

L'étiollement est un facteur d'induction de l'embryogenèse somatique au cours de la callogenèse chez deux variétés récalcitrantes de cotonnier (*Gossypium hirsutum* L.) cultivées en Côte d'Ivoire

Justin Yatty Kouadio ⁽¹⁾, Mongomaké Koné ⁽¹⁾, Yao Djè ⁽¹⁾, Marie Anne D'Almeida ⁽²⁾, Michel Zouzou ⁽³⁾

⁽¹⁾ Laboratoire de Biologie et Physiologie végétale. UFR des Sciences de la Nature. Université d'Abobo Adjamé. 02 BP 801 Abidjan 02 (Côte d'Ivoire). E-mail : satyclan@yahoo.fr

⁽²⁾ Groupe d'Études et de Recherche en Microscopie électronique (GERME). 02 BP 12 Abidjan 02 (Côte d'Ivoire).

⁽³⁾ Laboratoire de Physiologie végétale. UFR Biosciences. Université de Cocody. 22 BP 582 Abidjan 22 (Côte d'Ivoire).

Reçu le 24 juin 2003, accepté le 22 mars 2004.

La culture de tissu *in vitro* de deux variétés de cotonnier (*Gossypium hirsutum* L.), ISA205 N et ISAGL 7, cultivées en Côte d'Ivoire a été initiée à partir d'hypocotyles provenant de plantules étiolées (dépourvus de chlorophylle) et de plantules non étiolées (chlorophylliens) dans le but d'induire l'embryogenèse somatique chez ces variétés génétiquement non embryogènes. Le pourcentage d'induction des cals sur les hypocotyles non étiolés des deux variétés étudiées est significativement plus élevé que celui des hypocotyles étiolés. Par contre, la prolifération des cellules *in vitro* (poids frais et poids sec) est plus intense lorsque les explants proviennent des plantules étiolées mais seulement chez la variété ISA 205 N. L'étude histologique des cals montre, par ailleurs, que la formation de cellules embryogènes ou d'embryons somatiques dépend aussi de l'origine de l'explant mis en culture. L'embryogenèse survient plus rapidement dans les cals provenant d'explants étiolés et la formation d'embryons au stade cordiforme ou globulaire est observée à 4 mois de culture, contrairement aux cals provenant d'explants non étiolés qui présentent à ce stade de la culture des zones de divisions cellulaires intenses qui n'évoluent pas vers la formation d'embryons. La variété ISA 205 N semble plus embryogène dans ces conditions de culture que ISA GL 7. L'étiollement serait ainsi une condition favorable à l'induction de l'embryogenèse somatique à partir d'hypocotyles de cotonnier.

Mots-clés. *Gossypium hirsutum* L, étiollement, callogenèse, embryogenèse somatique.

Darkness etiollement is a favorable pre-treatment to induce somatic embryogenesis from hypocotyls of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *In vitro* tissue culture of two varieties of cotton, ISA 205 N and ISA GL 7, (*Gossypium hirsutum* L.), cultivated in Côte d'Ivoire, was established from hypocotyls fragments. These fragments were excised from etiolated and non etiolated seedlings (absence or presence of chlorophyll). The objective of the study was to induce somatic embryogenesis from these genetically non embryogenic varieties. The non etiolated hypocotyls of both varieties showed a significantly higher percentage of callus induction compared to the etiolated ones. However, cells proliferation from etiolated hypocotyls were higher only for variety ISA 205 N. Histological study of callus indicated that embryogenic cells or embryos formation depend on the origin of explants used in culture. With callus derived from etiolated explants, embryogenesis started earlier and embryos at the globular and heart-shape stage were observed after four months. With callus generated by non etiolated explants, cellular division was high with no embryo formation. From these results, it appears that variety ISA 205 N is more embryogenic than ISA GL 7. Additionally, it was shown that the darkness pre-treatment of the cultured explants would be a good condition to induce somatic embryogenesis of cotton.

Keywords. *Gossypium hirsutum* L, darkness treatment, callogenesis, somatic embryogenesis.

1. INTRODUCTION

Gossypium hirsutum L. est la principale espèce de coton cultivée sur le marché mondial. C'est un tétraploïde issu du croisement entre deux espèces sauvages diploïdes. L'amélioration génétique par hybridations interspécifiques a connu peu de succès à cause des barrières d'incompatibilité dues aux niveaux de ploïdie différents, et du temps relativement long pour obtenir une variété améliorée (Munro, 1987).

La culture *in vitro* permet de contourner ces difficultés, dans la mesure où les embryons somatiques obtenus à partir de tissus ou de cellules isolées constituent un matériel adéquat pour la transformation génétique (Finer, Mc Mullen, 1990).

