

REPUBLIQUE DU BENIN

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

CENTRE BENINOIS DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE ET DE L'INNOVATION

Laboratoire Central des Biotechnologies Végétales et Amélioration des Plantes

www.dgb-uac.org – contact@dgb-uac.org – (+229) 21 13 92 31

FICHE TECHNIQUE N°1

Technique de multiplication *in vitro* de *Ocimum basilicum* et de *Ocimum gratissimum* cultivés au Bénin

Dr. Ir. Coovi René DOSSOUKPEVI

Dr. Ir. Moussibaou DJABOUTOU

Dr. Codjo Clément GNIMADI

Dr. Gilles CACAÏ

Pr. Dr. Ir. Guy Apollinaire MENSAH

Pr. Dr. Ir. Corneille AHANHANZO

Dr. Yves Yao Sogbo

INTRODUCTION

MATERIEL VEGETAL

METHODOLOGIE

RESULTATS

IMPLICATION POUR LE DEVELOPPEMENT

CONCLUSION

REMERCIEMENTS

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

PREFACE

Les plantes de *Ocimum basilicum* et de *Ocimum gratissimum*, appartenant à la famille des *Lamiaceae*, poussent dans toutes les régions du Bénin et sont très largement utilisées par les populations locales, qui les mettent couramment en culture autour des habitations et dans les centres maraîchers puis les proposent sur les marchés locaux. Ces deux espèces ne sont pas disponibles sur toute l'année à cause de leur cycle végétatif d'une part et d'autre part en raison de la forte pression anthropique. Elles possèdent de nombreuses vertus sur le plan médical, culinaire et phytosanitaire (antiviral, antifongique, insecticide et bactéricide). Cette pression anthropique entraînerait plus tard l'extinction de leur biodiversité. Grâce aux travaux de thèse du Professeur YAYI Eléonore, Maître de Conférences des Universités, à la Faculté des Sciences et Techniques (FAST) de l'Université d'Abomey-Calavi (UAC), leur culture, leurs usages et surtout leurs huiles essentielles sont connues depuis les années 1990. Les méthodes traditionnelles de culture de ces deux espèces de *Ocimum* très prisées sur le plan culinaire et sur le plan phytothérapeutique ne permettent plus de satisfaire la demande de plus en plus croissante due à l'accroissement de la démographie. Il s'avère alors indispensable d'utiliser les méthodes classiques de la biotechnologie moderne végétale pour d'une part réaliser leur production à grande échelle et d'autre part améliorer leurs métabolites secondaires (huiles essentielles). Pour y parvenir, la culture *in vitro* constituerait l'une des voies à explorer. Ces deux espèces de *Ocimum* regorgent donc une forte potentialité économique pour une nation lorsqu'elles sont valorisées.

Prof. Dr Ir. Guy Apollinaire MENSAH

Directeur de Recherches au CAMES

Directeur du Centre de Promotion et de Transfert

des

Technologies de l'Université d'Abomey-Calavi

Institut National des Recherches Agricoles du

Bénin

INTRODUCTION

Les espèces du genre *Ocimum* dont *Ocimum basilicum* et *Ocimum gratissimum* sont beaucoup utilisées dans la thérapie traditionnelle et dans l'alimentation au Bénin. L'utilisation intensive dont font objet ces deux espèces peut, entre autres, expliquer la forte pression anthropique exercée sur elles si bien qu'à certaines périodes de l'année, elles ne sont plus disponibles dans les différentes zones agro-écologiques de leurs cultures (Ahanhanzo et *al.*, 2009). Les influences négatives de la croissance démographique se ressentent partout dans les espaces ruraux devenus le théâtre de réelles mutations. Ces mutations affectent aussi bien les milieux physique, économique que social (Gnimadi, 2015). Cette forte pression anthropique due à l'accroissement démographique aussi bien en zone rurale qu'urbaine constitue, sans doute, une grave menace d'extinction des ressources génétiques de ces deux espèces. Il convient de développer des stratégies de production à grande échelle et aussi de conservation de ces ressources phytogénétiques. Depuis quelques années, cette multiplication végétative est obtenue à partir des techniques modernes de la biotechnologie végétale dont la culture *in vitro* (culture cellulaire des tissus végétaux).

