

## **Embryogenèse somatique chez le cotonnier (*Gossypium hirsutum* L.) : évolution des composés lipidiques au cours de la callogenèse et de la culture de suspensions cellulaires**

**Tanoh Hilaire KOUAKOU<sup>1\*</sup>, Michel ZOUZOU<sup>2</sup>, Yatty Justin KOUADIO<sup>1</sup> et Abo Pierre ANNO<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> *Laboratoire de Biologie et Amélioration des Productions Végétales, UFR Sciences de la Nature, Université d'Abobo-Adjamé. 02 BP 801 Abidjan 02, Côte d'Ivoire.*

<sup>2</sup> *Laboratoire de Physiologie Végétale, UFR Biosciences, Université de Cocody. 22 BP 582 Abidjan 22, Côte d'Ivoire.*

---

\* Correspondance, courriel : [tanohilaire@yahoo.fr](mailto:tanohilaire@yahoo.fr)

### **Résumé**

L'implication des lipides dans le processus de l'embryogenèse somatique a été étudiée chez deux variétés de cotonnier (*Gossypium hirsutum* L.) : Coker 312, variété embryogène et ISA 205N, variété non embryogène. Le taux de lipides totaux de la variété ISA 205N est en général plus élevé que celui de la variété Coker 312. Ce taux atteint son optimum à la première subculture des cals et décroît par la suite régulièrement au cours de la culture de cellules. L'analyse qualitative des lipides montre que la composition lipidique des cals est identique chez les deux variétés. Cependant, on observe une accumulation de phospholipides sous forme de phosphocholine triacylglycérol (PTG) dans les suspensions cellulaires embryogènes de la variété Coker 312, contre une accumulation de galactolipides sous forme de digalactosyl diacylglycérol (DGDG) dans les suspensions cellulaires non embryogènes de la variété ISA 205N. Le PTG semble favoriser l'embryogenèse somatique tandis que le DGDG serait une cause de l'inhibition de l'embryogenèse somatique chez le cotonnier.

**Mots-clés :** *Gossypium hirsutum* L., lipide, cal, suspension cellulaire, embryogenèse somatique.

## Abstract

### **Somatic embryogenesis in cotton (*Gossypium hirsutum* L.): Lipid compounds change during callogenesis and cell suspension cultures**

Lipids implication in somatic embryogenesis process has been studied with two varieties of cotton (*Gossypium hirsutum* L.): Coker 312, embryogenic variety and ISA 205N, non embryogenic variety. Total lipids rate of variety ISA 205N is general more elevated than the one of variety Coker 312. This rate reaches its optimum at the first subculture of the calli and decreases thereafter regularly during cells culture. Lipids qualitative analysis shows that calli lipids composition is identical with two varieties. However, an accumulation of phospholipids under shape of phosphocholin triacylglycerol (PTG) in embryogenic cells suspension is observed of the variety Coker 312, against an accumulation of galactolipids under shape of digalactosyl diacylglycerol (DGDG) in nonembryogenic cells suspension of the variety ISA 205N. PTG seem to encourage somatic embryogenesis while DGDG would be a reason of cotton somatic embryogenesis inhibition.

**Keywords :** *Gossypium hirsutum* L., lipid, callus, cell suspension, somatic embryogenesis.

## 1. Introduction

Le cotonnier est plante textile cultivée principalement dans les zones arides et semi-arides des régions tropicales et subtropicales. Sur une quarantaine d'espèces de cotonniers aujourd'hui reconnues, quatre ont été domestiquées par l'homme pour les poils cellulosiques filables que portent les graines. Parmi les espèces cultivées, *Gossypium hirsutum* L. est l'espèce économiquement la plus importante. Elle fournit à elle seule, près de 95 % de la production mondiale de coton. C'est une espèce tétraploïde issue du croisement entre une espèce diploïde sauvage originaire d'Amérique et une espèce cultivée (*Gossypium arboreum* et *Gossypium herbaceum*) originaire d'Afrique et d'Asie [1]. Le cotonnier occupe une place importante dans l'économie mondiale. Sa fibre, le coton représente plus de 50 % du marché des fibres textiles. Cependant, la qualité des fibres et la production cotonnière sont menacées par des parasites et des maladies diverses [2]. Face à ce problème l'hybridation interspécifique s'avère être un outil intéressant pour l'amélioration variétale du cotonnier [3]. Mais, elle a connu peu de succès à cause des barrières d'incompatibilité dues au niveau de ploïdie différent et surtout au temps relativement long (environ 10 ans) pour obtenir une variété améliorée de cotonnier

[4]. Les difficultés rencontrées par voie classique de croisement ont amené les chercheurs à initier la culture *in vitro* notamment l'embryogenèse somatique. Cette technique permet d'obtenir des embryons somatiques à partir de tissus ou de cellules isolées, ce qui constitue un matériel idéal pour les transformations génétiques [5, 6].

