirsutum*, elle signifierait tout simplement que le chromosome de *G. australe* portant ces deux marqueurs a subi une délétion au stade triploïde. Ceci voudrait dire qu'avec le pentaploïde utilisé, il sera à jamais impossible d'isoler ce chromosome complet.

A quelques exceptions près les marqueurs cartographiés sur une paire de chromosomes homéologues de *G. hirsutum* ont été assignés à un seul et même chromosome de *G. australe*, ce qui traduit une forte synténie entre les deux espèces. Les "anomalies" observées ont concerné des marqueurs cartographiés sur les chromosomes non-homéologues c2 et c3 de *G. hirsutum* qui ont été assignés à un même chromosome de *G. australe* et des chromosomes non-homéologues c4 et c5 de *G. hirsutum* qui se sont retrouvés sur un même chromosome de *G. australe*. Ces observations viennent conforter les hypothèses déjà émises (Reinisch et al. 1994 ; Desai et al. 2006) que les chromosomes c2 et c3 d'une part et les chromosomes c4 et c5 d'autre part de *G. hirsutum* du génome A du tétraploïde ont subi des translocations dans l'espèce tétraploïde.

De même, le fait que les deux marqueurs (BNL3436 et BNL3537) soient dupliqués sur les deux mêmes chromosomes de *G. australe* renforce l'hypothèse que l'ancêtre des espèces diploïdes dérive d'une paléo-polyploidisation.

Ces quelques résultats permettant d'éclairer l'histoire évolutive du genre *Gossypium* montrent la puissance des LMA comme outil d'investigation de la phylogénèse d'une espèce.

L'utilisation d'un plus grand nombre de marqueurs couvrant mieux les chromosomes de *G. australe* améliorera la compréhension de cette évolution.

En sélectionnant dans la descendance de première génération du pentaploïde des plantes disomiques fertiles qui possédaient des chromosomes non encore isolés à l'état monosomique d'addition, il a été possible dans cette génération autofécondée d'isoler cinq nouvelles LMA. L'analyse avec des marqueurs SSR a permis de sélectionner les plantes qui ne contenaient qu'un seul groupe de liaison alors que l'hybridation génomique *in situ* a permis de distinguer parmi celles-ci les plantes qui possédaient un seul chromosome de celles qui en contenaient deux exemplaires. Ces nouvelles lignées portent à 11 le nombre total de LMA de *G. australe* sur *G. hirsutum* actuellement disponibles. Avec le niveau de fiabilité permis par les marqueurs et la cytogénétique moléculaire c'est le plus grand nombre de LMA jamais isolées dans le genre *Gossypium*. L'isolement des deux restants (c1 et c11) sera plus difficile en raison de la stérilité des plantes qui les portent. La stérilité de ces plantes semble relever de causes différentes : pour l'un des chromosomes (c1) la plantes qui le porte (#21) est stérile parce qu'elle contient 5 autres chromosomes surnuméraires alors que le dernier chromosome (c11) semble porter des gènes de stérilité (plantes #5 et #41).

Les résultats obtenus montrent que les marqueurs SSR développés sur *G. hirsutum* combinés avec la GISH sont un outil efficace pour identifier et isoler des LMA d'une espèce diploïde sauvage sur la principale espèce cultivée.

Parmi les 11 lignées disponibles, la descendance autofécondée de cinq lignées a été analysée avec des marqueurs SSR pour évaluer les possibilités d'introgression. Trois lignées (c6, c12 et c3) ont donné un taux de transmission inférieur à celui attendu alors que chez une quatrième lignée (c10) le chromosome additionnel a été systématiquement transmis à toute la descendance. Chez la cinquième lignée (c2) le chromosome surnuméraire a montré un taux de transmission conforme au ratio attendu en même temps qu'un nombre élevé d'individus portant des chromosomes de *G. australe* altérés.

La distorsion de ségrégation observée au niveau des trois premières lignées s'explique sans doute par une transmission du chromosome additionnel par un seul type de gamètes, probablement les gamètes femelles qui supportent mieux l'aneuploïdie que les gamètes mâles. Pour le chromosome préférentiellement transmis, la cause pourrait être la présence de gènes gamétocides qui rendent non-viables tous les gamètes qui ne portent pas le chromosome. La présence éventuelle d'un gène gamétocide serait d'un grand intérêt car il pourrait être utilisé pour induire des translocations (Masoudi-Nedjad et al. 2002).

La seule lignée qui présente un taux de transmission conforme à celui attendu montre également un nombre élevé de chromosomes altérés. L'analyse avec les seuls marqueurs ne permet pas de dire si ces chromosomes sont recombinés ou non. Des analyses par hybridation génomique *in situ* (GISH) devront être effectuées pour trancher cette question d'une importance capitale.