Ainsi, en un an à partir de cette culture *in vitro*, on peut obtenir des millions de jeunes plants issus de la même plante mère. La culture *in vitro* fait appel à l'utilisation des régulateurs de croissance encore appelés phytohormones ou hormones végétales. Les deux principales phytohormones qui interviennent dans le développement de l'organogenèse des explants ensemencés sur milieu artificiel sont les auxines et les cytokinines. Sur ce, Aïdam (2005) a révélé que la reprise des activités morphogénétiques ne dépend pas seulement des conditions trophiques mais également des balances hormonales. Par ailleurs, Rout et *al.* (2000) et Velcheva et *al.* (2005) ont indiqué que la présence d'auxine et de cytokinine est nécessaire pour la prolifération des jeunes pousses ou plantules. C'est pour permettre aux populations cibles de disposer à toute période de l'année de ces deux précieuses espèces de *Ocimum* que la présente étude a pour objectif d'améliorer, par l'utilisation combinée d'Acide Naphtalène Acétique (ANA) et de Benzyl Amino Purine (BAP), la régénérescence et le développement végétatif de *Ocimum basilicum* et de *Ocimum gratissimum* cultivées au Bénin.

MATERIEL VEGETAL



Figure n°1 : *Ocimum gratissimum*
basilicum

(Labiées)

Nom usuel : Gros basilic

Noms en langues nationales du Bénin

Fongbé : canma didwé, xɛbioso, ciayo

Yoruba : éfinrin, simonuwa, aré bla,
aribla

Mina : zogbéti, ésuru



Figure n°2 : *Ocimum*

(Labiées)

Nom usuel : Basilic

Noms en langues nationales du Bénin

Fongbé : kesu kesu, xesu xesu,
xisi, xisi

Goun : akohun

Yoruba : ofɛn

Mina : koklodamè

Source : FLORE DU BENIN (TOME 3) NOM DES PLANTES DANS LES LANGUES NATIONALES BENINOISES par Simone de Souza 1988 COTONOU (R. P. du Bénin)

Le matériel végétal est constitué de deux espèces de *Ocimum* à savoir : *Ocimum basilicum* et *Ocimum gratissimum*. L'authenticité botanique des échantillons étudiés a été effectuée à l'Herbier National du Bénin (HNB) et ont été identifiés sous les numéros AA6436/HNB pour *Ocimum basilicum* L. et AA6437/HNB pour *Ocimum gratissimum* L. Les explants qui sont des segments uninodaux des tiges des deux espèces ont été prélevés dans la serre du Laboratoire Central des Biotechnologies Végétales et Amélioration des Plantes (LCBVAP).

1. METHODOLOGIE

1.1 Obtention des plantes mères

Les plantes mères ont été obtenues à partir des grainesensemencées dans des pots en polyéthylène remplis de terreau et disposés dans la serre du Laboratoire Central des Biotechnologies Végétales et d'Amélioration des Plantes (LCBVAP) du Département de Génétique et des Biotechnologies de la Faculté des Sciences et Techniques (FAST) à l'Université d'Abomey-Calavi (UAC). Les pots ont été traités avec du carbodan en granulés trois jours avant semis contre les microorganismes du sol à la dose de 4 g par pot. Les plantules ont été traitées avec un insecticide (PACHA) combiné à un fongicide (Topsin-M) un mois au moins après semis ; à la dose de 2 ml d'insecticide et 4 g de fongicide par litre d'eau. Le terreau a été arrosé de manière à maintenir une humidité suffisante pour la germination des graines. Les plantules issues de la germination ont été entretenues dans la serre jusqu'au prélèvement des explants (fragments de tiges). Les prélèvements des explants pour l'établissement des cultures *in vitro* ont été effectués 45 jours après semis pour *Ocimum basilicum* et *Ocimum gratissimum*.

1.2 Préparation des explants

Les fragments de tiges prélevés ont été débarrassés de leurs feuilles, rincés à l'eau distillée stérile puis immergés dans l'alcool éthylique à 70° pendant cinq minutes. Ensuite, ils ont été trempés dans des solutions d'hypochlorite de sodium (10%) contenant quelques gouttes de Tween 20 pendant quinze minutes. Ils ont ensuite été rincés trois fois à l'eau distillée stérile. (Dossoukpevi, 2008).