La première régénération d'un plant de cotonnier cultivé par embryogenèse somatique a été obtenue chez la variété "Cocker" par Davidonis et Hamilton (1983). Cependant, la dépendance génotypique des performances de callogenèse et de régénération des plantes limite l'efficacité de l'embryogenèse somatique pour améliorer le cotonnier (Umbeck *et al.*, 1987 ; Trolinder, Goodin, 1988 ; Zouzou *et al.*, 1997). Ainsi, sur une centaine de variétés cultivées aux États Unis, la plupart sont récalcitrantes à l'embryogenèse somatique (Sakhanokho *et al.*, 2001). Seule la variété "Cocker" produit des cals embryogènes à un taux et une fréquence élevés (Firoozabady, Deboer, 1993). La variété "Cocker" n'est cependant pas une variété à haute valeur agronomique (Sakhanokho *et al.*, 2001). Elle est par contre utilisée dans des programmes de sélection impliquant des variétés récalcitrantes pour donner des hybrides capables de régénération *in vitro* (Kumar *et al.*, 1998).

Des études récentes montrent que des variétés à haute valeur agronomique de *Gossypium hirsutum* L. ainsi que de *Gossypium barbadense* L., la seconde espèce de coton cultivée qui fournit des fibres de meilleure qualité que *Gossypium hirsutum* L., ont également été régénérées par embryogenèse somatique (Gonzalez-Benito *et al.*, 1997 ; Sakhanokho *et al.*, 2001 ; Zhang *et al.*, 2001).

La composition des milieux de culture influence grandement l'obtention et la croissance des cals embryogènes chez le cotonnier (Sakhanokho *et al.*, 2001 ; Zhang *et al.*, 2001). De même, les conditions environnementales des cultures (température, lumière, atmosphère, etc.) peuvent influencer fortement la prolifération cellulaire au cours de la callogenèse ainsi que l'embryogenèse somatique chez diverses plantes (Murashige, 1974 ; Hughes, 1981 ; Tan, Qian, 1988).

Le coton représente aujourd'hui la troisième culture d'exportation de la Côte d'Ivoire. *Gossypium hirsutum* L. est l'unique espèce cultivée depuis la disparition de l'espèce traditionnelle *Gossypium barbadense* L. La diffusion de variétés améliorées,

associée à une adaptation des pratiques culturales, s'est traduite par une augmentation de la productivité qui est passée de 504 kg/ha en 1960 à 1302 kg/ha en 1988. Parmi les nombreuses nouvelles variétés adaptées spécifiquement aux conditions écologiques de la Côte d'Ivoire, on trouve la variété ISA 205 N avec gossypol et la variété ISA GL 7 dépourvue de gossypol (Hau, 1988). Afin d'induire l'embryogenèse somatique chez ces variétés génétiquement non embryogènes, des essais de culture de tissus *in vitro* sous différentes conditions, ont été menés.

Ce travail présente l'influence de l'étiollement des explants sur l'induction de l'embryogenèse somatique chez ces deux variétés. La prolifération cellulaire et la formation des embryons au cours de la callogenèse ont été évaluées.

2. MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1. Matériel végétal

Les variétés de cotonnier (*Gossypium hirsutum* L.) ISA 205 N avec gossypol et ISA GL 7 sans gossypol ont été utilisées pour ce travail. Ces variétés ont été sélectionnées au Centre National de Recherche Agronomique (CNRA), Abidjan, Côte d'Ivoire.

2.2. Culture *in vitro*

Germination des graines. Des graines de coton de chaque variété sont stérilisées par trempage dans l'alcool 70° pendant trois minutes, puis dans l'hypochlorite de calcium (3 %) pendant 30 minutes et rincées trois fois à l'eau distillée stérile. Elles sont imbibées dans de l'eau distillée stérilisée pendant 24 à 48 heures à l'obscurité pour faciliter la germination. Elles sont ensuite débarrassées de leurs téguments et mises à germer dans des tubes à essais en verre Pyrex de dimension 150 × 22 (L × ø extérieur en mm) et de capacité 50 ml sur un milieu MS (Murashige, Skoog, 1962) contenant 30 g/l de saccharose et 0,75 g/l de MgCl₂, sans hormone de croissance et solidifié avec 0,2 % de gelrite. Les tubes à essais sont hermétiquement fermés avec des bouchons plastiques de dimension 25 × 38 (ø x L en mm). Le pH du milieu de germination est de 5,8.

Les tubes contenant les graines sont d'abord placés à l'obscurité pendant 48 heures pour initier la germination. Un lot de chaque variété est alors mis à la lumière (photopériode de 16 heures) pour donner les plantules vertes. Les autres sont gardés à l'obscurité pour former les plantules étiolées de couleur jaune pâle. La dimension des plantules est d'environ 15 cm au prélèvement des hypocotyles.