Grâce au marqueur morphologique que constitue la couleur brune des fibres, l'élimination somatique du chromosome surnuméraire de *G. australe* (c6), portant le gène responsable de ce caractère, a pu être mis en évidence. L'ampleur de ce phénomène a été évalué à 2% des plantes produites par autofécondation. La cause de cette instabilité semble liée à une fragmentation du chromosome. En l'absence d'un marqueur morphologique, ce phénomène sera difficile à étudier sur les autres lignées.

L'isolement de LMA ne constitue qu'une première étape dans une stratégie d'amélioration d'une espèce. Toutes les LMA isolées constituent un matériel génétique potentiellement intéressant qui devra être évalué par rapport à des caractères d'intérêt tels que la résistance au *Fusarium*, la présence du caractère "retard de la morphogénèse des glandes à gossypol" etc. Les LMA porteuses de ces caractères pourront être retenues dans un programme de sélection par autofécondation pour l'obtention d'individus introgressés. En raison de l'affinité très faible entre le génome de l'espèce cultivée et les chromosomes de *G. australe* ainsi que de la configuration du chromosome surnuméraire qui n'a pas de partenaire alors que chacun des chromosomes de *G. hirsutum* s'appariera avec son homologue (autosyndèse), des taux d'introgression très faibles doivent être attendus. La faible taille des fragments d'ADN de *G. australe* qui devrait intégrer le génome de *G. hirsutum* suite à ces événements devrait rendre leur détection particulièrement difficile. Aussi, il nous semble que la meilleure voie d'utilisation des LMA serait de les réserver à la création de lignées de substitution c'est-à-dire à la constitution de plantes dans lesquelles un chromosome de l'espèce cultivée sera remplacé par un chromosome de l'espèce sauvage. Ces lignées de substitution, plus que les LMA, maximiseraient les chances d'obtenir des plantes introgressées. La création d'une lignée de substitution s'obtiendra en croisant une LMA avec une lignée monosomique pour le chromosome homéologue de celui qui se trouve en addition chez cette LMA. De cette façon les appariements hétérogénétiques seront grandement favorisés. Le choix des parents à utiliser dans ces croisements sera d'autant plus facilité que les relations d'homéologie entre le chromosome additionnel porté par chaque LMA avec les chromosomes de *G. hirsutum* sont maintenant connues. Même si des lignées monosomiques ne sont pas actuellement disponibles

à Gembloux, la collection complète des lignées monosomiques de *G. hirsutum* pourra être obtenue en adressant une demande aux laboratoires qui en disposent.

Les plantes introgressées présentant des caractères intéressants qui auraient été déjà détectés chez les LMA pourront être utilisées comme têtes de lignée ou géniteurs dans des programmes de création variétale.

Que les plantes introgressées soient obtenues à partir de LMA ou à partir de lignées de substitution, deux conditions essentielles devront être réunies pour assurer le succès d'un tel programme : disposer d'un nombre important de marqueurs afin de couvrir le plus largement possible le chromosome de l'espèce sauvage, d'une part et, d'autre part, disposer d'une méthode de criblage efficace qui permette de traiter les grandes populations que requiert une telle approche.