1.3 Préparation des milieux de culture

Le milieu de base utilisé est celui de Murashige et Skoog (MS) (1962). Pour atteindre l'objectif de la présente fiche technique, il a été ajouté simultanément au milieu MS deux phytohormones (l'ANA et la BAP) à différentes concentrations suivant les combinaisons ci-après : ANA (0,5 mg/L) et BAP (1 mg/L) ; ANA (1 mg/L) et BAP (1 mg/L) ; ANA (2 mg/L) et BAP (1 mg/L). Ce choix a été motivé par les travaux antérieurs qui ont révélé qu'il existe

une forte co-relation entre le rapport auxine/cytokinine dans les milieux et la formation des pousses (Aïdam, 2005, Root et al, 2000). Il a été prouvé qu'en synergie avec les cytokinines, l'auxine participe à la néoformation des bourgeons. Des auteurs ont travaillé séparément sur ces deux espèces de *Ocimum* en utilisant des combinaisons hormonales similaires mais pas à des concentrations identiques à celles proposées ici (Aïdam, 2005, Root et al, 2000)

1.4 Mise en culture des explants

Après l'élimination d'eau par dépôt des explants sur du papier buvard stérile, les explants, morcelés à nœud unique d'environ 1,5 cm de longueur, ont été aseptiquement déposés sur le milieu de base MS (solution minérale de Murashige et Skoog, 1962). Les tubes, contenant chacun un explant, ont été fermés par un couvercle en plastique et scellés avec du film transparent. Toutes ces opérations se sont déroulées sous une hotte à flux laminaire horizontale de marque FASTER. Ces tubes ont été entreposés dans une salle de culture (vitrothèque) à une température moyenne $27^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}$ avec une intensité lumineuse de 6000 lux. L'humidité relative est de 80% et la photopériode est de 12 heures de lumière par jour.

Après chaque ensemencement, les paramètres relatifs au débourrement et à la régénération ont été évalués. Ainsi, le nombre d'explants ayant débourré et ceux ayant régénéré ont été comptés.

1.5 Paramètres de croissance

Le comptage du nombre de pousses, de nœuds et de feuilles ouvertes sur chaque vitroplant pour *Ocimum basilicum* et *Ocimum gratissimum* a été réalisé après quatre (04) semaines de collecte de données à travers les observations et enregistrements dans la salle de culture où ont été déposés les tubes ensemencés.

1.6 Analyse statistique

La conception expérimentale utilisée est aléatoire et chaque traitement est constitué de différentes concentrations d'ANA (0,5 ; 1 ; 2 mg/l) en combinaison avec 1 mg/l de BAP. Chaque combinaison correspondant à un traitement est composée de trois (03) répétitions. Chaque répétition comporte 18 tubes.

Pour les analyses statistiques des résultats, le logiciel SAT-ICF (1997) a été utilisé. Ainsi, le calcul des moyennes a été fait et le test de Student Newman et Keuls au seuil de 5% a servi au classement des moyennes.

2. RESULTATS

Effet des différentes concentrations d'ANA associées à la BAP sur le débourrement et la régénérescence

Tableau n°1 : présente le nombre moyen de débourrement et de régénérescence pour les deux espèces de *Ocimum* étudiées.

Espèces	Traitements	Nbre moyen débourrement	Nbre moyen Régénérescence
ANA			
<i>Ocimum</i>	1 (0,5 mg/L)	0,07 ± 0c	0,07 ± 0b
<i>Basilicum</i>	2 (1 mg/L)	0,65 ± 0a	0,27 ± 0ab
	3 (2 mg/L)	0,42 ± 0,1b	0,38 ± 0a
Moyenne	-	0,23 ± 0 B	0,18 ± 0 B
Probabilité	-	≤ 0,000***	0,013*
CV%	-	17	16
✓	✓	✓	✓
<i>Ocimum</i>	1 (0,5 mg/L)	1,0 ± 0a	0,25 ± 0,1b
<i>Gratissimum</i>	2 (1 mg/L)	1,0 ± 0a	0,68 ± 0a
	3 (2 mg/L)	1,0 ± 0a	0,41 ± 0ab
Moyenne	-	0,93 ± 0 A	0,35 ± 0 A
Robabilité	-	0,009**	0,015*
CV%	-	8	25