Callogenèse. La culture des cals est initiée à partir de sections d'hypocotyle de 0,5 cm (mesuré à partir des cotylédons) de plantules non étiolées et de plantules étiolées âgées de 7 jours. Les explants, au nombre de 5, sont placés dans des boîtes de Pétri ($\varnothing = 90$ mm) contenant le milieu de callogenèse (30 ml de milieu de base MS additionné des vitamines B5 de Gamborg (Gamborg *et al.*, 1968), 0,3 g/l de glucose, 0,1 mg/l de 2-4-D, 0,5 mg/l de kinétine et 0,75 g/l de $MgCl_2$, solidifié avec 0,2 % de gelrite, pH 5,8). Les boîtes de Pétri sont hermétiquement fermées avec du parafilm. Les boîtes contenant les explants sont placées dans une chambre de culture sous une photopériode de 16 heures, à une température de 25 °C, avec un éclairage de $6 \mu E m^{-2}s^{-1}$ fourni par des tubes fluorescents "COOLWHITE". Les cals sont repiqués en culture pendant 4 mois avec subcultures mensuelles.

2.3. Évaluation de la callogenèse

La callogenèse des différents explants est évaluée par la détermination du pourcentage d'induction de cal (nombre d'explants ayant donné des cals sur le nombre total d'explants mis en culture), le poids frais et le poids sec de ceux-ci. Pour chaque type d'explants (étiolés et non étiolés), nous avons réalisé trois répétitions de culture, à raison de six boîtes de Pétri par répétition contenant chacune cinq hypocotyles soit au total 90 explants par type d'explant.

L'analyse statistique est faite par le test ANOVA pour signifier la différence au seuil de 5 %, entre les valeurs moyennes obtenues.

2.4. Étude histologique des cals

L'étude histologique des explants mis en culture et des cals a été réalisée selon les techniques de Martoja et Martoja-Pierson (1967). Les échantillons sont d'abord déshydratés dans des bains d'éthanol de concentration croissante (80, 95 et 100 %) et gardés dans l'éthanol 100 % pendant 24 heures. Les tissus sont ensuite trempés dans du butanol pendant 30 minutes, puis dans la paraffine et mis à l'étuve à 58°C pendant 12 heures.

Des coupes de 16 μm sont réalisées après une inclusion dans des barres de Leukart, au microtome Reichert Jung, puis colorées au vert de carmin. Les observations sont réalisées à l'aide d'un microscope photonique Zeiss.

3. RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

3.1. Callogenèse des explants

Chez la variété de cotonnier ISA 205 N, le pourcentage d'induction de cal des explants non étiolés (60 %) est significativement plus important (au

seuil de 5 %) que celui des explants étiolés (42 %). Les explants étiolés présentent cependant une prolifération plus importante des cellules qui se caractérise par une masse de cals (poids frais et poids sec) supérieure à celle des explants non étiolés. Les cals issus de ces différents explants présentent les mêmes pourcentages d'eau. Le pourcentage d'induction de la callogenèse des explants non étiolés de la variété ISA GL 7 est aussi plus important que celui des plantules étiolées. Cette variété présente cependant, contrairement à ISA 205 N, une prolifération cellulaire significativement plus intense que les explants non étiolés (**Tableau 1**).

L'étiollement des explants est caractérisé principalement par une absence de chlorophylle dans les tissus et par un allongement démesuré de la plantule. Les proplastides évoluent plutôt en étioplastes qui ne possèdent pas de capacités photosynthétiques (Lew, Tsui, 1982). Il y a dédifférenciation suivie d'une prolifération cellulaire anarchique conduisant à la formation des cals. Les tissus étiolés seraient favorablement conditionnés pour la callogenèse. L'effet bénéfique de l'étiollement sur la callogenèse est cependant plus marqué chez la variété avec gossypol et serait donc aussi lié à la variété.

3.2. Étude histologique des explants et des cals

Callogenèse. Les coupes microscopiques d'hypocotyles montrent, au septième jour de culture, des cellules possédant des parois déjà lignifiées chez les explants non étiolés avec la présence de grains d'amidon dans les cytoplasmes cellulaires (**Figure 1**). Les explants provenant de plantules étiolées présentent des cellules

Tableau 1. Callogenèse d'explants non étiolés et d'explants étiolés des variétés de cotonnier ISA 205 N et ISA GL 7 — *Callogenesis of non etiolated and etiolated explants of cotton varieties ISA 205 N and ISA GL 7.*

	ISA 205 N		ISA GL 7	
	explants non étiolés	explants étiolés	explants non étiolés	explants étiolés
Induction des cals (%)	60 ^a	41,8 ^b	69 ^a	44,5 ^b
Poids frais (mg)	268,5 ^a	361,6 ^b	583,5 ^a	508,2 ^b
Poids sec (mg)	16,97 ^a	24,57 ^b	28,13 ^a	23 ^b
Teneur en eau (%)	93,69 ^a	93,62 ^a	94,8 ^a	95,11 ^a

^a, ^b = Pour chaque caractère, les valeurs portant les mêmes lettres sont statistiquement égales ($\alpha = 5$ %).