## BIBLIOGRAPHIE

- Adams K. L.**, and **Wendel J. F.** 2005. Polyploidy and genome evolution in plants. *Curr. Opin. Plant Biology*. **8**: 135-141.
- Ahoton L.** 2002. Utilisation des espèces sauvages *Gossypium struttianum* J.H. Willis et *G. australe* F. Muell pour l'amélioration du cotonnier cultivé *G. hirsutum* L. PhD thesis. Fac. Univ. Sci. Agron. Gembloux. Belgium. 175 p.
- Ahoton L.**, **Lacape J. M.**, **Baudoin J. P.**, and **Mergeai G.** (2003). Introduction of Australian diploid cotton genetic variation into Upland Cotton. *Crop. Sci.* **43** : 1999-2005.
- Altaf-Khan M.**, **Quereshi S. N.**, **Saha S.**, **Jenkins J. N.**, **Brabaker C. L.**, and **Reddy O. U. K.** (2006). Usefulness of SSR derived from tetraploid *Gossypium spp.* for analyses of diploid *Gossypium spp.* *J. Crop Improv.* **16** :1-20.
- Altman D. W.**, **Stelly D. M.**, and **Kohel R. J.** (1987). Introgression of the Glanded-Plant and Glandless-Seed Trait from *Gossypium sturtianum* into cultivated Upland cotton using ovule culture. *Crop. Sci.* **27**: 880-884.
- Altman D.W.**, 1988. Exogenous hormone applications at pollination for *in vitro* and *in vivo* production of cotton interspecific hybrids. *Plant Cell Reports*, **7**: 257-261.
- Anamthawat-Jonsson K.**, **S. T.**, **Leitch A. R.**, **Bennett M. D.**, and **Heslop-Harrison** (1990). Discrimination between closely related species *Triticeae* species using genomic DNA as a probe. *Theor. Appl. Genet* **79**: 721-728.
- André B.**, and **Verschraege L.**, (1983). Amélioration du cotonnier *Gossypium hirsutum* L. par hybridation interspécifique : utilisation de l'espèce *G. areysianum* (Delph.) Hutch. *Bull. Rech. Agron. Gembloux* **18** : 151-164.
- Bai D.**, **Scoles G. J.**, and **Knott D. R.** 1994. Rust resistance in *Triticum cylindricum* Ces. (CCDD) and its transfer into durum and hexaploid wheats. *Genome*. **38**: 8-16.
- Baudoin J. P** (1973). L'aneuploïdie chez les végétaux et les possibilités d'application dans l'amélioration du cotonnier par introgression. Travaux de fin d'Etudes, Gembloux. Faculté des Sciences Agronomiques, 111p.
- Baudoin J. P.** (2001). Contribution des ressources phylogénétiques à la sélection variétale de légumineuses alimentaires tropicales. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **5** : 221-230.
- Beasley J. O.** 1940. The production of polyploids in *Gossypium*. *J. Hered.* **31**: 39-48.
- Beasley J. O.** 1942. Meiotic chromosome behavior in species, species hybrids, haploids, and induced polyploids of *Gossypium*. *Genetics*. **27**: 25-54.
- Becerra Lopez-Lavalle L. A** and **Brubaker C. L.** 2007. Frequency and fidelity of alien chromosome transmission in *Gossypium* hexaploid bridging populations. *Genome*. **50**: 479-491.
- Becerra Lopez-Lavalle L. A.**, **McFadden** and **Brubaker C. L.** 2007. The effect of *Gossypium* C-genome chromosomes on resistance to fusarium wilt in allotetraploid cotton. *Theor. Appl. Genet.* **115**: 477 – 488.
- Benbouza H.**, **Baudoin J.P.**, and **Mergeai G.** 2006a. Amélioration de la méthode d'extraction d'AND au CTAB appliqué aux feuilles de cotonnier. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **10**: 73 – 76.
- Benbouza H.**, **Jacquemin J.M.**, **Baudoin J.P.**, and **Mergeai G.** 2006b. Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **10**: 77 – 81.
- Berti F.**, **Hofs J. L.**, **Zagbaï H.S.**, and **Lebailly P.** (2006). Le coton dans le monde, place du coton africain et principaux enjeux. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **10** : 271-280.
- Blanc G.** and **Wolfe K. H.** 2004. Widespread paleopolyploidy in model plant species inferred from age distributions of duplicate genes. *Plant Cell*. **16**:1667–1678.

