

Note Technique

Nouvelles perspectives concernant la méthodologie à suivre pour l'introgression chez le cotonnier cultivé (*Gossypium hirsutum* L.) du caractère retard à la morphogénèse des glandes à gossypol

G. Mergeai

Unité d'enseignement et de recherche de phytotechnie des régions chaudes, Faculté des sciences agronomiques de Gembloux, 2 passage des Déportés, B-5030 Gembloux, Belgique.

Résumé

Des allotétraploïdes de synthèse ont été réalisés entre, d'une part, des cotonniers australiens (*G. sturtianum* Willis et *G. australe* F. von Mueller) et, d'autre part, des espèces diploïdes appartenant aux génomes A (*G. arboreum* L.) et D (*G. thurberi* Torado et *G. davidsonii* Kellogg). L'observation de leurs graines a permis de mettre en évidence le fonctionnement préférentiel du mécanisme

répresseur de la morphogénèse des glandes à gossypol des espèces australiennes vis-à-vis des cotonniers diploïdes asiatiques porteurs du loci GL2. Le matériel amphidiploïde, au sein duquel le retard à l'apparition des glandes à gossypol devrait pouvoir le mieux s'exprimer, serait du type GL2GL2gl3gl3. Un programme de croisements est proposé pour l'obtention d'un cotonnier dont seules les graines seraient exemptes de glandes à gossypol.

MOTS-CLES : *Gossypium hirsutum* L., hybrides interspécifiques, introgression, graines glandless, glandes à gossypol.

Introduction

Presque toutes les espèces du genre *Gossypium* présentent dans l'ensemble des tissus de leur partie aérienne, y compris les graines, de petites glandes lysigènes appelées glandes à gossypol (STANDFORD et VIEHOEVER, 1918). Elles produisent plusieurs substances terpénoïdes dont le gossypol est la plus connue. La présence de gossypol dans l'amande de la graine est indésirable, car ce produit est hautement toxique pour les animaux monogastriques. L'huile et les tourteaux produits par pression des graines en contiennent des quantités importantes dont l'élimination exige le recours à des procédés qui dénaturent la qualité du contenu protéique des tourteaux et diminuent sa valeur alimentaire. Un phénotype de cotonnier totalement dépourvu de glandes à gossypol a été observé par Mc MICHAEL (1954).

L'absence totale de glandes à gossypol chez cette plante s'explique par l'apparition d'allèles récessifs au niveau des loci GL2 et GL3 de *G. hirsutum*. Les travaux de nombreux chercheurs ont démontré, par la suite, qu'au

moins six loci indépendants interviennent dans le contrôle de la formation et de la distribution des glandes à gossypol (PAULY, 1979). La présence de gossypol dans les organes de la partie aérienne du cotonnier agit comme un moyen de défense naturel contre les agressions de certains insectes (BOTTGER *et al.*, 1964). Contrairement à ce qui se passe chez l'espèce cultivée *Gossypium hirsutum* L., les espèces diploïdes sauvages australiennes du genre *Gossypium* produisent des graines dépourvues de gossypol alors que tous leurs autres organes en contiennent (FRYXELL, 1965). Chez ces plantes, le ou les gènes en cause pour la formation des glandes à gossypol semblent être sous le contrôle d'un mécanisme répresseur qui agit jusqu'à l'étalement des cotylédons et la formation de chlorophylle par la jeune plantule.

L'introgression chez le cotonnier cultivé du mécanisme répresseur de la morphogénèse des glandes à gossypol dans la graine est hautement souhaitable ; cela permettrait la transformation de *G. hirsutum* en une plante

véritablement vivrière, tout en préservant un de ses moyens naturels de défense. Les recherches menées jusqu'à présent ont porté sur un matériel issu de croisements effectués entre *G. hirsutum* et des espèces diploïdes australiennes. La majorité des hexaploïdes et des pentaploïdes obtenus, en croisant *G. hirsutum* par *G. sturtianum* Willis ou *G. australe* F. von Mueller, possèdent des teneurs en gossypol dans leurs graines plus faibles que celles du parent cultivé et une densité normale de glandes à gossypol dans les autres parties de la plante (MURAMATO, 1969; DILDAY, 1986; KOTO, 1989). Le rétrocroisement de ces pentaploïdes par *G. hirsutum* a donné naissance à des lignées d'addition possédant des taux variables de gossypol dans les graines et dans les feuilles. Si un type d'addition multiple de *G. sturtianum* sur *G. hirsutum* semble avoir produit des graines démunies de glandes à gossypol

(ALTMAN *et al.*, 1987), cette caractéristique ne se retrouve actuellement chez aucune des lignées d'addition monosomique qui ont été créées en croisant *G. hirsutum* par des cotonniers australiens (KOTO, 1989; ROONEY *et al.*, 1991).