Les valeurs représentent la moyenne de trois répétitions par type d'explant. Nous avons réalisé trois répétitions à raison de six boîtes de Pétri contenant chacune cinq hypocotyles par répétition, soit 90 explants par type d'explant.

dépourvues d'amidon et possédant des parois très minces et non lignifiées (**Figure 2**).

Après un mois de culture survient la formation des cals. Les premières divisions cellulaires intervenant dans le parenchyme cortical sont conformes à ce qu'ont montré El Maâtaoui *et al.* (1990) sur *Quercus suber*. Ces cellules sont généralement larges, comportant ou non des noyaux (**Figures 3 à 6**). Par la suite, on observe des zones de cellules à noyau fortement coloré, en division active. Ces zones sont situées à la périphérie de larges cellules non divisées (**Figures 7 à 10**). Les caractéristiques de ces cellules correspondent à celles des cellules embryogènes décrites par Michaux-Ferrière *et al.* (1987) sur le caféier. Les divisions cellulaires évoluent rapidement pour former, au bout de quatre mois de culture en général, des ébauches cotylédonaires ; il s'agit alors d'embryons au stade globulaire ou au stade cordiforme (El Maâtaoui *et al.*, 1990) (**Figure 8**).

Embryogenèse somatique. La formation d'organes ou d'embryons chez les deux variétés étudiées dépend de l'explant mis en culture, mais aussi de la variété utilisée.

Après un mois de culture, les cals formés par les explants non étiolés de la variété ISA 205 N présentent des grandes cellules non embryogènes avec des cellules traversées parfois de vaisseaux conducteurs (**Figure 3**) et il en est de même chez la variété ISA GL 7 (**Figure 5**). Tandis que les cals formés par des explants étiolés de la variété ISA 205 N présentent déjà une évolution des divisions cellulaires vers la formation d'embryons (**Figure 4**), de même que les explants étiolés de la variété ISA GL 7 (**Figure 6**).

Après quatre mois de culture, la formation d'embryons, due à des divisions cellulaires de plus en plus importantes, est plus avancée dans les cals issus d'explants étiolés tandis que les explants non étiolés présentent des cellules en division très active (**Figures 7 et 9**).

L'embryogenèse somatique est cependant moins marquée chez la variété ISA GL 7. À quatre mois de culture, les cals de cette variété ne présentent que des zones de cellules méristématiques proembryogènes à très forte division, même dans les cals provenant d'explants étiolés (**Figures 9 et 10**).

L'embryogenèse somatique chez le cotonnier est génétiquement dépendante (Finer, Mc Mullen, 1990). Dans les mêmes conditions de culture, la variété ISA 205 N semble produire plus rapidement des embryons que la variété ISA GL 7. De plus, l'étiollement constitue un pré-conditionnement des explants favorisant l'induction de l'embryogenèse somatique

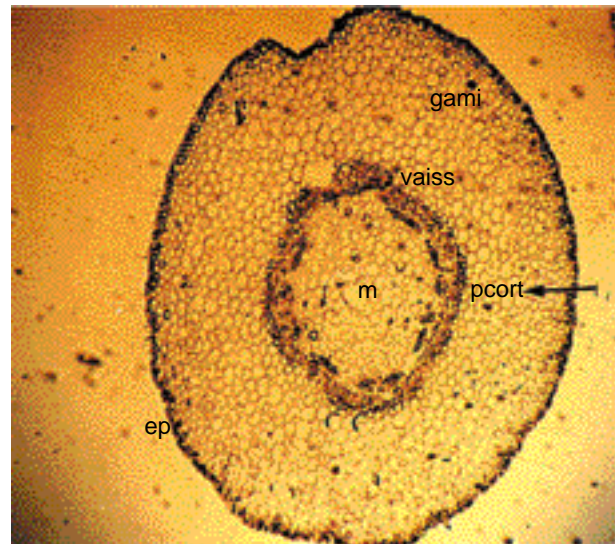


Figure 1. Coupe transversale d'hypocotyle de plantule non étiolée de cotonnier, âgé de sept jours. On observe des grains d'amidon (gami) dans le cytoplasme cellulaire. Les cellules du parenchyme cortical (pcort) et de la moelle (m) présentent des épaisissements de lignine. Les vaisseaux conducteurs (vaiss) et l'épiderme (ep) sont visibles. Coloration au vert de carmin. x : 87,50 — *Transversal section through a non etiolated seven-days old cotton seedling hypocotyl. We observe starch grains (gami) in cellular cytoplasm. Cortical parenchyma cells (pcort) and pith (m) present lignin wall ingrowths. Vascular bundles (vaiss) and epidermis (ep) are present. Coloured with green carmino. x: 87.50.*