Price et Smith [7] ont induit des embryons somatiques chez l'espèce sauvage de cotonnier *Gossypium klotzschianum*. Cependant, Davidonis et Hamilton [8] furent les premiers à obtenir la régénération du cotonnier par embryogenèse somatique chez la variété cultivée Coker 310. Depuis ce résultat, la régénération par embryogenèse somatique a été notée chez d'autres variétés cultivées de cotonnier [9]. La dépendance génotypique de la callogenèse et de la régénération chez le cotonnier limite les performances de l'embryogenèse somatique pour l'amélioration variétale du cotonnier [10, 11]. La plupart des variétés de cotonnier sont récalcitrantes à l'embryogenèse somatique [12, 13]. Actuellement, seule la variété Coker produit des cals embryogènes à un taux élevé et des suspensions cellulaires embryogènes [14-17]. Cette dépendance variétale de l'embryogenèse somatique est liée à certaines manifestations biochimiques [18, 19]. Ainsi, l'acquisition des compétences embryogènes est ainsi accompagnée d'une synthèse accrue de phénols et de protéines dans les cellules [20]. De même, des travaux ont révélé que l'accumulation de lipides ne favorise pas l'acquisition des capacités embryogènes chez plusieurs espèces végétales [21, 22].

Chez le cotonnier, plante oléagineuse, aucun résultat n'est disponible à notre connaissance quant à l'implication des lipides dans l'acquisition des potentialités embryogènes. Notre travail va donc consister en l'analyse de l'équipement lipidique des cals et de suspensions cellulaires de deux variétés de cotonnier au cours de l'embryogenèse somatique, en vue d'établir une corrélation avec l'induction des structures embryogènes.

## **2. Matériel et méthodes**

### **2-1. Matériel végétal**

Les variétés de cotonnier (*Gossypium hirsutum* L.) Coker 312 et ISA 205N ont été utilisées pour ce travail. Les graines de ces variétés ont été fournies respectivement par le Centre International pour la Recherche Agronomique et le Développement (CIRAD/France) et par le Centre National de Recherche Agronomique (CNRA/Côte d'Ivoire).

## **2-2. Méthodes d'études**

### ***2-2-1. Germination in vitro des graines***

Les graines de chaque variété de cotonnier sont stérilisées dans l'éthanol 70 % pendant 30 secondes, puis dans l'hypochlorite de sodium (2,5 %) pendant 20 minutes et rincer trois fois à l'eau distillée stérile. Les graines sont placées une à une dans des tubes à essais en verre de Pyrex de dimension 15 x 2,2 (L x  $\emptyset$  extérieur en cm) contenant 30 ml d'eau distillée stérile. Les tubes à essai sont ensuite hermétiquement fermés avec des bouchons plastiques de dimension 3,8 x 2,5 (L x  $\emptyset$  extérieur en cm). Les graines sont imbibées pendant 48 heures à l'obscurité la germination. Les graines dont la radicule pointe sont débarrassées de leurs téguments et mises à germer de façon aseptique dans des tubes à essais 10 mL de milieu de base  $\frac{1}{2}$  MS [23]. Ce milieu contient de la vitamine B<sub>5</sub> [24], 30 g/l de saccharose et 0,75 g/mL de MgCl<sub>2</sub>. Le milieu de germination est solidifié avec 2,5 g/l de gelrite et le pH est ajusté à 5,8. Les tubes à essais contenant les graines sont ensuite placés à l'obscurité pendant 48 heures pour initier la germination puis à la lumière sous une photopériode de 16 h pendant 5 jours. Des vitroplants sont obtenus après 7 jours de germination.