- Brown (1965)** chromosome manipulations and plant genetics. Attributes of intra and interspecific aneuploidy in *Gossypium*. *Suppl. Heredity* **20**, 98-120.
- Brown M. S.**, and Menzel M. Y. 1952. Polygenomic hybrids in *Gossypium*. I. cytology of hexaploids, pentaploids and hexaploid combinations. *Genetics*. **37**: 242-263.
- Brubaker C. L.**, Benson C. G., Miller C., and Leach D. N. 1996. Occurrence of terpenoid aldehydes and lysigenous cavities in the glandless seeds of Australian *Gossypium* species. *Aust. J. Bot.* **44**: 601-612.
- Brubaker C. L.**, Brown A. H. D., Stewart J. McD., Kilby M. J., and Grace J. P. 1999a. Production of fertile hybrid germplasm with diploid Australian *Gossypium* species for cotton improvement. *Euphytica*. **108**: 199-213.
- Brubaker C. L.**, Paterson A. H., and Wendel J. F. 1999b. Comparative genetic mapping of allotetraploid and its diploid progenitors. *Genome*. **42**: 184-203.
- Brubaker, C. L.** and Brown A. H. D. 2003. The use of multiple alien chromosome addition aneuploids facilitates genetic linkage mapping of the *Gossypium* G genome. *Genome* **46**: 774-791.
- Cameron D. R.** and Moav R. 1957. Inheritance in *Nicotiana tabacum*. XXVII. Pollen killer, an alien genetic locus inducing abortion of microspores not carrying it. *Genetics*. **42**: 326-335.
- Chen B. Y.**, Cheng B. F., Jorgensen R. B., and Heneen W. K. 1997. Production and cytogenetics of *Brassica campestris -alboglabra* chromosome addition lines. *Theor. Appl. Genet.* **94**: 633-640.
- Chen P. D.**, Tsujimoto H., and Gill B. S. 1994. Transfer of genes promoting homeologous pairing from *Triticum speltoides* to common wheat. *Theor. Appl. Genet.* **88**: 97-101.
- Chetelat R. T.**, Rick C. M., Cisneros P., Alpert K. B., and DeVerna J. W. 1998. Identification, transmission and cytological behavior of *Solanum lycopersicoides* Dun. monosomic alien addition lines in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Genome*. **41**: 40-50.
- Da silva F.P.**, Endrizzi J. E., Stith L. S., and Muramoto H. 1975. Chromosome pairing in triploid F1 and hexaploid F1, F2 and F3 generations of *Gossypium hirsutum* L. x *G. sturtianum* Willis. *Crop. Sci.* **15**: 872-873.
- De Vienne D.**, (1998). Les marqueurs moléculaires en génétique et biotechnologies végétales. 2e éd. Paris : INRA.
- Deodikar (1949)** Cytogenetic studies on crosses of *Gossypium anomalum* with cultivated cottons I. *Indian J. agric. Sci.* **19**: 389-399.
- Deodikar (1950)** Cytogenetic studies on crosses of *Gossypium anomalum* with cultivated cottons II. *Indian J. agric. Sci.* **20**: 399.
- Desai A.**, Chee P. W., Rong J., May O. L., and Paterson A. H. 2006. Chromosome structural changes in diploid and tetraploid genomes of *Gossypium*. *Genome*. **49**: 336-345.
- Devos K. M.** 2005. Updating the crop circle. *Curr. Opin. Plant Biology*. **8**:155-162.
- Dhaliwal H. S.**, Friebe B., Gill. K. S., and Gill B. S. 1990. Cytogenetic identification of *Aegilops squarrosa* chromosome additions in durum wheat. *Theor. Appl. Genet.* **79**: 769-774.
- D'hont A.**, Rao P. S., Feldman P., Grivet L., Islam-Faridi., Taylor P., and Glaszmann J. C. 1995. Identification and characterization of sugarcane intergeneric hybrids, *Saccharum officinarum* x *Erianthus arundinaceus*, with molecular markers and DNA in situ hybridisation. *Theor. Appl. Genet.* **91**: 320-326.
- Eberl D. F.**, Duyf J. B., and Hilliker J. A. 1993. The role of heterochromatin in the expression of a heterochromatic gene, the rolled locus of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. **134**: 277-292.
- Endrizzi J.E.**, Turcotte E.L., and Kohel R.J. (1985) Genetics, cytology, and evolution of *Gossypium*. *Adv Agron.* **23**:271–375.