Le Tableau 1 présente le nombre moyen de débourrement et de régénérescence pour les deux espèces de *Ocimum* étudiées. Pour le débourrement, le milieu contenant 1 mg/l d'ANA a donné le nombre moyen le plus élevé (0,65) pour *Ocimum basilicum* alors que le nombre moyen le plus faible (0,07) est obtenu sur le milieu contenant 0,5 mg/l d'ANA. Par contre, les trois milieux de culture ont produit le même nombre moyen de débourrement chez *Ocimum gratissimum* (100% de débourrement). Statistiquement, il existe une différence hautement significative au seuil de 0,1% entre les trois milieux pour *O. basilicum* tandis que pour *O. gratissimum* il n'existe aucune différence significative au seuil de 5%. Pour la régénérescence, le Tableau 1 révèle que chez l'espèce *O. basilicum* le nombre moyen le plus faible (0,07) est obtenu sur le milieu contenant 0,5 mg/l d'ANA alors que le nombre moyen le plus élevé (0,38) est issu du milieu contenant 2 mg/l d'ANA. Par contre, pour *O. gratissimum*, la plus forte valeur moyenne de régénérescence (0,68) est obtenue sur le milieu

contenant 1 mg/l d'ANA et la plus faible (0,25) par celui ayant 0,5 mg/l d'ANA. Ces résultats montrent statistiquement qu'il y a une différence significative au seuil de 5% entre les trois milieux chez les deux espèces de *Ocimum* étudiées. Les expériences réalisées dans le cadre de la présente fiche technique ont montré que le nombre moyen de régénérescence est toujours plus élevé chez *Ocimum gratissimum* que chez *Ocimum basilicum*.

2.1 Effet des différentes concentrations d'ANA associées à la BAP sur la formation des pousses

A la fin des 4 semaines, la plus forte valeur moyenne (0,89) du nombre de pousses pour *Ocimum gratissimum* est obtenue sur le milieu contenant 1 mg/l d'ANA et sa valeur la plus faible (0,51) sur le milieu ayant 0,5 mg/l. L'espèce *Ocimum basilicum* a obtenu sa forte valeur moyenne (0,2) sur les milieux contenant 1 mg/l et 2 mg/l d'ANA. Par contre, sa plus faible valeur moyenne (0,07) est obtenue sur le milieu contenant 0,5 mg/l d'ANA. Statistiquement, il y a une différence significative au seuil de 5% entre les trois milieux. Ce qui prouve l'existence d'une interaction entre les génotypes et les régulateurs de croissance surtout l'ANA (Figure 3).

