

MICROPROPAGATION ET RHIZOGENESE *IN VITRO* CHEZ *NAUCLEA LATIFOLIA* SMITH (RUBIACEAE)

Rassimwai Pitekélabou

Doctorant, Département de Botanique

Kodjo Djidjolé Etse

Docteur en Physiologie et Biotechnologie végétales, Assistant au
Département de Botanique

Atsou Vincent Aidam

Maître de Conférences, Département de Botanique, Chef du Laboratoire de
Physiologie et Biotechnologie Végétales
Laboratoire de Physiologie et Biotechnologie Végétales, Faculté des
Sciences, Université de Lomé Togo

Abstract

To contribute to environmental protection and to reduce the rarefaction of the *Nauclea latifolia*, micropropagation and production of roots *in vitro* were undertaken. In this work, the young seedlings used were obtained from *in vitro* germination of seeds. Two culture media, MS and WPM, gave identical results. Benzylaminopurine (BAP) induces shoots proliferation and Indol-butyric acid (IBA) promotes roots proliferation. Activated charcoal inhibits the rhizogenesis. IBA 19,68 μM induces callus formation from foliar fragments. Callus obtained with Naphtalen-acetic acid (NAA) 2,68 -5,37 – 10,74 and 21,48 μM initiate roots.

Keywords: *Nauclea latifolia*, micropropagation, rhizogenesis, callogenesis

Résumé

Pour contribuer à la protection de l'environnement et réduire la raréfaction de l'espèce, la micropropagation et la production de racines *in vitro* ont été entreprises. Dans le présent travail, les jeunes plantules utilisées sont issues de la germination *in vitro* des graines de cette plante. Les deux milieux de culture, à savoir le milieu MS de Murashige et Skoog et le milieu WPM (wood plant medium) utilisés, ont donné les résultats identiques. La benzylaminopurine (BAP) favorise la prolifération de pousses et l'acide indole-butyrique (AIB) celle des racines. Le charbon actif inhibe la

rhizogénèse. L'AIB à 19,68 μM induit la formation des cals à partir des fragments foliaires. Sous l'effet de l'acide naphthalène acétique (ANA) aux concentrations de 2,68 -5,37 – 10,74 et 21,48 μM , les cals formés initient des racines.

Mots-clé: *Nauclea latifolia*, micropropagation, rhizogénèse, callogénèse

Introduction

Nauclea latifolia est un arbuste plus ou moins sarmenteux atteignant 4 à 9 m de hauteur. La tige présente une écorce crevassée d'un gris-brun foncé et des tranches fibreuses rougeâtres (Arbonnier 2000). Cette espèce se trouve dans les savanes et est appelée pêcher africain ou pêcher guinéen (Iwu 1993). Cette essence intervient seule ou en association avec d'autres plantes dans le traitement de nombreuses maladies telles que les caries, le paludisme, le diabète, la conjonctivite, la varicelle, la fracture des membres, les ulcères, les hémorroïdes, certains cas de stérilité masculine, l'avortement (Iwu 1993), (Deeni and Hussain 1991, Gidado *et al.* 2005). Il a été observé que cette espèce contient des alcaloïdes (Hottelier *et al.* 1979), des tanins, des caroténoïdes, des glucides et des saponosides (Kabore *et al.* 1995).