- Fedak G.** 1999. Molecular aids for integration of alien chromatin through wide crosses. *Genome*. **42**: 584-591.
- Friebe B., Qi L. L., Nasuda S., Zhang P., Tuleen N. A., and Gill B. S.** 2000. Development of a complete set of *Triticum aestivum*-*Aegilops speltoides* chromosome addition lines. *Theor. Appl. Genet.* **101**: 51-58.
- Gao D., and Jung C.** 2002. Monosomic addition lines of *Beta corolliflora* in sugar beet : plant morphology and leaf spot resistance. *Plant Breeding*. **121**: 81-86.
- Gao D., Guo D., and Jung C.** 2001. Monosomic addition lines of *Beta corolliflora* Zoss in sugar beet : cytological and molecular-analysis. *Theor. Appl. Genet.* **103**: 240-247.
- Gao D., and Jung C.** 2002. Monosomic addition lines of *Beta corolliflora* in sugar beet : plant morphology and leaf spot resistance. *Plant Breeding* **121**: 81-86.
- Garriga-Cald  r   F.** 1998. Introgression of tomato chromosomes into the potato genome : an analysis through molecular marker and in situ hybridisation techniques. Ph-D Thesis, Wageningen.
- Gernand D., Rutten T., Varshney A., Rubtsova M., Prodanovic S., Br    C., Kumlehn J., Matzk F., and Houben A.** 2005. Uniparental chromosome elimination at mitosis and interphase in Wheat and Pearl Millet crosses involves micronucleus formation, progressive heterochromatinization, and DNA fragmentation. *Plant Cell*. **17**: 2431-2438.
- Guangxun T., Huajun J., Gang L., Ruifeng H., Lili Z., and Guangcun H.** 2005. Production and characterization of a complete set of individual chromosome additions from *Oryza officinalis* to *Oryza sativa* using RFLP and GISH analyzes. *Theor. Appl. Genet.* **111**: 1585-1595.
- Guo W., Wang W., Zhou B., and Zhang T.** 2006. Cross-species transferability of *G. arboreum*-derived EST-SSRs in the diploid species of *Gossypium*. *Theor. Appl. Genet.* **112**: 1573-1581.
- Gupta S. B** 1968. The unstable behavior of a chromosomal fragment of *Nicotiana plumbaginifolia* responsible for chlorophyll variegation in *N. tabacum*. *Genetics*. **59**: 453-463.
- Gupta S. B and Gupta B.** 1973. Selective somatic elimination of *Nicotiana glutinosa* chromosomes in the F1 hybrids of *N. suaveolens* and *N. glutinosa*. *Genetics*. **73**: 605-612.
- Guyomarc'h. H., Sourdille P., Charmet G., Edwards J., and Bernard M.** 2002. Characterization of polymorphic microsatellite markers from *Aegilops tauschii* and transferability to the D-genome of bread wheat. *Theor. Appl. Genet.* **104**:1164-1172.
- Haider Ali S. N., Ramana M. S., Jacobsen E., and Visser R. G. F.** (2001). Establishment of a complete series of a monosomic tomato chromosome addition lines in the cultivated potato using RFLP and GISH analyses. *Theor. Appl. Genet* **103**: 687-695.
- Han Z, Wang C, Song X, Guo W, Gou J, Li C, Chen X, and Zhang T.** (2006) Characteristics, development and mapping of *Gossypium hirsutum* derived EST-SSRs in allotetraploid cotton: **112** : 430-439 *Theor. Appl. Genet.*
- Harlan J. R. and De Wet J. M. J.** (1971). Towards a rational classification of cultivated plants. *Taxon*. **20** : 509-517.
- Hau B.** (1981a). Lignées d'addition sur *Gossypium hirsutum* L. I. Utilisation de l'hybridation interspécifique et de la méthode des lignées d'addition pour l'amélioration du cotonnier. *Cot. Fib. Trop.* **26**: 247-258.
- Hau, B.** (1981b). Lignées d'addition sur *Gossypium hirsutum* L. II. Description phénotypique de quelques lignées d'addition monosomiques de *Gossypium anomalum* et de *Gossypium stocksii*. *Cot. Fib. Trop.* **36**: 285-295.
- Hau B.** (1982). Lignées d'addition sur l'espèce *G. hirsutum* L. III. Evolution d'une collection de lignées d'addition de *G. anomalum* et de *G. stocksii* sur *G. hirsutum* après plusieurs générations d'autofécondation. *Cot. Fib.Trop.* **37**: 163-177.