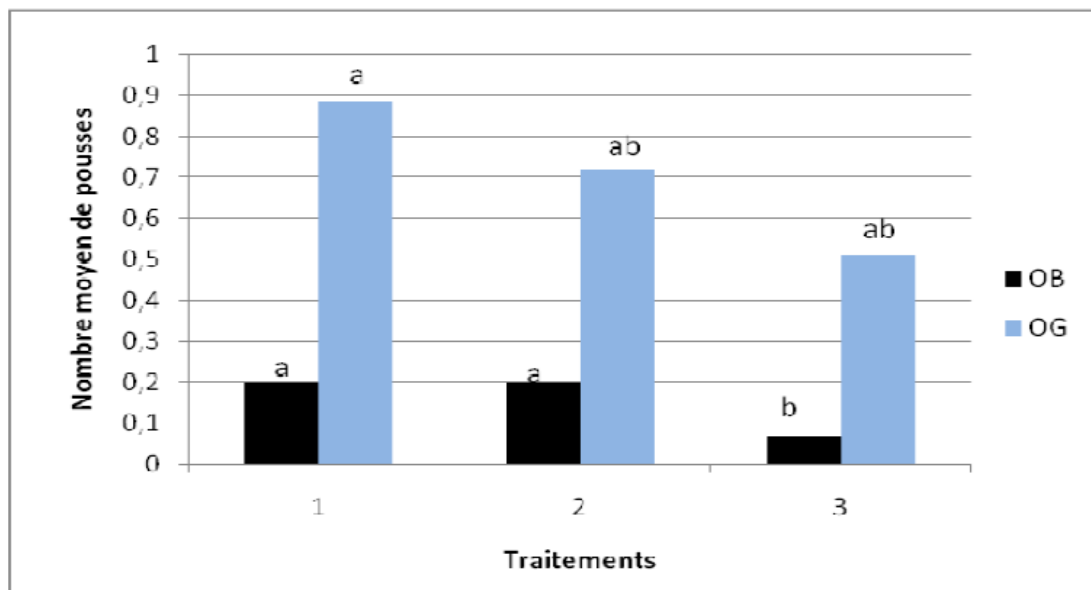


Figure n°3 : Comparaison du nombre moyen de pousses de *Ocimum basilicum* (OB) et de *Ocimum gratissimum* (OG).

2.2 Effet des différentes concentrations d'ANA associées à la BAP sur la formation des nœuds.

A la fin des 4 semaines, la plus forte valeur moyenne (3,50) du nombre de nœuds pour *Ocimum gratissimum* est obtenue sur le milieu contenant 1 mg/L d'ANA et sa valeur la plus faible (1,26) sur le milieu ayant 2 mg/l. L'espèce *Ocimum basilicum* a obtenu sa forte valeur moyenne (0,16) sur le milieu contenant 1 mg/l d'ANA. Par contre, sa plus faible valeur moyenne (0,07) est obtenue sur les milieux contenant 0,5 mg/l et 2 mg/L d'ANA. Statistiquement, il y a une différence significative au seuil de 5% entre les trois milieux pour l'espèce *Ocimum gratissimum* mais elle n'en existe pas au niveau de *Ocimum basilicum*. Il en résulte qu'il existerait une interaction entre les génotypes de l'espèce *Ocimum gratissimum* et les régulateurs de croissance utilisés (Figure 4).

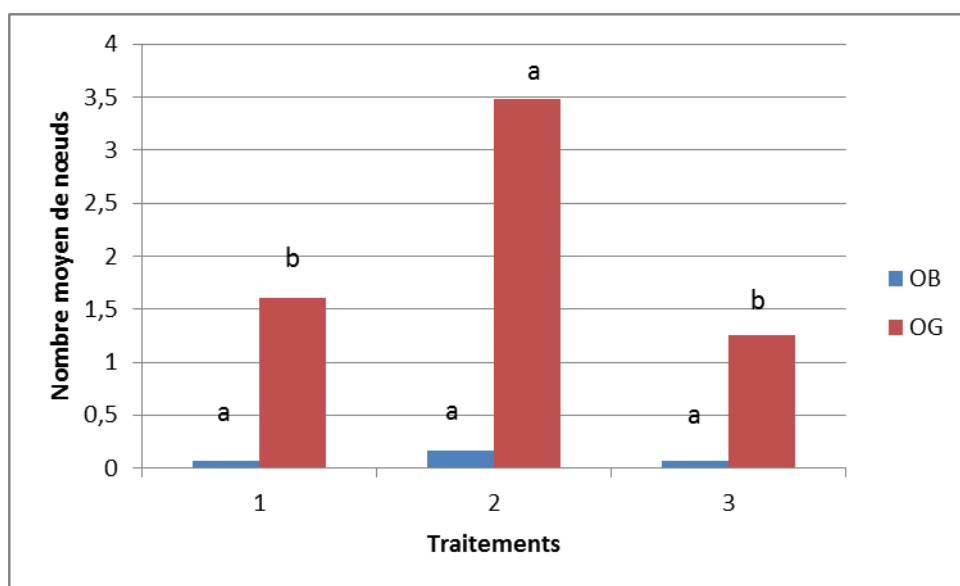


Figure n°4 : Comparaison du nombre moyen de nœuds de *Ocimum basilicum* (OB) et de *Ocimum gratissimum* (OG).