### ***2-2-2. Callogenèse***

L'initiation des cals se fait à partir des sections d'hypocotyles de 0,5 cm de long prélevées sur de vitroplants âgés de 7 jours. Les explants, au nombre de 5, sont placés dans des boîtes de Pétri en Pyrex ( $\emptyset = 9$  cm) contenant 30 ml de milieu de base MS additionné de vitamines B<sub>5</sub>, 30 g/l de glucose, 0,75 g/l de MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mg/l de 2,4-D et 0,1 mg/l de kinétine. Le milieu de callogenèse est solidifié avec 0,25 % de gelrite et le pH est ajusté à 5,8. Chaque boîte de Pétri contenant 5 explants est hermétiquement fermée avec du parafilm. Les boîtes de Pétri sont ensuite placées pendant un mois dans une salle de culture sous une photopériode de 16 h avec un éclairage de 2000 lux fourni par des tubes fluorescents "cool white" et à une température de  $28 \pm 2$  °C. Les cals sont ensuite repiqués en culture pendant trois mois avec des subcultures mensuelles sur un milieu de callogenèse neuf.

L'évaluation de la callogenèse se fait, après un mois de culture, par la détermination du poids frais et du poids sec des cals d'une part et par l'appréciation de la texture et de la couleur des cals d'autre part. Nous avons réalisé trois répétitions de culture, à raison de six boîtes de Pétri par variété et par répétition. Soit au total 90 explants par variété.

### **2-2-3. Suspensions cellulaires**

Les cals friables, non brunis et vert gris obtenus à la fin de la troisième subculture sont utilisés pour l'initier les suspensions cellulaires. Environ 2 g de cals sont dispersés dans des erlenmeyers en Pyrex de capacité 250 mL contenant 50 mL de milieu de base MS additionné de la vitamine B<sub>5</sub>, 30 g/l de glucose, sans hormone et sans agent gélifiant (MS liquide). Le pH du milieu MS liquide est ajusté à 5,8. Les erlenmeyers sont placés dans une salle de culture sur un agitateur rotatif "Gerhardt" à 110 tours/min pendant un mois dans les mêmes conditions que précédemment. Les suspensions cellulaires sont ensuite maintenues en culture pendant 3 mois avec des subcultures mensuelles sur un milieu MS liquide neuf. A la fin de chaque subculture, les suspensions cellulaires sont filtrées respectivement sur des tamis de diamètre de maille 100 µm, 150 µm et 250 µm. Un aliquote est à chaque fois prélevé et examinés au stéréomicroscope pour rechercher des indices de structures embryogènes.

### **2-2-4. Extraction et teneur en lipides**

L'extraction des lipides est réalisée grâce au "soxtec system" qui est une méthode modifiée de soxhlet [25]. 300 mg de matériel végétal frais (cals et cellules en suspensions de chaque variété) sont broyés dans un mortier. Le broyat obtenu est mis dans une capsule à extraction puis, recouvert d'un tampon de coton dégraissé. L'ensemble est adapté à une ampoule à extraction placée sur l'appareil TTRACTOR 1043. 70 ml de cyclohexane sont introduits dans un bocal A de poids P<sub>1</sub> et racolé ensuite à l'ampoule à extraction. Les échantillons sont chauffés à 118 °C pendant 20 min puis, refroidis pendant 45 min. Le mélange solvant liquide qui se condense dans les réfrigérants est recueilli dans le bocal A et porté à l'étuve à 130 °C pendant 30 min puis, au dessiccateur pendant 5 min (P<sub>2</sub> = poids bocal A + lipides). La teneur en lipides (TL) des échantillons, exprimée en pourcentage, est calculée selon la formule :

$$TL (\%) = \frac{P_1 - P_2}{P_{mv}}$$

(P<sub>mv</sub> : poids du matériel végétal)

### **2-2-5. Séparations des composés lipidiques**

L'extraction des lipides pour leur étude chromatographique s'est faite selon la méthode de Bligh et Dyer [26]. 500 mg de matériel végétal frais (cals et cellules en suspensions) sont préalablement fixés dans l'eau bouillante pendant 5 min, afin de

neutraliser les lipases (enzymes capables d'attaquer les lipides). Le matériel végétal est ensuite broyé en présence de 2 mL de méthanol 95 % (pour rompre les liaisons lipoprotéiques), de 2 mL de chloroforme (pour solubiliser les lipides complexes) et de 1 mL d'eau distillée. Après centrifugation à 5000 tours/min pendant 10 min, le surnageant contenant les lipides totaux est recueilli dans un ballon puis évaporé à vide, à l'aide d'un évaporateur rotatif (rotavapor). Le résidu, repris avec 2 mL de chloroforme, constitue l'extrait de lipides.