- Heneen** W. K., and Jorgensen R. B. 2001. Cytology, RAPD, and seed colour of progeny plants from *Brassica rapa-alboglabra* aneuploids and development of monosomic addition lines. *Genome*. **44**: 1007-1021.
- Hutchinson** J. B., Silow R. A., and Stephens S. C. (1947). The evolution of *Gossypium*. Oxford : Univ. Press London. 160 pp.
- Iqbal** M. J., Aziz N., Saeed N. A., Zafar Y., and Malik K. A. 1997. Genetic diversity evaluation of some elite cotton varieties by RAPD analysis. *Theor. Appl. Genet.* **94** : 139-144.
- Islam** A. K. M. R., Shepherd K. W., and Sparrow D. H. B. 1981. Isolation and characterization of euplasmic wheat-barley chromosome addition lines. *Heredity*. **46**:161-174.
- Jahier** J. (1992). Techniques de cytogénétique végétale. Paris : INRA.
- Jena** K. K., and Khush S. G., (1989). Monosomic alien addition lines of rice : production, morphology, cytology and breeding behavior. *Genome* **32**: 449-455.
- Jiang** C., Wright R. J., El-Zik K., and Paterson A. H. 1998. Polyploid formation created unique avenues for response to selection in *Gossypium* (cotton). *Proc Natl. Acad. Sci. USA*. **95**: 4419-4424.
- Jiang** J., and Gill B. S. 2006. Current status and the future of fluorescence in situ hybridization (FISH) in plant genome research. *Genome*. **49**: 1057-1068.
- Jiang** J., Friebe B., and Gill B. S. 1994. Recent advances in alien gene transfer in wheat. *Euphytica*. **73**:199-212.
- Jiwen** Y., Shuxun Y., Cairui L., Wu W, Shuli F., Meizhen S., Zhongxu L., Xianlong Z., and Jinfa Z. (2007). High-density Linkage Map of Cultivated Allotetraploid Cotton Based on SSR, TRAP, SRAP and AFLP Markers. *J. Integr. Plant Biol.* **49** : 716-724.
- Kammacher** P. 1956 Les possibilités actuelles d'application de l'hybridation interspécifique à l'amélioration du cotonnier en milieu africain. *Cot. Fib. Trop.* **11**: 101-136.
- Kammacher** P., and Schwendiman J. 1969. Addition au génome de l'espèce de cotonnier *Gossypium hirsutum* de deux chromosomes de l'espèce sauvage *G. stocksii*. *Can. J. Genet. Cytol.* **11**: 169-183.
- Kaneko** Y., Natsuaki T., Bang S. W., and Matsuzawa Y. 1996. Identification and evaluation of Turnip Mosaic Virus (TuMV) resistance gene in kale monosomic addition lines of radish. *Breeding science*. **46**: 117-124.
- Kato** A., Vega J. M., Han F., Lamb J. C. and Birchler J. A. 2005. Advances in plant chromosome identification and cytogenetic techniques. *Curr. Opin. Plant Biology*. **8**: 148-154.
- Koba** T, Handa T., and Shimada T. 1991. Efficient production of wheat-barley hybrids and preferential elimination of barley chromosomes. *Theor. Appl. Genet.* **81**: 285-292.
- Koto** E. (1983). Tentative d'utilisation de l'espèce sauvage diploïde *G. longicalyx* pour l'amélioration de l'espèce cultivée tétraploïde *G. hirsutum* L. par la méthode des lignées d'addition et de substitution. Thèse de doctorat. Université d'Orsay, 91p.
- Kynast** R.G., Riera-Lizarazu O., Vales M.I., Okagaki R.J., Maquieira S.B., Chen G., Ananiev E.V., Odland W.E., Russell C.D., Stec A.O., Livingston S.M., Zaia H.A., Rines H.W., and Phillips R.L. 2001. A complete set of maize individual chromosome additions to the oat genome. *Plant Physiol.* **125**:1216-27.
- Lacape**, J. M., Nguyen T. B., Thibivilliers S., Courtois B., Bojinov B.M., Cantrell R.G., Burr B., and Hau B. (2003). A combined RFLP-SSR-AFLP map of tetraploid cotton based on a *Gossypium hirsutum* x *Gossypium barbadense* backcross population. *Genome* **46**: 612-626.
- Lapitan** N. L. V., Sears R. G., and Gill B. S. 1984. Translocations and other karyotypic structural changes in wheat x rye hybrids regenerated from tissue culture. *Theor. Appl. Genet.* **68**: 547-554.
- Laurie** D. A. and Bennett M. D. 1989. The timing of chromosome elimination in hexaploid wheat × maize crosses. *Genome*. **32**: 953–961.



- Liu S.**, Cantrell R. G., McCarty Jr. J. C., and Stewart J. McD. 2000 Simple sequence repeat-based assessment of genetic diversity in cotton race stock accessions. *Crop Sci.* **40**: 1459 – 1469.
- Louant B. P.**, Maréchal R., and Baudoin J. P. (1977). Les facteurs agissant sur les transferts de matériel génétique chez les hybrides bispécifiques. Principes utiles aux sélectionneurs et perspectives dérivant de l'étude des croisements interspécifiques dans le genre *Gossypium*. *Cot. Fib. Trop.* **32**: 39-57.
- Maan S.S.** 1975 Exclusive preferential transmission of an alien chromosome in common wheat. *Crop. Sci.* **15**: 287-292.
- Maguire M. P.** 1963. High transmission frequency of a *Tripsacum* chromosome in corn. *Genetics.* **48**: 1185-1194.
- Marechal (1972)** Comportement méiotique chez l'hybride *Gossypium hirsutum* L. x *Gossypium areysianum* (DEF). HUTCH. aux niveaux triploïde, hexaploïde et pentaploïde. *Cot. Fib.Trop.* **27**: 205-211.
- Masoudi-Nedjad A.**, Nasuda S., Bihoreau M. T., Waugh R., and Endo T. R. 2005. An alternative to radiation hybrid mapping for large-scale genome analysis in barley. *Mol. Gen. Genomics.* **274**: 589-594.
- Masoudi-Nedjad A.**, Nasuda S., McIntosh R. A., and Endo T. R. 2002. Transfer of rye chromosome segments to wheat by a gametocidal system. *Chrom. Res.***10**: 349-357.
- McClintock B.** 1941. The stability of Broken ends of chromosomes in *Zea mays*. *Genetics.* **26**: 234-282.
- McClintock B.** 1950. The origin and behavior of mutable loci in maize. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **36**: 344-355.
- McFadden H.**, Beasley D., and Brubaker C. L. 2004. Assessment of *Gossypium sturtianum* as potential sources of Fusarium wilt resistance. *Euphytica.* **138**: 61-72.
- Menzel M. Y.** 1952. Polygenomic hybrids in *Gossypium*. III. Somatic reduction in a phenotypically-altered branch of a three-species hexaploid. *Amer. Jour. Bot.* **39**: 625-633.
- Menzel, M.Y.** and Brown, M.S. 1954. The significance of multivalent formation in three-species *Gossypium* hybrids. *Genetics.* **39**: 546–557.
- Menzel, M.Y.**, and Brown, M.S. 1952. Viable deficiency-duplications from a translocation in *Gossypium hirsutum*. *Genetics.* **37**: 678–692.
- Mergeai G.** 1992. Utilisation du cotonnier sauvage *Gossypium areysianum* (Defl.) Hutch. Pour l'amélioration de l'espèce cultivée *Gossypium hirsutum* L. Thèse de doctorat. Faculté des Sciences Agronomiques. Gembloux. 168 p.
- Mergeai G.** 2006 Introgressions interspécifiques chez le cotonnier. *Cah. Agric.* **15**: 135-143.
- Mergeai G.**, Noel J.M., Louwagie J., and Baudoin J. P. 1993. Utilisation du cotonnier sauvage *Gossypium areysianum* pour l'amélioration de l'espèce cultivée *G. hirsutum* : description de deux nouvelles lignées d'addition monosomiques. *Cot. Fib. Trop.* **49**:231-251.
- Miller T. E** , Hutchinson J., and Chapman V. 1982. Investigation of a preferentially transmitted *Aegilops sharonensis* chromosome in wheat. *Theor. Appl. Genet.* **61**: 27-33.
- Moore R. C.** and Purugganan M. D. 2005. The evolutionary dynamics of duplicate genes. *Curr.Opin. Plant Biology.* **8**: 122-128.
- N'Guessan O. K.**, Baudoin J. P., D'Hont A., and Mergeai G. Classical and molecular cytogenetics of *Gossypium*. In : Genetics and Genomics of Cotton. Paterson, Andrew H. (Ed.). Springer, New York, USA, 2008, 500 p
- Nasuda S.**, Friebe B., and Gill B. S. 1998. Gametocidal genes induce chromosome breakage in the interphase prior to the first mitotic cell division of the male gametophyte in wheat. *Genetics* **149**: 1115-1124.