Les plus récents tests *in vitro* ont montré que les extraits de cette plante possèdent un pouvoir antibiotique (de Souza *et al.* 1989, El-Mahmoud *et al.* 2008, Kabore *et al.* 1995). Ademola *et al.* (2007) ont montré que les extraits aqueux et éthanoliques de *N. latifolia* sont efficaces dans l'élimination des nématodes gastro-intestinaux chez les moutons. Les extraits aqueux du tronc de cette espèce réduisent le taux de cholestérol chez les rats (Arise *et al.* 2012) et ceux des feuilles baissent le taux de glucose dans le sang des diabétiques (Gidado *et al.* 2005). Les effets inhibiteurs des extraits des feuilles et des racines de *N. latifolia* sur les espèces bactériennes suivantes : *E. coli*, *Shigella fleseneri*, *Salmonella tphi*, *Staphylococcus aureus* ont été démontré (Anowi *et al.* 2012), (Nikiema 2005, Kabore *et al.* 1995). Par ailleurs, Benoit-Vical *et al.* (1998) ont observé un effet inhibiteur des extraits aqueux de racines de *N. latifolia* sur des souches de *Plasmodium falciparum* résistantes à la chloroquine. Ainsi, *N. latifolia* se révèle être une plante très intéressante pour son activité antipaludique positive et sa faible cytotoxicité (Njomnang 2008, Guede *et al.* 2005). Les extraits de racines ont également les propriétés antidépressives et myorelaxantes (Taïwe *et al.* 2010).

Malheureusement la récolte des organes de cette essence en raison de son efficacité dans le traitement de diverses pathologies conduit à la rareté de l'espèce. Pour éviter cette raréfaction et favoriser l'accessibilité de cette espèce à tous ou encore améliorer le rendement en métabolites secondaires

d'intérêt, il est indispensable de mettre en œuvre des stratégies de sauvegarde et de production *in vitro et in situ*.

Notre étude est ciblée sur la micropropagation de *N. latifolia* à partir des jeunes plantules issues de la germination *in vitro* de graines et l'initiation de la rhizogenèse et de la callogenèse à partir des fragments foliaires des vitro-plants.

Materiel Et Methodes

Les graines sont désinfectées superficiellement à l'alcool éthylique (70%) pendant 1 minute, et ensuite trempées dans de l'hypochlorite de sodium (eau de Javel la Croix à 2,6% de chlore actif) pendant 2 minutes. Puis elles sont ensuite abondamment rincées à l'eau distillée stérile. Les graines ainsi désinfectées sont mises à germer sur le milieu minéral complet de Murashige et Skoog (MS) (Murashige and Skoog 1962) additionné de saccharose à 30 g L⁻¹ et solidifié avec de l'agar-agar à 8 g L⁻¹. Après germination les apex sont prélevés et cultivés sur les milieux solides MS et de Lloyd et McCown (WPM : Woody plant medium) (Lloyd and McCown 1980), supplémentés de saccharose à 30 g L⁻¹ et solidifié avec de l'agar-agar à 8 g L⁻¹. Le pH du milieu est ajusté entre 5,6 et 5,7. Les cultures sont faites dans des tubes en verre (16 x 180 mm) fermés avec un bouchon et placées dans une chambre de culture dans laquelle la photopériode est de 16 heures, la température de 27 ± 2°C et l'intensité lumineuse, fourni par des tubes fluorescents, de 120 µE m⁻² s⁻¹.

Les plantules issues de la culture des apex sont découpées en segments uninodaux placés chacun sur le même milieu que celui des explants primaires, les conditions de culture restant identiques. Les repiquages sont effectués toutes les quatre semaines. A la fin de chaque semaine, nous évaluons le nombre de racines, de nœuds ainsi que l'allongement de la tige de chaque plantule.

Pour améliorer l'enracinement et le développement caulinaire, des segments uninodaux sont placés sur le milieu M.S avec les phytohormones suivantes: BAP (0,44 µM et 4,44 µM) et AIB (0,49 µM et 4,90 µM) pendant la phase de multiplication.

L'effet du charbon actif sur le développement des explants est étudié à une concentration de 2 g L⁻¹.

L'induction d'une callogenèse s'est faite en présence de fragments foliaires des vitroplants, de dimensions 1 cm x 0,2 cm environ et comportant la nervure principale. Ces fragments sont mis en culture sur le milieu MS contenant de l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D) à 9,05 ou 18,10 µM ou contenant de l'AIB à 9,84 ou 19,69 µM. L'incubation est faite à l'obscurité pendant un mois.