Les lipides totaux sont séparés par chromatographie sur couche mince de gel de silice, en utilisant un mélange de chloroforme-acétone-méthanol-acide acétique-eau dans les proportions 10-4-2-2-1 [27]. La migration se fait dans une cuve chromatographique pendant 30 min et les plaques sont séchées sous une hotte ventilée. Les composés lipidiques sont révélés grâce à la rhodamine (0,2 mg/ml) qui confère aux galactolipides une coloration jaune et aux phospholipides une coloration rose à l'UV.

### **2-2-6. Analyses statistiques**

L'analyse de variance à un critère de classification (ANOVA) suivie de la comparaison des moyennes obtenues par le test de Newman-Keuls à un risque de 5 % a été réalisée avec le logiciel Statistica 6.0.

## **3. Résultats et discussion**

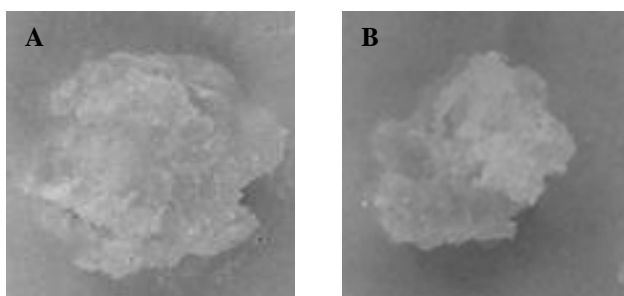
Le pourcentage d'induction de cals chez la variété Coker 312 (76 %) est significativement plus important que celui de la variété ISA 205N. L'estimation du poids frais et du poids sec des cals montre que les explants provenant de la variété Coker 312 présentent une prolifération plus importante de tissus qui se caractérise par une masse de cals plus importante que celle de la variété ISA 205N (**Tableau 1**).

Ces cals d'aspect très friable et de couleur gris vert observés chez la variété Coker 312 démontrent que cette variété donne une meilleure réponse à la callogenèse par rapport à la variété ISA 205N (**Figure 1**).

Cet effet variétal pourrait s'expliquer par une réactivité ou une sensibilité différentielle des tissus d'hypocotyle au milieu de culture MS, utilisé pour l'initiation des cals. Les cals de couleur gris vert et friables sont plus propices pour la culture des suspensions cellulaires en vue de l'obtention des embryons somatiques [20, 28].

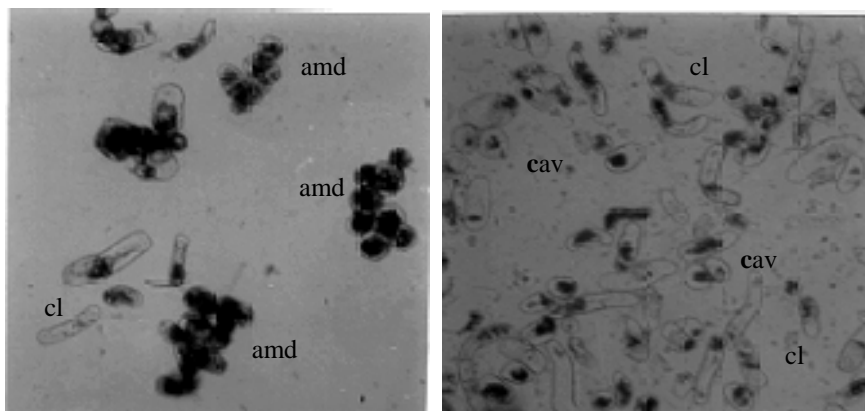
**Tableau 1 :** *Evolution de la callogenèse chez le cotonnier. Sur une même ligne, les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil 5% (test de Newman-Keuls).*