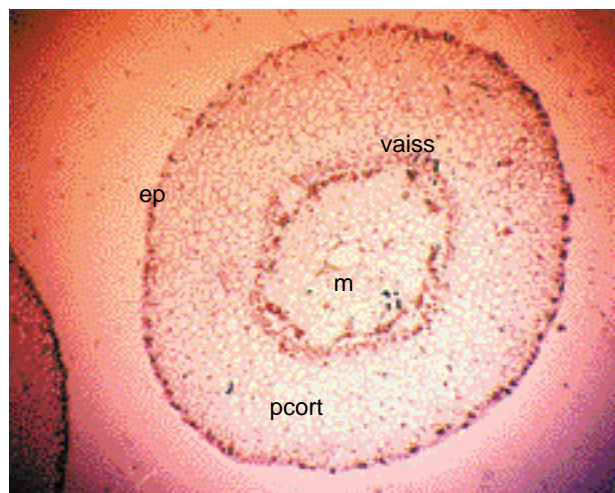


Figure 2. Coupe transversale d'hypocotyle de plantule étiolée de cotonnier, âgé de sept jours. On note l'absence de grains d'amidon dans les cellules du parenchyme. Les cellules du parenchyme cortical (pcort) et de la moelle (m) ont des parois minces non lignifiées. Les vaisseaux conducteurs (vaiss) et l'épiderme (ep) sont visibles. Coloration au vert de carmin. x : 87,50 — *Transversal section through an etiolated seven-days old cotton seedling hypocotyle. We observe the absence of starch in parenchyma cells. Cortical parenchyma cells (pcort) and pith (m) have non lignified, thin walls. Vascular bundles (vaiss) and epidermis (ep) are present. Coloured with green carmino. x: 87.50.*

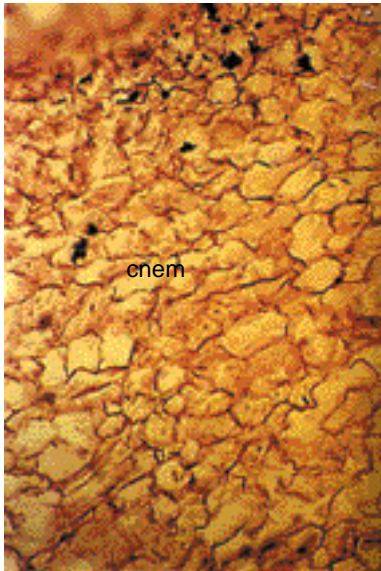


Figure 3. Coupe transversale de cal issu d'explant non étiolé de la variété ISA 205 N, à un mois de culture. On observe de larges cellules non embryogènes (cnem), à cytoplasme vide sans noyau. Coloration au vert de carmin. x 560 — *Transversal section of callus from non etiolated explants of variety ISA 205 N at one month. We observe large non embryogenic cells (cnem) without nucleus. Coloured with green carmino. x 560.*

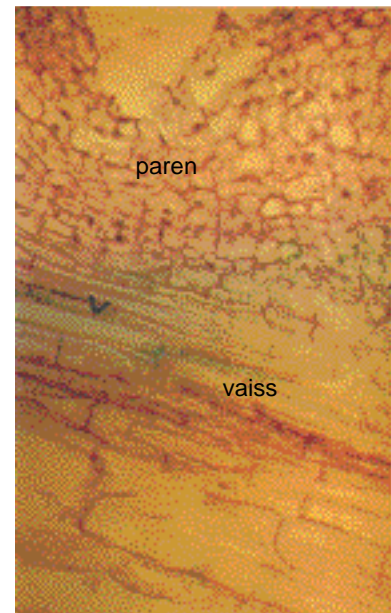


Figure 5. Coupe transversale de cal issu d'explant non étiolé de la variété ISA GL 7 à un mois de culture. On observe de larges cellules du parenchyme (paren) traversées par les vaisseaux conducteurs (vaiss). Coloration au vert de carmin. x 560 — *Transversal section of callus from non etiolated explants of variety ISA Gl 7 at one month. We observe large parenchyma cells (paren) crossed by vascular bundles (vaiss). Coloured with green carmino. x 560.*

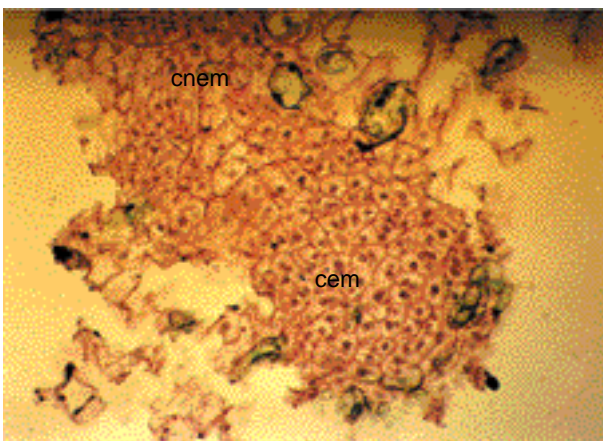


Figure 4. Coupe transversale de cal issu d'explant étiolé de la variété ISA 205 N à un mois de culture. On observe des cellules non embryogènes (cnem) de plus grande taille et un amas de cellules embryogènes (cem) avec des noyaux bien visibles. Ces cellules sont en division active. Coloration au vert de carmin. x 560 — *Transversal section of callus from etiolated explants of variety ISA 205 N at one month. We observe larger non embryogenic cells (cnem) and a pile embryogenic cells (cem) with visible nucleus. These cells show intensive division. Coloured with green carmino. x 560.*