Des fragments foliaires, identiques sont utilisés pour l'initiation de *in vitro* racines. Le milieu utilisé est le MS additionné d'acide naphthalène

acétique (ANA) à différentes concentrations (2,68 -5,37 – 10,74 – 21,48 μM). L'incubation se déroule à l'obscurité ou à la lumière pendant une durée d'un mois. Les observations et les mesures sont effectuées toutes les semaines.

Le classement des moyennes en groupes homogènes est fait par une analyse post-hoc selon le test de comparaison de Newman et Keuls au seuil de 5% après une ANOVA one-way grâce au logiciel STATISTICA 10. (Copyright © StatSoft. Inc. 1984-2011).

Resultats

Phase d'initiation

✓ Germination des graines

La germination des graines de *Nauclea latifolia* a commencé le 10^{ème} jour après la mise en culture, s'est étalée sur 7 jours et a atteint un taux de 50%.

✓ Croissance et développement des plantules sur milieu MS et WPM

Les segments uninodaux issus de la culture des apex ont présentés un bon et identique développement sur les deux milieux (*Figure 1*). En effet aucune différence d'efficacité n'est notée entre les deux milieux de culture (*Tableau D*). Le milieu MS est choisi pour la suite des travaux.



Figure 1 : Plantule de *Nauclea latifolia* après 6 semaines de culture sur le milieu MS sans phytohormone (Barre = 1 cm)

Phase de multiplication

✓ Influence du charbon actif (CA)

Les explants de *Nauclea latifolia* cultivés en présence de charbon actif, ne se sont pas bien enracinés par rapport à ceux du milieu MS privé du charbon actif. En effet, il a été noté, une différence significative au seuil de 5% selon le test de Newman et Keuls au niveau de l'enracinement des explants sur les 2 milieux supplémentés ou non en charbon actif. (*Tableau*

II). Les rares racines des explants, apparues sur le milieu MS additionné de charbon actif, sont moins vigoureuses et n'initient pas de racines secondaires.

Tableau II : Effet du charbon actif sur la morphogenèse des explants de *Nauclea latifolia*

1	Nombre moyen de nœuds/plant	Nombre moyen de racines/plant	Taille moyenne d'un plant
MS	3,3 ± 0,06 ns	4,2 ± 0,20 a	1,34 ± 0,08 ns
MS + CA (2g/L)	3,8 ± 0,10 ns	1,1 ± 0,11 b	1,31 ± 0,04 ns

✓ Influence des régulateurs de croissance

L'AIB à 4,90 µM a favorisé la production des racines, à la base des tiges feuillées de *Nauclea latifolia* (Tableau III). Par contre les tiges feuillées de *N. latifolia* obtenues en présence de l'AIB à 0,49 µM, n'ont pas pu s'enraciner comme celles cultivées en présence d'AIB à 4,90 µM. (Tableau III).

Sur le milieu MS additionné d'AIB à 4,90 µM, les tigelles produites par les explants sont plus épaisses avec des entre-nœuds plus déboîtés que celles des plants du milieu témoin MS. Des cals sont observés à la base des plantules (Figure 2.a).

Tableau III : Influence de l'AIB sur les explants de *Nauclea latifolia*, après 6 semaines de mise en culture

Milieux	Nombre moyen de nœuds/plant	Nombre moyen de racines/plant	Nombre moyen de pousses/plant
MS + AIB (0,49 µM)	4,1 ± 0,16 ns	4,4 ± 0,35 b	1,5 ± 0,05 ns
MS + AIB (4,90 µM)	3,3 ± 0,10 ns	13,1 ± 0,93 a	1,1 ± 0,03 ns
MS + AIB (0 µM)	3,3 ± 0,11 ns	4,4 ± 0,22 b	1,1 ± 0,03 ns

En présence de BAP, les explants produisent plus de nœuds. Cependant les entre-nœuds portés par ces tigelles sont courts par rapport à ceux des plantules du milieu MS privé de BAP (Figure 2.b). Cette phytohormone a aussi induit l'initiation de cals à la base des plantules.

Contrairement à l'AIB, la BAP a inhibé la formation des racines (0,00 racines/plant à 4,44 µM de BAP), mais a stimulé la production de pousses sur chaque plant (Tableau IV).