Variétés	Coker 312	ISA 205N
Texture	très friable	friable
Couleur	gris vert	jaune vert
Induction des cals (%)	76 <sup>a</sup>	68 <sup>a</sup>
poids frais (mg)	402,81 <sup>a</sup>	249,10 <sup>b</sup>
poids sec (mg)	22,60 <sup>a</sup>	17,08 <sup>b</sup>

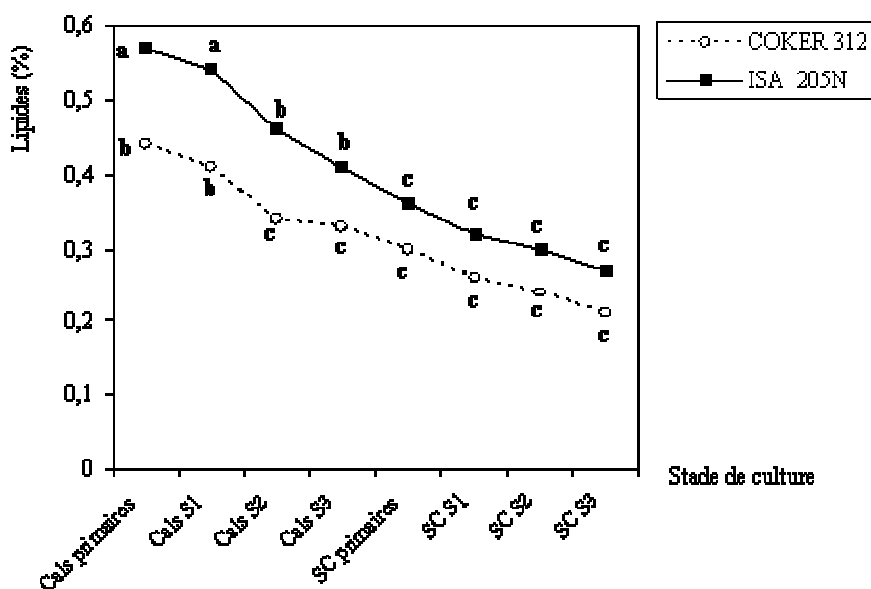


**Figure 1 :** *Cals de cotonnier à la fin de la troisième subculture. Les cals de la variété Coker 312 (A) sont plus gros donc se développe mieux que ceux de la variété ISA 205N (B).*

Les suspensions cellulaires de la variété Coker 312 présentent des amas de cellules arrondies, à contours réguliers et à cytoplasme dense qui semblent être les caractéristiques des structures embryogènes [29]. Par contre, les cellules allongées, individualisées et fortement vacuolisées observées dans les suspensions cellulaires de la variété ISA 205N (**Figure 2**) seraient des indices de formation de structures non embryogènes [30]. Ainsi, la variété Coker 312 possède un potentiel callogène et embryogène plus important que la variété ISA 205N. Ce résultat est en accord avec ceux de plusieurs auteurs [10, 15] qui ont montré que l'embryogenèse somatique est dépendant du génotype et que la variété Coker 312 a une aptitude à l'embryogenèse somatique en culture de suspension cellulaire plus élevée que les autres variétés de cotonnier.



**Figure 2 :** *Suspensions cellulaires de cotonnier à la fin de la troisième subculture. Chez la variété Coker 312 (A), les amas de cellules arrondies à cytoplasme dense (amd) observés sont des indices de formation des cellules embryogènes. Chez ISA 205N (B), la présence de cellules arrondies (cav) et de cellules allongées (cl) très vacuolisées sont caractéristiques des cellules non embryogènes. x 440*



**Figure 3 :** *Evolution du taux de lipides chez le cotonnier. SC : suspension cellulaire ; S1, S2 et S3 : première, deuxième et troisième subculture ; les valeurs suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil 5 % (test de Newman-Keuls).*