Afin d'essayer de mieux comprendre le phénomène de retard à l'apparition des glandes à gossypol dans la graine, il a semblé intéressant d'étudier ses possibilités d'expression au niveau d'espèces diploïdes intimement apparentées à chacun des deux sous-génomes constitutifs du cotonnier cultivé. Pour ce faire, nous avons observé les graines produites par des allotétraploïdes de synthèse issus de croisements réalisés entre, d'une part, des cotonniers australiens de génome C et, d'autre part, des espèces diploïdes appartenant aux génomes A ou D.

Matériels et méthodes

Au sein de la collection de cotonniers de l'Unité de phytotechnie des régions chaudes (MARECHAL, 1983), trois allotétraploïdes de synthèse ont été obtenus par colchipoïdisation d'hybrides diploïdes stériles; ils ont été réalisés en croisant des cotonniers australiens par des espèces diploïdes appartenant aux génomes A ou D. Il s'agit des tétraploïdes synthétiques suivants: (*G. arboreum* L. (A2) x *G. sturtianum* (C1)) 2, (*G. thurberi* (D1) x *G.*

sturtianum (C1)) 2 et (*G. Davidsonii* (D3-d) x *G. australe* (C3)) 2.

Après avoir été débarrassées de leurs téguments et trempées dans l'eau pendant une heure, les graines de ces trois allotétraploïdes ainsi que celles de leurs parents diploïdes respectifs ont été observées au stéréomicroscope. La planche I présente les photographies des graines analysées pour chaque croisement.

Résultats et discussion

Les photos de la planche I montrent clairement que le mécanisme répresseur de la formation des glandes à gossypol dans la graine fonctionne également dans le cas de tétraploïdes synthétiques. Pour tous les hybrides considérés, les graines des allotétraploïdes sont moins riches en glandes que celles de leur parent diploïde asiatique (génome A) ou américain (génome D).

Chez ces allotétraploïdes de synthèse, l'efficacité du mécanisme répresseur varie en fonction du génome qui est associé aux cotonniers australiens. Alors que les graines produites par le tétraploïde (*G. arboreum* x *G. sturtianum*) 2 sont quasiment exemptes de glandes à gossypol, les semences des tétraploïdes créés avec des espèces du génome D, (*G. thurberi* x *G. sturtianum*) 2 et (*G. davidsonii* x *G. australe*) 2, en présentent toujours un plus grand nombre. *G. thurberi* induit l'apparition d'une quantité de glandes nettement plus faible que *G. Davidsonii*. Les glandes à gossypol produites par l'allotétraploïde (*G. thurberi* x *G. sturtianum*) 2 ont tendance à se concentrer à la périphérie des feuilles cotylédonnaires.

Les loci majeurs (GL2, GL3), responsables de la synthèse du gossypol chez le cotonnier, se situent au niveau de chacun des sous-génomes (Ah et Dh) constitutifs de *G.*

hirsutum (LEE, 1965). Il est, d'après nos résultats, logique de supposer que le mécanisme répresseur des espèces australiennes agit moins efficacement envers le génome D (loci GL3) qu'envers le génome A (loci GL2).

A la lumière de ces observations, il apparaît comme très hautement improbable qu'un hexaploïde issu du croisement de *G. hirsutum* (glandes GL2GL2GL3GL3) par un cotonnier australien produise systématiquement des graines totalement dépourvues de glandes à gossypol. De fait, aucun matériel de ce type n'a encore pu être isolé sur fond génique *G. hirsutum* «glandes» (ALTMAN *et al.*, 1987; KOTO, 1989). Etant donné l'efficacité préférentielle du mécanisme répresseur vis-à-vis des espèces du génome A, on peut supposer que le matériel amphidiploïde au sein duquel il pourrait le mieux s'exprimer devrait être du type GL2GL2gl3gl3.

La vérification de cette hypothèse implique la création, puis le doublement du nombre chromosomique d'un hybride triploïde du type *G. hirsutum* monomère GL2 x *Gossypium* sp. australien.