Tableau IV : Influence de BAP sur les explants de *Nauclea latifolia*, 6 semaines après la mise en culture

Milieux	Nombre moyen de nœuds/plant	Nombre moyen de racines/plant	Nombre moyen de pousses/plant
BAP 0,44 µM	9 ± 0,28b	1,1 ± 0,14b	4,7 ± 0,18b
BAP 4,44 µM	13,1 ± 0,69a	0,0 ± 0,0c	7,3 ± 0,44a
BAP 0,00 µM	3,3 ± 0,11c	4,4 ± 0,22a	1,1 ± 0,03c

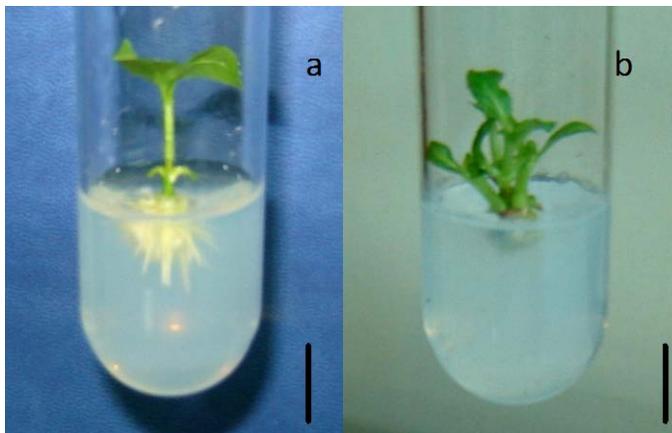


Figure 2 : Effet comparatif de l'AIB (a) et de la BAP (b) sur le développement caulinaire et racinaire des vitroplants, après 2 semaines de culture (Barre = 1 cm).

Initiation de la callogenèse

Quatre semaines après la mise en culture, seuls les fragments foliaires cultivés sur le milieu MS contenant de l'AIB à $19,69 \mu\text{M}$ ont formé des cals. Ces cals sont blancs (*Figure 3*) et compacts. Par contre avec le 2,4-D, aucun fragment n'a initié de cal.



Figure 3 : Cal obtenu à partir des fragments foliaires de *Nauclea latifolia* cultivés sur milieu MS supplémenté avec l'AIB à $19,69 \mu\text{M}$ (Barre = 1 cm).

Initiation des racines à partir des fragments foliaires

Quatre semaines après la mise en culture, 80% des fragments foliaires ont développé des racines aussi bien à la lumière qu'à l'obscurité et ce, avec les différentes concentrations d'ANA ($2,68 - 5,37 - 10,74 - 21,48 \mu\text{M}$). Cependant les racines obtenues à la lumière, présentent une couleur verte, tandis que celles obtenues à l'obscurité ont une couleur blanche.

Sur le milieu témoin, milieu MS, seuls 20% des fragments foliaires ont initié des racines dans ces deux conditions d'éclairage. Cependant, les racines formées à la lumière sur le milieu témoin sont de couleur blanche contrairement à celles obtenues à la lumière en présence d'ANA qui sont vertes (*figure 4*).



Figure 4 : Emergence de racines à partir des fragments foliaires cultivés sur le milieu MS additionné d'ANA (concentration en 10,74 μM) et maintenus à l'obscurité (a,b) ou à la lumière (c) (Barre = 1 cm).

Discussion

Le succès de la culture *in vitro* d'une espèce végétale est influencée par plusieurs facteurs dont le milieu de culture (Cozza *et al.* 1997), (Leva *et al.* 1992) et la présence de phytohormones exogènes (Cordeiro *et al.* 2012), (Etsè *et al.* 2011). Les résultats de ce travail montre que les milieux de Murashige et Skoog (MS) ou de Lloyd et McCown (WPM : wood plant medium) peuvent être utilisés pour la micropropagation de *Nauclea latifolia* qui est une ligneuse. Nous avons choisi le milieu MS le plus souvent utilisé en culture *in vitro*.