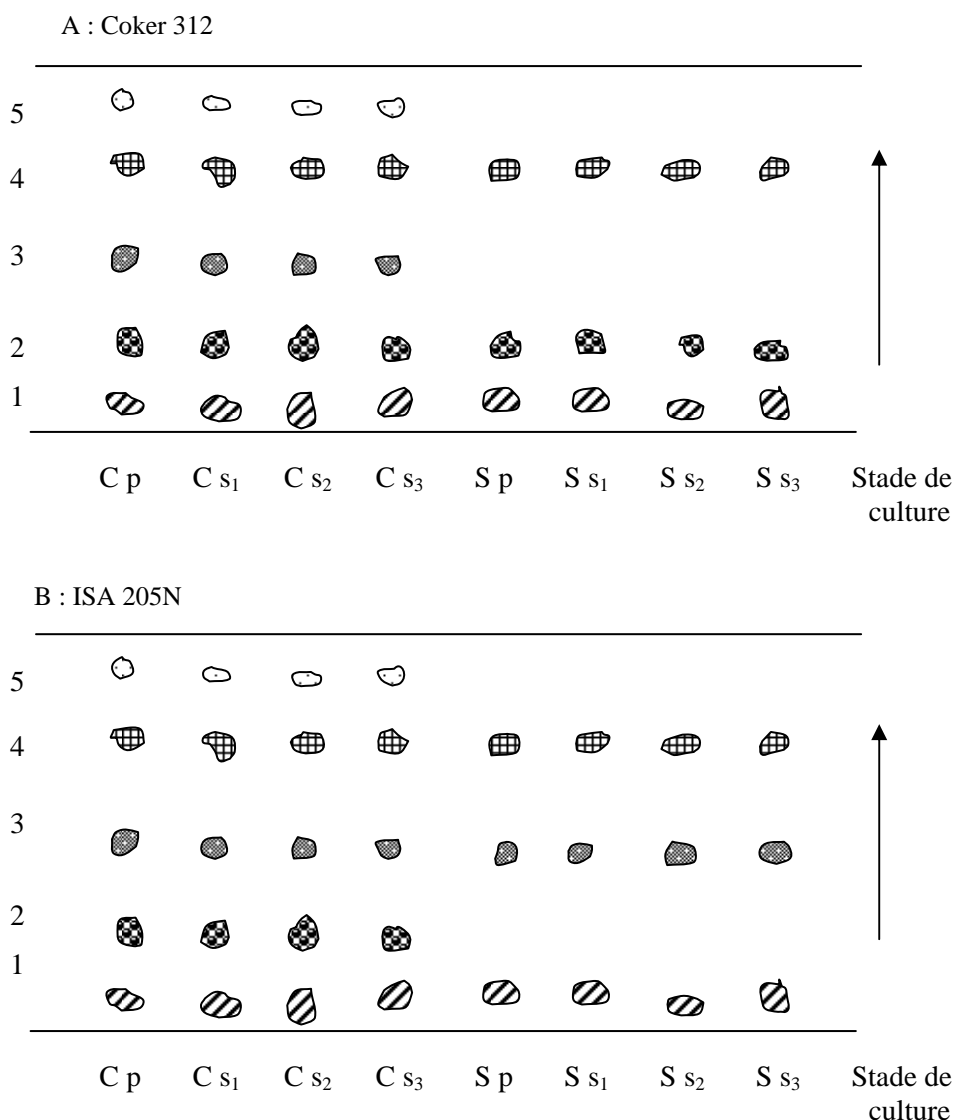
Nos résultats montrent une accumulation de lipides dans les cals primaires suivie de leur dégradation progressive dans les cultures successives. Cependant, le taux de lipides est significativement plus élevé dans les cals de la variété ISA 205N que dans ceux de la variété Coker 312 (**Figure 3**). Ainsi, les faibles teneurs en lipides semblent favoriser l'induction des cals. Il aurait donc une corrélation négative entre le taux de lipides et la callogenèse chez le cotonnier.

Toutefois, l'analyse chromatographique montre que les composés lipidiques présents dans les cals des variétés Coker 312 et ISA 205N sont identiques (**Figure 4**). Ceci signifierait que la composition lipidique n'a aucune influence sur la callogenèse chez le cotonnier, contrairement aux travaux de Zuily-Fodil *et al.* [31] qui ont montré que la synthèse des lipides stimule la callogenèse chez *Petunia hybrida* et *Parthenocissus tricuspidata*.