2.3 Effet des différentes concentrations d'ANA associées à la BAP sur la formation des feuilles.

A la fin des 4 semaines, la plus forte valeur moyenne (3,06) du nombre de feuilles pour *Ocimum gratissimum* est obtenue sur le milieu contenant 1 mg/l d'ANA et sa valeur la plus faible (1,84) sur le milieu ayant 0,5 mg/l. L'espèce *Ocimum basilicum* a obtenu sa forte valeur moyenne (1,05) sur le milieu contenant 1 mg/l d'ANA. Par contre, sa plus faible valeur moyenne (0,51) est obtenue par le milieu contenant 0,5 mg/l d'ANA. Statistiquement, il y a une différence significative au seuil de 5% entre les trois milieux pour *Ocimum gratissimum*,

ce qui n'est pas le cas chez l'espèce *Ocimum basilicum*. Ces résultats prouvent l'existence d'une interaction entre les génotypes de l'espèce *Ocimum gratissimum* et les régulateurs de croissance surtout l'ANA (Figure 5).

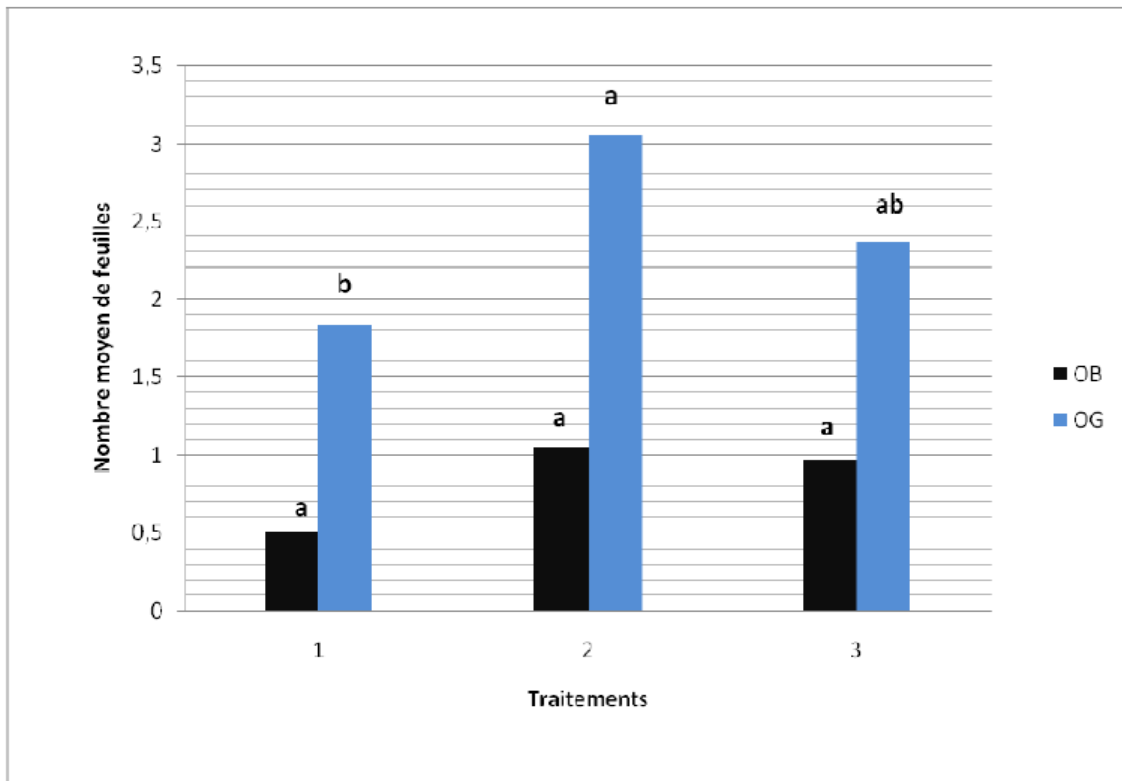


Figure n° 5 : Comparaison du nombre moyen de pousses de *Ocimum basilicum* (OB) et de *Ocimum gratissimum* (OG).