En cas de fonctionnement strict du mécanisme répresseur de la morphogénèse des glandes à gossypol sur fond *G.*

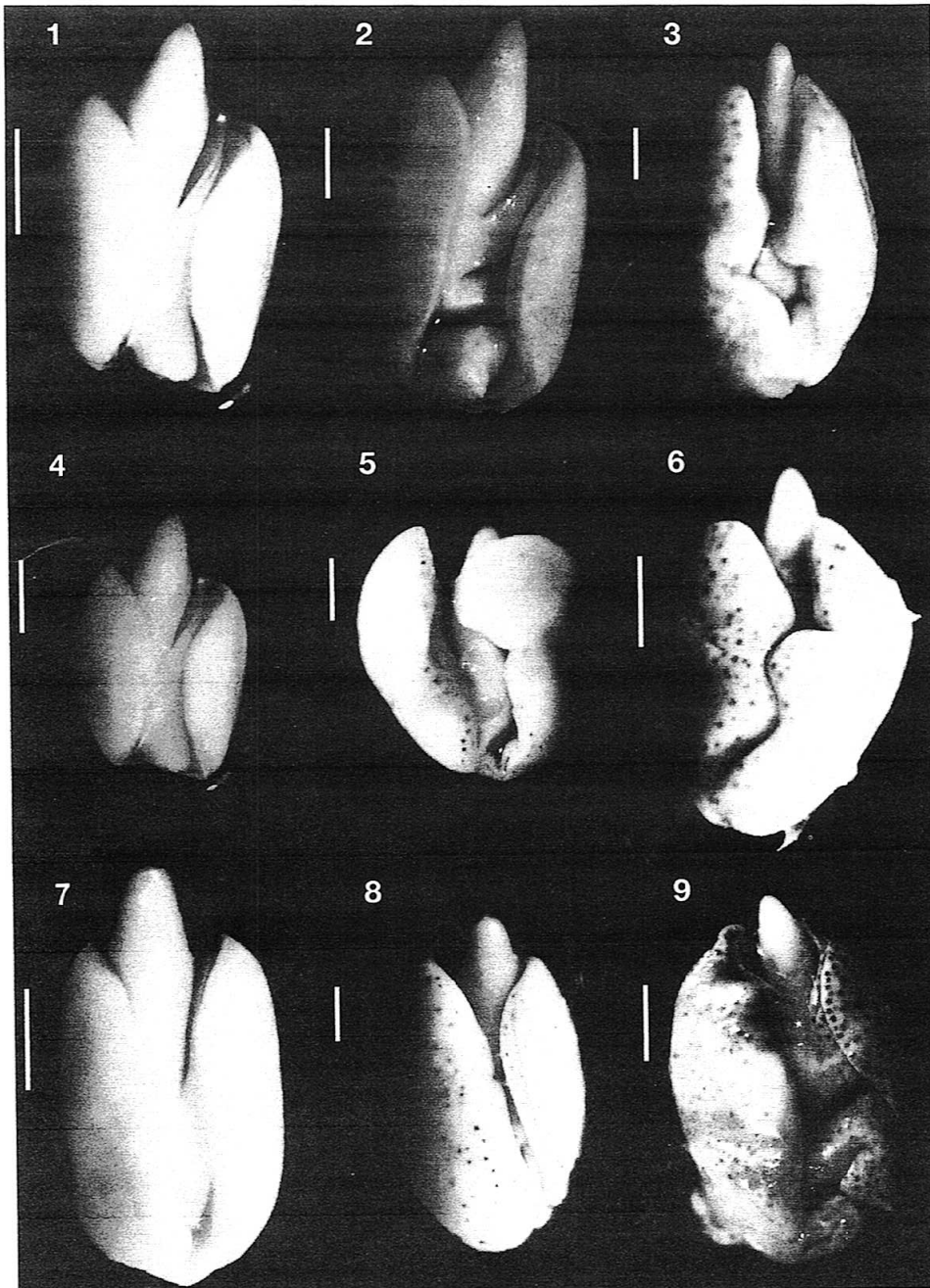


Planche I :
Aspect des graines observées au stéréomicroscope après élimination des téguments et gonflement dans l'eau pendant une heure.

Photos n° 1 : *G. sturtianum* (2C1) ; n° 2 : (*G. sturtianum* x *G. arboreum*) 2 (A2C1) 2 ; n° 3 : *G. arboreum* (2A2) ; n° 4 : *G. sturtianum* (2C1) ; n° 5 : (*G. thurberi* x *G. sturtianum*) 2 (D1C1) 2 ; n° 6 : *G. thurberi* (2D1) ; n° 7 : *G. austral* (2C3) ; n° 8 : (*G. davidsonii* x *G. australe*) (D3-dC3) 2 ; n° 9 : *G. davidsonii* (2D3-d).