- Nguyen T. B.**, Giband M., Brottier P., Risterucci A.M., and Lacape J.M. 2004. Wide Coverage of the tetraploid cotton genome using newly developed microsatellite markers. *Theor. Appl. Genet.* **109** : 167-75.
- Peakall R.**, Gilmore S., Keys W., Morgante M., and Rafalski A. 1998. Cross-species amplification of soybean (*Glycine max*) simple sequence repeats within the genus and other legume genera : Implications for the transferability of SSRs in plants. *Mol. Biol. Evol.* **15**: 1275-1287.
- Pedersen C.**, and Linde-Laursen I. 1995. The relationship between physical and genetic distances at the *Hor1* and *Hor2* loci of barley estimated by two-colour fluorescent in situ hybridization. *Theor. Appl. Genet.* **91**: 941-946.
- Poisson C.** 1970. Contribution à l'étude de l'hybridation interspécifique dans le genre *Gossypium* : transfert de matériel génétique de l'espèce diploïde sauvage *G. anomalum* à l'espèce cultivée *G. hirsutum*. Thèse Doct. Université d'Orsay, 76 p.
- Poisson C.**, Schwendiman J., and Kammacher P. 1969. Mise en évidence d'une homéologie chromosomique entre *Gossypium anomalum* Wav. et Peyr. Et *G. stocksii*. *C. R. Acad. Sc. Paris.* **268** : 1597-1599.
- Potz H.**, Schubert V., Houben A., Schubert I., and Weber W. E. 1996. Aneuploids as a key for new molecular cloning strategies: development of DNA markers by microdissection using *Triticum aestivum*-*Aegilops markgrafii* chromosome addition line. *Euphytica.* **89**: 41-47.
- Reinisch A. J.**, Dong J. M., Brubaker C. L., Stelly D. M., Wendel J. F., Paterson A. H. 1994 A detailed RFLP map of cotton, *Gossypium hirsutum* x *Gossypium barbadense* : chromosome organization and evolution in a disomic polyploid genome. *Genetics.* **138**: 829-847.
- Rhoades M. M.** 1940. Studies of a telocentric chromosome in maize with reference to the stability of its centromere. *Genetics.* **25**: 483-520.
- Rhoades M. M.** 1942. Preferential segregation in maize. *Genetics.* **27**: 395-407.
- Riera-Lizarazu O.**, Rines H. W., Philips R. P. 1996. Cytological and molecular characterization of oat x maize partial hybrids. *Theor. Appl. Genet.* **93**: 123-135.
- Rong J.**, Abbey C., Bowers J. E., Brubaker C. L., Chang C., Chee P. W., Delmonte T. A., Ding X., Garza J. J., Marler B. S., Park C., Pierce G. J., Rainey K. M., Rastogi V. K., Schulze S. R., Trolinder N. L., Wendel, J. F., Wilkins T. A., Williams-Coplin T. D., Wing R. A., Wright R. J., Zhao X., Zhu L., Paterson A. H., 2004. A 3347-locus genetic recombination map of sequence-tagged sites reveals features of genome organization, transmission and evolution of cotton (*Gossypium*). *Genetics.* **166**: 389-417.
- Rooney W. L.**, Stelly D. M., and Altman D. W. 1991a. Identification of four *Gossypium sturtianum* monosomic alien addition derivatives from a backcrossing program with *G. hirsutum*. *Crop Sci.* **31**: 337-341.
- Rooney W. L.** and Stelly D. M. 1991b. Preferential transmission and somatic elimination of a *Gossypium sturtianum* chromosome chromosome in *G. hirsutum*. *Crop Sci.* **82**: 151-155.
- Schwarzacher T.**, Ananthawat-Jonsson. K., Harrison G. E., Islam A. K. M. R., Jia J. Z., King I. P., Leitch A. R., Miller T. E., Reader S. M., Rogers W. J., Shi M., and Heslop-Harrison J. S. (1992). Genomic in situ hybridisation to identify alien chromosomes and chromosome segments in wheat. *Theor. Appl. Genet.* **84**: 778-786.
- Schwendiman** (1978) L'amélioration du cotonnier *Gossypium hirsutum* par hybridation interspécifique : utilisation des espèces *G. barbadense* et *G. stocksii*. Thèse de Doctorat. Université d'Orsay, 164 p.
- Sears E. R** 1993. Use of radiation to transfer alien chromosome segments to wheat. *Crop. Sci.* **33**: 897-901.
- Shi F.** and Endo T. R. 2000. Genetic induction of chromosomal rearrangements in barley chromosome 7H added to common wheat. *Chromosoma.* **109**:358-363.