L'initiation *in vitro* de *Ocimum basilicum* et de *Ocimum gratissimum* réalisée à partir de segments uninodaux de tiges montre que la reprise des activités morphogénétiques ne dépend pas seulement des conditions trophiques mais également des balances hormonales dudit milieu. En effet, l'obtention des explants ayant débourré et régénéré est variable d'une espèce à une autre suivant les différentes concentrations d'ANA (0,5 mg/l ; 1 mg/l ; 2 mg/l) associées à la BAP (1mg/l). Les paramètres inhérents à la régénérescence sont entre autres : les pousses, les nœuds et les feuilles. Ces trois paramètres ont trait à la formation des tiges. Au regard des résultats obtenus, il ressort qu'après quatre semaines de culture, le milieu contenant 1 mg/l d'ANA a permis un meilleur débourement des explants primaires chez toutes les deux espèces de *Ocimum* étudiées (*Ocimum basilicum* et *Ocimum gratissimum*) et a facilité la formation et le développement des parties aériennes (nœuds, pousses, feuilles) chez ces dernières en l'occurrence l'espèce *Ocimum gratissimum*.

3. IMPLICATION POUR LE DEVELOPPEMENT

Durant des siècles et même des millénaires, nos ancêtres ont utilisé les plantes pour soulager leurs douleurs, guérir leurs maux et panser leurs blessures. De génération en génération, ils ont transmis leur savoir et leurs expériences simples en s'efforçant quand ils le pouvaient de les consigner par écrit. Ainsi, même actuellement, malgré le progrès de la pharmacologie, l'usage thérapeutique des plantes médicinales est très présent dans certains pays du monde et surtout les pays en voie de développement, en l'absence d'un système médical moderne (Tabuti et *al.*, 2003). La phytothérapie traditionnelle, était et reste actuellement sollicitée par la population ayant confiance aux usages populaires et n'ayant pas les moyens de supporter les conséquences de la médecine moderne.

Les plantes médicinales constituent un patrimoine précieux pour l'humanité et plus particulièrement pour la majorité des communautés démunies des pays en voie de développement dont celles du Bénin qui en dépendent pour assurer leurs soins de santé primaires et leurs subsistances. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, plus de 80% des populations africaines ont recours à la médecine et à la pharmacopée traditionnelle pour faire face aux problèmes de santé. Pour l'utilisation des plantes médicinales, les résultats obtenus montrent que ce sont les femmes qui les utilisent plus, ce résultat est conforme aux résultats obtenus ailleurs par divers auteurs (Kahouadji, 1995 ; Hmamouchi, 2001). Donc ce sont les femmes qui utilisent beaucoup plus les plantes médicinales (y compris *Ocimum basilicum* et *Ocimum gratissimum*) que les hommes.

Au Bénin, force est de constater que les plantes de *Ocimum basilicum* et de *Ocimum gratissimum* poussent dans toutes les régions du pays et sont très largement utilisées par les populations locales, qui les mettent couramment en culture autour des habitations et les proposent sur les marchés locaux. Ces plantes regorgent de fortes potentialités économiques pour une nation lorsqu'elles sont valorisées. Eu égard à leur menace de disparition compte tenu de la pression anthropique, la voie de micro propagation des deux espèces de *Ocimum* permettant une obtention massive de vitroplants pourrait être exploitée dans les programmes

de sélection clonale et dans la production de plantes uniformes afin d'éviter l'extinction de la biodiversité de ces espèces.

Conclusion

Cette étude révèle une bonne aptitude pour la régénération et le développement végétatif des deux espèces de *Ocimum* étudiées en l'occurrence pour l'espèce *Ocimum gratissimum*. La présente étude a montré que le rapport auxine (exemple : ANA) sur cytokinine (exemple : BAP) permet d'améliorer le développement végétatif de *Ocimum basilicum* et de *Ocimum gratissimum* puis de faire ressortir que l'efficacité des régulateurs de croissance dépend de l'espèce, du cultivar ou même de la lignée utilisée. Le rôle prépondérant des phytohormones dans l'orientation de l'organogenèse chez ces deux espèces de *Ocimum* a été mis en exergue par nos travaux. Cette voie de micro propagation des deux espèces de *Ocimum* permettant une obtention massive de vitroplants pourrait être exploitée dans les programmes de sélection clonale et dans la production de plantes uniformes.