Le trait situé à côté de chaque graine représente une longueur d'1 mm.

Plate I:

Appearance of seeds observed under a binocular microscope after integument removal and soaking in water for one hour.

Photos n° 1 : *G. sturtianum* (2C1) ; n° 2 : (*G. sturtianum* x *G. arboreum*) 2 (A2C1) 2 ; n° 3 : *G. arboreum* (2A2) ; n° 4 : *G. sturtianum* (2C1) ; n° 5 : (*G. thurberi* x *G. sturtianum*) 2 (D1C1) 2 ; n° 6 : *G. thurberi* (2D1) ; n° 7 : *G. austral* (2C3) ; n° 8 : (*G. davidsonii* x *G. australe*) (D3-dC3) 2 ; n° 9 : *G. davidsonii* (2D3-d).

The line beside each seed represents a length of 1 mm.

hirsutum monomère GL2, l'hexaploïde ainsi créé pourra servir de base à une tentative d'introgression de ce caractère, grâce à la technique des lignées d'addition monosomique décrite par HAU (1981). Dans cette éventualité, le parent récurrent à utiliser pour obtenir les types d'addition devra être monomère pour l'allèle GL2.

En conclusion, l'obtention de graines par des allotétraploïdes synthétiques, issus de croisements réalisés entre des cotonniers australiens et des espèces diploïdes

appartenant au génome A ou D, ouvre de nouvelles perspectives sur la méthodologie à suivre pour une introgression du retard à la morphogénèse des glandes à gossypol chez le cotonnier cultivé.

L'utilisation de cotonniers monomères GL2 semble être une voie intéressante à explorer en vue de créer un nouveau cotonnier pourvu de glandes dans toutes ses parties aériennes à l'exception des graines.

Références bibliographiques

- ALTMAN D. W., STELLY D. M., KOHEL R. J., 1987. - Introgression of the glanded-plant and glandless-seed trait from *Gossypium sturtianum* Willis into cultivated cotton using ovule culture. *Crop Sci.*, 27, 880-884.
- BOTTGER G. T., SHEEHAN E. T., LUKEFAHR M. J., 1964. - Relation of gossypol content of cotton plants to insect resistance. *J. Econ. Entomol.*, 57, 283-285.
- DILDAY R. H., 1986. - Development of cotton plant with glandless seeds and glanded foliage and fruiting forms. *Crop science*, 26, 639-641.
- FRYXELL P. A., 1965. - A revision of the Australian species of *Gossypium* with observation on the occurrence of *Thespesia* in Australia. *Austr. J. Bot.*, 13, 71-102.
- HAUB., 1981. - Lignées d'addition sur l'espèce *G. hirsutum* L. I. Utilisation de l'hybridation interspécifique et de la méthode des lignées d'addition pour l'amélioration du cotonnier. *Coton Fibres Trop.*, 36, 247-258.
- KOTO E., 1989. - Tentative de transfert du caractère «retard à la morphogénèse des glandes à gossypol» I. Caractéristiques des hexaploïdes *G. hirsutum* x *G. sturtianum* et *G. hirsutum* x *G. australe*. *Ire Conférence de la recherche cotonnière africaine*, Lomé, Togo, 31 janv. - 2 fév., 1989, IRCT, Montpellier, tome I, 167-173.
- LEE J. A., 1965. - The genomic allocation of the principal foliar-gland loci in *Gossypium* and *Gossypium barbadense*. *Evolution*, 19, 182-188.
- MARECHAL R., 1983. - Une collection d'hybrides interspécifiques du genre *Gossypium*. *Coton Fibres Trop.*, 38, 240-246.
- Mc. MICHAEL S.C., 1954. - Glandless boll in upland cotton and its use in the study of natural crossing. *Agronomy J.*, 46, 527-528.
- MURAMATO H., 1969. - Hexaploid cotton : some plant and fiber properties. *Crop Sci.*, 9, 27-29.
- PAULY G., 1979. - Les glandes à pigment du cotonnier : aspect génétique et sélection de variétés «glandless» et «high gossypol». *Coton Fibres Trop.*, 34, 380-401.
- ROONEY W. L., STELLY D. M., ALTMAN D. W., 1991. - Identification of four *Gossypium sturtianum* monosomic alien addition derivatives from a backcrossing program with *G. hirsutum*. *Crop Sci.*, 31, 337-341.
- STANDFORD E., VIEHOEVER A., 1918. - Chemistry and histology of the glands of the cotton plant, with notes on the occurrence of similar glands in related plants. *J. Agr. Res.*, 13, 419-435.