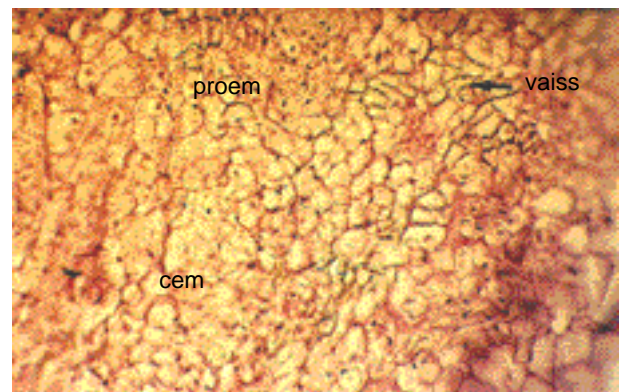


Figure 6. Coupe transversale de cal issu d'explant étiolé de la variété ISA GL 7 à un mois de culture. On observe les vaisseaux conducteurs (vaiss), des cellules embryogènes (cem) à noyau qui commencent des divisions mitotiques et des cellules proembryogènes (proem). Coloration au vert de carmin. x 560 — *Transversal section of callus from etiolated explants of variety ISA Gl 7 at one month. We observe vascular bundles (vaiss), embryogenic cells (cem) with nucleus which start mitotic divisions and proembryogenic cells (proem). Coloured with green carmino. x 560.*

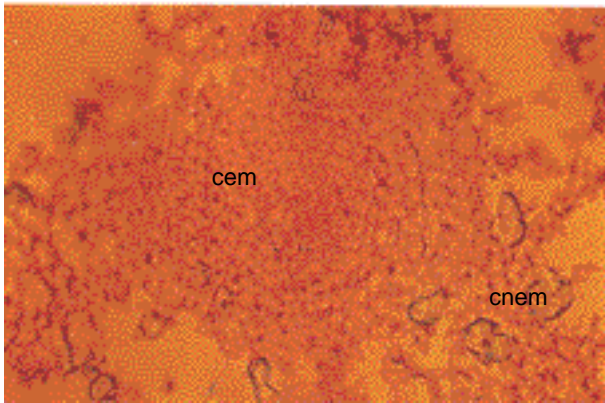


Figure 7. Coupe transversale de cal issu d'explant non étiolé de la variété ISA 205 N à quatre mois de culture. On observe des cellules non embryogènes (cnem) à la périphérie de cellules embryogènes (cem) en division intense. Coloration au vert de carmin. x 560 — *Transversal section of callus from non etiolated explants of variety ISA 205 N at four months. We observe non embryogenic cells (cnem) at the periphery of embryogenic cells (cem) in intense division. Coloured with green carmino. x 560.*

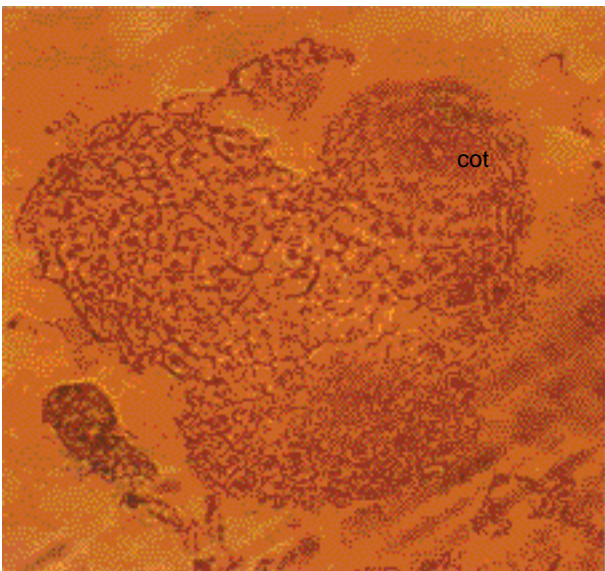


Figure 8. Coupe transversale de cal issu d'explant étiolé de la variété ISA 205 N à quatre mois de culture. On observe un embryon au stade cordiforme avec des ébauches cotylédonaire (cot). Coloration au vert de carmin. x 560 — *Transversal section of callus from etiolated explants of variety ISA 205 N at four months. We observe an embryo heart-shaped stage with an initiation of cotyledon (cot). Coloured with green carmino. x 560.*

chez des variétés récalcitrantes. L'état étiolé augmente probablement le nombre de cellules réactives vis-à-vis du signal hormonal. L'étiollement induisant une différenciation incomplète des tissus des plantes (manque d'activité photosynthétique, faible vascularisation des tissus), les cellules seraient plus