Dans les suspensions cellulaires, la teneur en lipides est identique chez les deux variétés de cotonnier. Le taux de lipides ne serait donc pas impliqué dans l'induction des structures embryogènes chez le cotonnier, contrairement à la callogenèse. La séparation des lipides par chromatographie montre la composition lipidique de la variété Coker 312 se différencie de celle de la variété ISA 205N par la présence de phosphocholine triacylglycérol (PTG) et l'absence de digalactosyl diacylglycérol (DGDG) chez la variété Coker 312, contrairement à la variété ISA 205N où on note l'absence de la PTG et l'absence de la DGDG (**Tableau 2**). Ceci montre que les composés lipidiques ont une action sur l'induction des structures embryogènes chez le cotonnier. En effet, la PTG semble ainsi favoriser l'induction des structures embryogènes alors que le DGDG l'inhiberait. L'acquisition des capacités embryogéniques de la variété Coker 312 pourrait donc s'expliquer par la levée d'inhibition suite à la dégradation du DGDG (des cals à la suspension cellulaire). La présence de phospholipides surtout de triacylglycérol à la place de galactolipides dans les suspensions cellulaires embryogéniques de la variété Coker 312 montre clairement l'implication de ce groupe de lipides dans l'acquisition des potentialités embryogéniques [32].

De même, l'analyse des différentes catégories de lipides (**Tableau 3**) révèle que les diacylglycérols, totalement absents dans les cellules de la variété Coker 312, semblent n'avoir aucune action promotrice sur l'embryogenèse somatique. Leur présence inhiberait plutôt la formation des structures embryogènes.

Ces résultats sont en accord avec ceux de Weber et Taylor [21] qui ont montré que l'acquisition des capacités embryogéniques en culture de suspensions cellulaires nécessite la présence de triacylglycérols dans les cellules.



**Figure 4 :** *Composition lipidique des cals et des suspensions cellulaires de cotonnier. la séparation des lipides par chromatographie sur couche mince montre que les cals des deux variétés de cotonnier ont la même composition lipidique alors qu'au niveau des suspensions cellulaires, on note la présence de la phosphocholine triacylglycérol chez la variété embryogène Coker 312 (A) et de la digalactosyl diacylglycérol chez la variété non embryogène isa 205n (B). C : cal ; p : primaire ; S : suspension cellulaire ; s<sub>1-2-3</sub> : subculture 1, 2 et 3 ; 1 : phosphatidylinositol (pi); 2 : phosphocholine triacylglycérol (ptg); 3 : digalactosyl diacylglycérol (dgdg); 4 : diphosphatidyl glycérol (dpg) ; 5 : monogalactosyl diacylglycérol (mgdg).*

**Tableau 2. :** Glycolipides et phospholipides dans les suspensions cellulaires de cotonnier. (+) = présence ; (-) = absence

	variétés	Coker 312	ISA 205N
phospholipides	PI	+	+
	PTG	+	-
	DPG	+	+
galactolipides	MGDG	-	-
	DGDG	-	+

**Tableau 3. :** Différentes catégories de lipides dans les suspensions cellulaires de cotonnier. (+) = présence ; (-) = absence

	variétés	Coker 312	ISA 205N
monoacylglycérol	DPG	+	+
diacylglycérol	MGDG	-	-
	DGDG	-	+
triacylglycérol	PTG	+	-

#### 4. Conclusion

La composition lipidique des cals et des suspensions cellulaires de deux variétés de cotonnier (*Gossypium hirsutum* L.) ont été déterminée en relation avec leur aptitude à former des structures embryogènes. Les résultats indiquent que les composés lipidiques n'ont aucune action significative sur la callogenèse. Les phospholipides notamment les triacylglycérols favorisent l'induction des structures embryogènes en culture de suspensions cellulaires alors que galactolipides et principalement les diacylglycérols les inhibent. Ainsi, la PTG peut être considérée comme un marqueur biochimique de l'induction de l'embryogenèse somatique et le DGDG comme un inhibiteur de l'embryogenèse somatique chez le cotonnier.