- Stewart** J.M. 1995. Potential for crop improvement with exotic germplasm and genetic engineering. p. 313-337. In G.A. Constable and N.W. Forrester (ed.) Challenging the future. Proc. World Cotton Res. Conf.- 1, Brisbane, Australia. 14-17 Feb. 1994. CSIRO, Narrabri, NSW, Australia.
- Suen** D. F., Wang. C. K., Lin R. F., Kao Y. Y., Lee F. M., and Chen C. C. 1997. Assignment of DNA markers to *Nicotiana sylvestris* chromosomes using monosomic alien addition lines. *Theor. Appl. Genet.* **94**: 331-337.
- Tagu** D. (1999). Principes des techniques de biologie moléculaire. Paris : INRA.
- Tatineni** V, Cantrell R. G., and Davis D. D .1996. Genetic diversity in elite cotton germplasm determined by morphological characteristics and RAPDs. *Crop Sci.* **36**: 186 – 192.
- Tsujimoto** H., Usami N., Hasegawa K., Yamada T., Nagaki K., and Sasakuma T. 1999. De novo synthesis of telomere sequences at the healed breakpoints of wheat deletion chromosomes. *Mol. Gen. Genet.* **262**: 851-856.
- Van Esbroeck** G., and Bowman D. T. 1998. Cotton germplasm diversity and its importance to cultivar development. *The Journal of Cotton Science.* **2**: 121-129.
- Vroh Bi** I., Baudoin J. P., Hau B., and Mergeai G. 1999. Development of high-gossypol cotton plants with low-gossypol seeds using tri-species bridge crosses and in vitro culture of seed embryos. *Euphytica.* **106**: 243-251.
- Walters** M. S. 1950. Spontaneous breakage and reunion of meiotic chromosomes in the hybrid *Bromus trinii* x *B. maritimus*. *Genetics.***35**: 11-37
- Wang** K., Song X, Han Z., Guo W., Yu J. Z., Pan J. S. J., Kohel R. J., and Zhang T. 2006. Complete assignment of the chromosomes of *Gossypium hirsutum* L. by translocation and fluorescence *in situ* hybridization mapping. *Theor. Appl. Genet.* **113**: 73-80.
- Wendel** J. F., Brubaker C. L., and Percival A. E. 1992. Genetic diversity in *Gossypium hirsutum* and the origin of Upland cotton. *Amer. J. Bot.* **79**: 1291 – 1310.
- Wendel**, J. F., and Cronn R. C., (2003) Polyploidy and the evolutionary history of cotton. *Adv. in Agron.* **78**: 139-186.
- Zagbaï** H. S., Berti F., and Lebailly P.(2006). Impact de la dynamique cotonnière sur le développement rural. Etude de cas de la région de Korhogo, au Nord et au centre de la Côte-d'Ivoire. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **10** : 325-334.