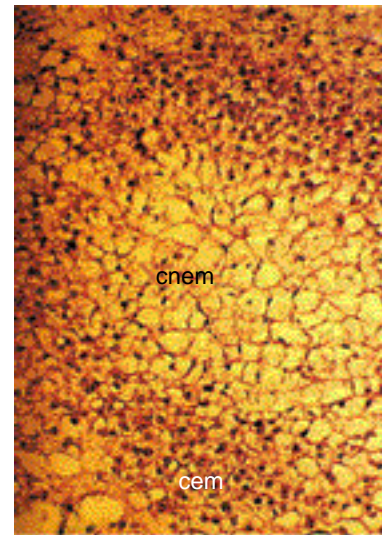


Figure 9. Coupe transversale de cal issu d'explant non étiolé de la variété ISA GL 7 à quatre mois de culture. On observe de larges cellules non embryogènes (cnem) entourées de cellules embryogènes (cem) à noyau fortement coloré. Coloration au vert de carmin. x 560 — *Transversal section of callus from non etiolated explants of variety ISA GL 7 at four months. We observe large non embryogenic cells (cnem) encircled with embryogenic cells (cem) with intensive colored nucleus. Coloured with green carmino. x 560.*

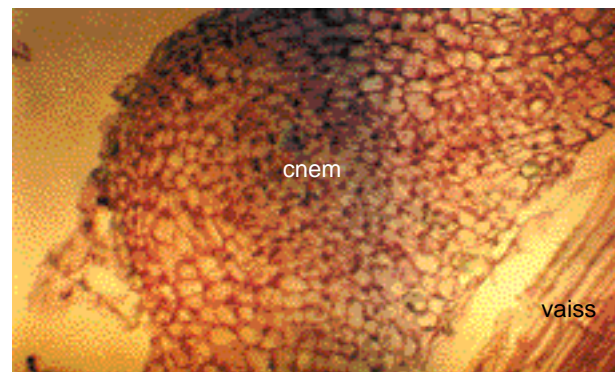


Figure 10. Coupe transversale de cal issu d'explant étiolé de la variété ISA GL 7 à quatre mois de culture. On observe les vaisseaux conducteurs (vaiss) et un dôme méristématique de cellules embryogènes (cem). Coloration au vert de carmin. x 560 — *Transversal section of callus from non etiolated explants of variety ISA GL 7 at four months. We observe vascular bundles (vaiss) and a meristematic dome of embryogenic cells (cem). Coloured with green carmino. x 560.*

aptes à exprimer leur totipotence les conduisant ainsi à former plus rapidement les embryons somatiques. Certains auteurs mentionnent cependant qu'une des caractéristiques des cellules devant évoluer vers la formation d'embryons, serait la présence d'amidon et de paroi cellulaire épaisse et lignifiée (cas du matériel

non étioilé) qui représentent une bonne isolation pour l'expression de la totipotence cellulaire (Williams, Maherwaran, 1986). Pourtant, l'état étioilé serait un état de la plantule où le catabolisme des sucres réalisé par la voie des pentoses – phosphates, produit l'énergie nécessaire à la division active des cellules et à la formation de nouveaux tissus. On note ainsi chez ces explants, une augmentation de l'activité de la glucose-6-phosphate déshydrogénase au cours de la formation de structures embryogènes en culture de cellules, qui serait une condition métabolique nécessaire à la formation d'embryon (Kochba *et al.*, 1982). Par ailleurs, ce résultat montre l'importance d'un pré-traitement sous forme de stress de l'explant mis en culture pour l'obtention d'embryons somatiques comme l'ont montré certains travaux (Pechan *et al.*, 1991). L'étiollement représenterait ici une forme de stress auquel est soumis l'explant, qui favoriserait la formation d'embryons somatiques.

4. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'utilisation d'explants étioilés permet la formation d'embryons somatiques en culture de cals chez des variétés de cotonnier génétiquement non embryogènes. Chez les variétés locales étudiées, seule la variété ISA 205 N avec gossypol donne des embryons dans ces conditions, au bout de quatre mois de culture. La variété ISA GL 7, variété sans gossypol, ne présente à ce stade que des zones de cellules méristématiques en division active. Les explants non étioilés donnent des cals non embryogènes, bien que possédant un pourcentage d'induction des cals plus élevé que les explants étioilés.

Pour compléter ces résultats, la maturation des embryons et leur développement en plantes entières devraient être entrepris. En outre, le métabolisme des sucres devrait être analysé pour déterminer les conditions particulièrement favorables à l'embryogenèse somatique chez des variétés de plantes génétiquement non embryogènes.

Remerciements

Nous remercions la Coopération Belge (AGCD) pour leur aide à travers le projet de coopération bilatérale initié par l'Université d'Abidjan (Côte d'Ivoire) et la Katholic University of Leuven (Belgique) sur "l'optimisation de la régénération et de la transformation *in vitro* de deux variétés de cotonnier cultivées en Côte d'Ivoire".