REMERCIEMENTS

- Il m'est tout d'abord agréable de remercier mon directeur de thèse, le Professeur Corneille AHANHANZO, Professeur Titulaire des Universités (CAMES). Il m'a accueilli à cœur ouvert dans son laboratoire et accepté diriger ce travail de recherche de main de maître. J'ai ainsi eu la chance de bénéficier de son soutien sans faille et de ses encouragements pendant les durs moments de doute et de découragements. Merci infiniment pour sa disponibilité, son écoute, son soutien moral et sa patience dont il a fait preuve à mon égard lors des travaux de recherche de ma thèse malgré ses multiples activités scientifiques et ses lourdes responsabilités. Par ses conseils et sa rigueur scientifique, il m'a inspiré confiance, le souci de toujours bien faire. Je salue en lui son efficacité et lui exprime ma plus vive reconnaissance.
- J'exprime ma profonde reconnaissance au Professeur Guy Apollinaire MENSAH, Directeur de Recherche (CAMES), pour sa présence et sa participation à l'élaboration de mes fiches techniques. Il n'a ménagé aucun effort pour m'aider à aplanir toutes les difficultés rencontrées lors de la rédaction de ces fiches. Ses remarques et ses précieux conseils ont été très utiles pour mener à bien la rédaction de la présente fiche

technique. Je le prie de trouver ici toute ma gratitude et j'espère pouvoir continuer à bénéficier dans l'avenir de sa haute compétence.

- Docteur Clément GNIMADI, Chargé de Recherche (CAMES) pour ces moments passés ensemble au Laboratoire d'Economie Locale et de Développement Participatif (ELeDP) et la réalisation commune de certaines activités de recherche. Il fut fort agréable de parcourir ce bout de chemin avec toi, et ainsi de devenir amis. Merci de tes coups de mains dans l'élaboration des présentes fiches techniques.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Ahanhanzo C, Dossoukpèvi R, Agassounon DTM, Agbangla C, Dramane K. 2009. Contribution à l'optimisation des conditions de culture *in vitro* de deux espèces de *Ocimum*spp. (*Lamiaceae*) et étude de l'influence des manipulations *in vitro* sur la teneur et la qualité de leur acide désoxyribonucléique (ADN).

Aïdam A.V. 2005. Etablissement des cultures organisées de *Ocimum gratissimum* L. et de *Ocimum basilicum* L. en vue de la production de composés d'intérêts thérapeutiques et phytosanitaires. Thèse de doctorat en Physiologie et Biotechnologie végétales, Université de Lomé, Togo, 158 p.

Dossoukpevi R. , 2008 : Etude du comportement de deux espèces de *Ocimum*spp (*Lamiaceae*) en culture *in vitro* et comparaison de la qualité de l'ADN de leurs vitroplants à celle des plantes-mères.

Gnimadi C. C., Sèmassa M.I.H. et Igué A.M., 2015 : Pauvreté et cadre de vie en milieu rural dans la commune d'Allada au sud-Bénin (département de l'Atlantique), *Dynamiques Spatiales et Développement : Revue semestrielle du Laboratoire d'Etudes des Dynamiques Urbaines et Régionales*, n°005, juin 2015 : 134-160, ISSN : 1840-7455.

Hmamouchi M., 2001 : Les plantes médicinales et aromatiques marocaines. 2ème. Ed. 389 p.

Kahouadji M.S. 1995 - Contribution a une étude ethnobotanique des plantes médicinales dans le Maroc Oriental - Thèse de 3ème cycle, Université Mohamed 1er, Fac. Sc., Oujda, 207 pp.

Tabuti J.R.S., Lye K.A. et Dhillion S.S., 2003.- Traditional herbal drugs of Bulamogi, Uganda : plants, use and administration. *J. Ethnopharmacology*, 88, 19-44.

Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, 15 (3): 473-497.

Rout GR, Reddy GM, Das P. 2000. *In vitro* manipulation and propagation of medicinal plants. *Biotechnology Advances*, 18: 91-120.

Velcheva M., Faltin Z., Vardi A., Eshdat Y. and Peral A.,2005: Regeneration of *Aloe arborescens* via organogenesis from young inflorescences. *Plant cell, Tissue organ Cultuae*. 83 : 293-301.