## Références

- [1] - G. Mergeai, *Thèse de doctorat, Faculté des Sciences Agronomiques, Unité de Phytotechnie des régions chaudes, Gembloux, Belgique* (1992)
- [2] - M. Vaissayre, *Doc. Cirad/CA, série 3, vol. 93* (1994) 1-57
- [3] - J. Démol, G. Mergeai, J.L. Hofs et V. Ndungo, *Publ. Agric.*, 29 (1992) 92-123
- [4] - J.M. MUNRO, *Trop. Agric. Ser.*, 2 (1987) 170-172
- [5] - P. Umbeck, G. Johnson, K. Barton and W. Swain, *Plant Biotechnol.*, 5 (1987) 263-266
- [6] - J.J. Finer and M.D. Mc Mullen, *Plant Cell Rep.*, 8 (1990) 586-589
- [7] - J.H. Price and R.H. Smith, *Planta* 145 (1979) 305-307
- [8] - G.H. Davidonis and R.H. Hamilton, *Plant Sci. Lett.*, 32 (1983) 89-93
- [9] - M.E. Gonzalez-Benito, C.J. Frota-Chagas and C. Peres, *Pesqui Agro. Bras.*, 32 (1997) 485-488
- [10] - R. Feng, B. Zhang, W. Zhang and Q. wang, in "*4<sup>th</sup> Asia-pacific conference on Agricultural Biotechnology proceedings*" Ed. P.J. Larkin, Darwin 13-16 July (1998)
- [11] - M. Zouzou, Y.J. Kouadio, M. Koné, T.H. Kouakou et D. Denezon, *Bioterre* 1 (2000) 48-56
- [12] - H.F. Sakanokho, A. Zipf, K. Rajasekaran, S. Saha and G.C. Sharma, *Crops Sci.*, 41 (2001) 1235-1240
- [13] - J. wu, X. Zhang., Y. Nie, S. Jin and S. Liang, *In Vitro Cell. Biol.*, 40 (2004) 371-375
- [14] - N.L. Trolinder and C. Xhixian, *Plant Cell Rep.*, 8 (1989) 133-136
- [15] - E. Firoozabady and D. Deboer, *In vitro Cell. Dev. Biol.*, 29 (1993) 166-173
- [16] - B.H. Zhang, R. Feng, F. Liu and Q. Wang, *Bot. Bull. Acad. Sin.*, 42 (2001) 9-16
- [17] - T.H. Kouakou, T.P. Waffo, Y.J. Kouadio, J. Valls, A. Decendit and J.M. Merillon, *Plant Tiss. Org. Cult.* 26 (2006) 82-87
- [18] - Y.J. Kouadio, M. Zouzou, D. O. Dogbo, T.H. Kouakou et M. Kone, *Crop Sci.*, 4 (1999) 31-35
- [19] - T.H. Kouakou, Y.J. Kouadio, M. KONE, M. Zouzou et A.P. Anno, *Bioterre* 4 (2004) 143-151
- [20] - T.H. Kouakou, *Thèse de doctorat 3<sup>e</sup> cycle N° 367/2003, Université de Cocody, Abidjan, Côte d'Ivoire* (2003)
- [21] - N. Weber and D. Taylor, in "*7<sup>th</sup> International Congress on plant tissue and cell cultures proceeding*". Amsterdam, Netherlands, 24-29 June (1990) 324-330
- [22] - I. El Hadrami and M. Baazi, *Biol. Plant.*, 37 (1995) 205-211
- [23] - T. Murashige and F. Skoog, *Physiol. Plant.*, 15 (1962) 473-497
- [24] - O.L. Gamborg, R.A. Miller and K. Ojima, *Exp. Cell Res.*, 50 (1968) 151-158

- [25] - C.C. WORTHINGTON, "Analyse methods", Ed. Freehold, New York (1988)
- [26] - E.G. Bligh and W.J. Dyer, *Can. J. Biochem.*, 37 (1959) 911-917
- [27] - D. Laval-Martin et P. Mazliak, "*les lipides*", Ed. Herman, Paris (1995)
- [28] - Y.J. Kouadio, T.H. Kouakou, M. Kone, M. Zouzou and A.P. ANNo, *Afr. J. Biotechnol.*, série 6, vol. 7 (2007) 31-35
- [29] - H. Vits, C. Chi, E. Staba, T. Cooke and W. Hu, *J. Aiche* 40 (1994) 1728-1740
- [30] - K. Nomura and A. KoumamiNe, *Plant Biotech. Agr.*, 20 (1995) 249-265
- [31] - Y. Zuily-Fodil, N. Teodorescu-inonescu, C. Passaquet and A. Thi, *Physiol. Plant.*, 71(1987) 110-114
- [32] - D.J. Murphy, *Plant Biochem. Mol. Biol.*, 5 (1993) 113-128