Bibliographie

El Maâtaoui M., Espagnac H., Michaux-Ferrière N. (1990). Histology of callogenesis and somatic

embryogenesis induced in stem fragment of cork oak (*Quercus suber*) cultured *in vitro*. *Ann. Bot.* **66**, p. 183–187.

Davidonis GH., Hamilton RH. (1983). Plant regeneration from callus tissue culture of *Gossypium hirsutum* L. *Plant Sci. Lett.* **32**, p. 89–93.

Finer JJ., Mc Mullen MD. (1990). Transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) via particle bombardment. *Plant Cell Rep.* **8**, p. 586–589.

Firoozabady E., Deboer DL. (1993). Plant regeneration via somatic embryogenesis in many cultivars of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *In Vitro Cell Dev. Biol.* **29**, p. 166–173.

Gamborg OL., Miller RA., Ojima K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* **50**, p. 151–158.

González-Benito ME., Frota-Chagas Carvalho JM., Péres C. (1997). Somatic embryogenesis of an early cotton cultivar. *Pesqui. Agropecu. Bras.* **32**, p. 485–488.

Hau B. (1988). Histoire de la sélection du cotonnier en Côte d'Ivoire. *Cot. Fib. Trop.* **12** (3), p. 177–193.

Hughes KW. (1981). *In vitro* ecology: Exogenous factors affecting growth and morphogenesis in plant culture systems. In Constantin MS., Henke RR., Hughes KW., Conger BV. (eds.). *Propagation of higher plants through tissue culture. Emerging Technologies and strategies. Env. Exp. Bot.* **21** (3–4), special issue (Conference Proceedings), p. 281–288.

Kochba J., Spiegel-Roy P., Neumann H., Saad S. (1982). Effect of carbohydrates on somatic embryogenesis in subcultured nucellar callus of Citrus cultivars. *Z. Pflanzenphysiol.* **105**, p. 359–368.

Kumar S., Sharma P., Pental D. (1998). A genetic approach to *in vitro* regeneration of non-regenerating cotton (*Gossypium hirsutum* L.) cultivars. *Plant Cell Rep.* **18**, p. 59–63.

Lew R., Tsui H. (1982). Effect of benzyladenine treatment duration on delta-aminolevulinic acid accumulation in the dark, chlorophyll lag phase abolition and long-term chlorophyll production in excised cotyledons of dark-grown cucumber seedlings. *Plant Physiol.* **69**, p. 663–667.

Martoja R., Martoja-Pierson M. (1967). *Initiation aux techniques de l'histologie animale*. Issy-les-Moulineaux, France : Masson, 345 p.

Michaux-Ferrière N., Dublin P., Schwendiman J. (1987). Étude histologique de l'embryogenèse somatique à partir d'explants foliaires de *Coffea arabica* L. *Café, Cacao, Thé* **31**, p. 103–110.

Munro JM. (1987). Cotton. *Trop. Agric. Serie* **2**, p. 170–172.

Murashige T (1974). Plant propagation through tissue culture. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* **25**, p. 135–166.

Murashige T, Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **15**, p. 473–497.

- Pechan PM., Bartels D., Brown DCW., Schell J. (1991). Messenger RNA and protein changes associated with induction of *Brassica* microspore embryogenesis. *Planta* **88**, p. 161-184.
- Sakhanokho HF., Zipf A., Rajasekaran K., Saha S., Sharma GC. (2001). Induction of highly embryogenic calli and plant regeneration in Upland (*Gossypium hirsutum* L.) and Pima (*Gossypium barbadense* L.) cotton. *Crop Sci.* **41**, p. 1235-1240.
- Tan XL., Qian YG. (1988). Effect of explants sources and cultural conditions on plant regeneration in *Gossypium gossypioides* (Ulbrich) Standley. *Acta Genet. Sin.* **15** (2), p. 473–497.
- Trolinder NL., Goodin JR. (1988). Somatic embryogenesis in cotton (*Gossypium*). II. Requirement for embryo development and plant regeneration. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **12**, p. 43–53.
- Umbeck P., Johnson G., Barton K., Swain W. (1987). Genetically transformed cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Plant Biotechnol.* **5**, p. 263–266.
- Williams EG., Maherwaran G. (1986). Somatic embryogenesis. Factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. *Ann. Bot.* **57**, p. 443–462.
- Zhang BH., Feng R., Liu F., Wang Q. (2001). High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration of an elite Chinese cotton variety. *Bot. Bull. Acad. Sci.* **42**, p. 9–16.
- Zouzou M., Kouakou TH., Koné M., Peeters MC., Swennen R. (1997). Callogenèse chez le cotonnier cultivé en Côte d'Ivoire. Effet position explant hypocotyle, variété, source de carbone et régime hormonal. *Afr. Crop Conf. Proc.* **3**, p. 1489–1494.

(24 réf.)