New perspectives concerning the methodology to be used for introgression of the glanded-plant and glandless-seed character in cultivated cotton (*Gossypium hirsutum* L.)

G. Mergeai

Abstract

Synthetic allotetraploids were obtained between Australian cotton species (*G. sturtianum* Willis and *G. australe* F. von Mueller), and diploid species belonging to genomes A (*G. arboreum* L.) and D (*G. thurberi* Torado and *G. davidsonii* Kellogg). Observation of their seeds revealed the preferential functioning of the gossypol glands morphogenesis repression mechanism in the Australian

species with respect to the Asian diploid varieties bearing locus GL2. The amphidiploid material, in which the delayed appearance of gossypol glands should be most clearly expressed, is probably of the GL2GL2gl3gl3 type. A crossing programme is proposed to obtain a variety in which the seeds alone would not have gossypol glands.

KEY WORDS: *Gossypium hirsutum* L., interspecific hybrids, introgression, glandless seeds, gossypol glands.

Introduction

Almost all the species from the *Gossypium* genus have small lysigenous glands commonly called a «pigment glands» or «gossypol glands» in most of the tissues in the aerial part of the plant (STANDFORD and VIEHOVER, 1918). They produce several terpenoid substances, of which gossypol is the best known. The presence of gossypol in the seed kernel is undesirable, since it is highly toxic to monogastric animals. Oil and cake produced by pressing the seeds contain large quantities of gossypol, and its elimination involves procedures that alter the quality of the protein contained in the cake and reduce its food value. A cotton phenotype totally devoid of pigment glands has been observed by McMICHAEL (1954).

The total lack of gossypol glands in this plant can be explained by the appearance of recessive alleles in loci GL2 and GL3 of *G. hirsutum*. Many researchers have shown that at least six independent loci are involved in controlling gossypol gland formation and distribution (PAULY, 1979). The presence of gossypol in the organs of the aerial part of cotton plants acts as a natural defence mechanism against attacks by certain insects (BOTTGER *et al.*, 1964). Unlike the cultivated species *Gossypium hirsutum* L., the wild Australian diploid species from the *Gossypium* genus produce gossypol-free seeds, although

all their other organs contain it (FRYXELL, 1965). In these plants, the gene or genes involved in gossypol glands formation seems to be controlled by a repressive mechanism which acts until the cotyledons open and the young plantlets begin to form chlorophyll.

The introgression in cultivated cotton of the mechanism that represses gossypol glands morphogenesis in the seeds is highly desirable; it would transform *G. hirsutum* into a true food crop, whilst preserving one of its natural defence mechanisms. The research carried out to date has concentrated on material obtained by crossing *G. hirsutum* with Australian diploid species. Most of the hexaploids and pentaploids obtained by crossing *G. hirsutum* with *G. sturtianum* Willis or *G. australe* F. von Mueller have lower seed gossypol contents than the cultivated parent and a normal gossypol concentration in the other parts of the plant (MURAMATO, 1969; DILDAY, 1986; KOTO, 1989). Backcrossing these pentaploids with *G. hirsutum* produced addition families with varying gossypol contents in the seeds and leaves. Whereas a multiple addition of *G. sturtianum* on *G. hirsutum* appears to produce seeds with no gossypol glands (ALTMAN *et al.*, 1987), this characteristic is not currently found in any of the monosomic addition families obtained by crossing *G. hirsutum* with Australian varieties (KOTO, 1989; ROONEY *et al.*, 1991).

In order to acquire a better understanding of the delayed appearance of gossypol glands in seeds, we felt it would be interesting to study the possibilities of expression in diploid species closely related to each of the two sub-genomes

making up cultivated cotton. To this end, we observed the seeds produced by synthetic allotetraploids obtained by crossing Australian cotton varieties from genome C with diploid species from genomes A or D.

Material and methods

Within the cotton collection at the Unit for Phytotechnics in Hot Regions (MARECHAL, 1983), three synthetic allotetraploids were obtained by colchicopolyloidization of sterile diploid hybrids; this involved crossing Australian cotton species with diploid species from genomes A or D. The following synthetic tetraploids were produced: (*G. arboreum* L. (A2) x *G. sturtianum* (C1))₂, (*G. thurberi*

(D1) x *G. sturtianum* (C1))₂ and (*G. Davidsonii* (D3-d) x *G. australe* (C3))₂.

The seed integuments were removed and the seeds of the three allotetraploids were soaked for one hour and then observed under a binocular microscope, along with seeds from their respective diploid parents. Plate 1 contains photographs of the seeds analysed for each cross.

Results and discussion

The photos on plate 1 clearly show that the mechanism that represses gossypol glands formation in the seeds also functions in synthetic tetraploids. For all the hybrids considered, the allotetraploid seeds had fewer glands than their Asian (genome A) or American diploid parent (genome D).

In these synthetic allotetraploids, the effectiveness of the repressive mechanism varies depending on the genome that is associated with the Australian varieties. Whereas the seeds produced by the (*G. arboreum* x *G. sturtianum*)₂ tetraploid are almost totally devoid of gossypol glands, the seeds of tetraploids obtained with species from genome D (*G. thurberi* x *G. sturtianum*)₂ and (*G. davidsonii* x *G. australe*)₂ always have more. *G. thurberi* induces the appearance of a much smaller number of glands than *G. davidsonii*. The gossypol glands produced by the (*G. thurberi* x *G. sturtianum*)₂ allotetraploid tend to congregate on the edge of the cotyledonary leaves.

The major loci (GL2, GL3), which are responsible for gossypol synthesis in cotton, are found in each of the sub-genomes (Ah and Dh) making up *G. hirsutum* (LEE, 1965). In view of our results, it is logical to assume that the repressive mechanism in Australian species is less effective as regards genome D (locus GL3) than genome A (locus GL2).

In the light of these observations, it seems highly unlikely that a hexaploid obtained by crossing *G. hirsutum* (glanded GL2GL2GL3GL3) with an Australian species will systematically produce seeds totally devoid of gossypol glands. No material of this type has yet been isolated from

a *G. hirsutum* glanded genetic background (ALTMAN *et al.*, 1987; KOTO, 1989). Given the preferential effectiveness of the repressive mechanism as regards species from genome A, it can be assumed that the amphidiploid material in which it will best be expressed should be of the GL2GL2g13g13 type.

In order to check this hypothesis, it will be necessary to create and then double the chromosomal number of a *G. hirsutum* GL2 monomeric x Australian *Gossypium* sp. type triploid hybrid.

In the event of strict functioning of the mechanism that represses gossypol glands morphogenesis on a *G. hirsutum* GL2 monomeric background, the hexaploid created could be used as a basis for attempts to introgress this character, using the monosomic addition family technique described by HAU (1981). If this is the case, the recurrent parent used to obtain addition types will have to be a monomer for allele GL2.

In conclusion, obtaining seeds from synthetic allotetraploids produced by crossing Australian cotton varieties and diploid species from genomes A or D opens up new perspectives concerning the methodology to be used for introgressing the glanded-plant and glandless-seed trait in cultivated cotton.

The use of GL2 monomeric cotton varieties seems to be an interesting line of research for producing a new cotton variety with glands in all its aerial parts except for the seeds.

Nuevas perspectivas referentes a la metodología que se ha de seguir para la introgresión en el algodónero cultivado (*Gossypium hirsutum* L.) del carácter retraso en la morfogénesis de las glándulas de gopipol

G. Mergeai

Resumen

Se han realizado alotetraploides de síntesis entre, por una parte, algodóneros australianos (*G. sturtianum* Willis y *G. australe* F. Von Mueller) y, por otra parte, especies diploides pertenecientes a los genomas A (*G. arboreum* L.) y D (*G. thurberi* Torado y *G. davidsonii* Kellog). La observación de sus semillas ha permitido poner de manifiesto el funcionamiento preferencial del mecanismo represor de la morfogénesis de las glándulas de gopipol de las

especies australianas frente a los algodóneros diploides asiáticos portadores del loci GL2. El material anfidiplóide, en el cual el retraso en la aparición de las glándulas de gopipol debería poder expresarse mejor, sería del tipo GL2GL2 gl3 gl3. Se propone un programa de cruzamientos para la obtención de un algodónero en el cual sólo las semillas serían exentas de glándulas de gopipol.

PALABRAS CLAVES : *Gossypium hirsutum* L., híbridos interspecíficos, introgresión, semillas glandless, glándulas de gopipol.