Le charbon actif s'est révélé défavorable à la morphogénèse, en raison de son effet inhibiteur sur l'enracinement des explants de *Nauclea latifolia*. Nos résultats sont conformes à ceux obtenus par Gomes et Canhoto chez *Arbutus unedo* L. (Gomes 2009), mais opposés à ceux rapportés par Etsè *et al.* (2011) chez des vitroplants de *Zanthoxylum zanthoxyloides* Lam., ou par Soami *et al.* (2005) chez *Annona glabra* L. qui ont montré un effet favorable du charbon actif sur la rhizogénèse.

Dans cette phase de multiplication, l'AIB et la BAP ont été utilisés pour améliorer respectivement l'organogénèse racinaire et caulinaire. Ainsi, à la dose de 0,49 μM , l'AIB n'a pas eu d'effet visible sur l'enracinement des explants. Aucune différence significative n'a été notée entre les explants du milieu MS additionné d'AIB à 0,49 μM et ceux du milieu MS privé d'AIB.

A l'opposé, la concentration de 4,90 μM d'AIB, favorise significativement la formation des racines des explants *Nauclea latifolia*. Ce résultat confirme celui obtenu par Mehta *et al.* chez *Terminalia bellerica* Roxb (Mehta *et al.* 2012); Romano *et al.* (1992) chez *Quercus suber* L [26] et par Leonardi *et al.* (2001) chez les deux autres espèces, *Grevillea rosmarinifolia* et *Grevillea semperflorens*. La concentration en AIB est donc un facteur déterminant dans l'organogénèse racinaire comme l'a rapporté Etsè *et al.* (2011) qui ont montré que les faibles concentrations en auxine n'étaient

pas efficaces mais aussi que les fortes concentrations induisaient plutôt une dédifférenciation cellulaire conduisant à la formation de gros cals à la base des vitroplants de *Z. zanthoxyloides* Lam..

L'effet de l'AIB comme tous les autres régulateurs de croissance est fonction des concentrations endogène et exogène. Ces mêmes observations ont été relevées par Manzanera et Pardos (1990) chez *Quercus suber* L.

La BAP à 0,44µM et 4,44 µM, améliore le développement de pousses et de nœuds, mais inhibe la formation de racines. Nos résultats sont en concordance avec ceux de Gurnani *et al.* (2012) qui ont montré que la BAP a permis la meilleur initiation des bourgeons chez *Bacopa monneiri* L.. Fotso *et al.* (2004) ont rapporté le même résultat en montrant que la BAP a permis la prolifération de 91% des pousses présents au niveau des nœuds sur une bouture de *Ricinodendron heudelotii*. D'autres auteurs comme Omokolo *et al.* (2004) ont aussi montré l'effet bénéfique de la BAP sur la prolifération de pousses chez *Irvingia gabonensis*. De plus, EL Kbiach *et al.* (2002) ont observé que la BAP, parmi les autres cytokinines utilisées, paraissait être la plus efficace pour la prolifération des pousses chez *Quercus suber* L.

Les résultats des tests effectués sur les explants de *Nauclea latifolia* reflètent les effets antagonistes d'une auxine (AIB à 4,90 µM) et d'une cytokinine (BAP à 0,44 µM ou 4,44 µM) sur la rhizogenèse et la prolifération des pousses des explants. En effet l'AIB à 4,90 µM, augmente le nombre de racines par plant mais ne présente pas d'effet significatif sur la prolifération des pousses. Par contre la BAP à 0,44 µM inhibe la formation de racines et stimule la production de pousses, augmentant ainsi le nombre de pousses par plant. Ces résultats sont en conformité avec ceux obtenus par Gonzalez-Rodriguez *et al.* (2010) chez une ligneuse, *Tabebuia donnell-smithii* rose (bignoniaceae).

Les essais d'initiation de la callogenèse ont montré que le 2,4-D à toutes les concentrations utilisées n'a pas pu induire la formation des cals à partir des fragments foliaires. Cette réponse peut être interprété par une insensibilité des fragments foliaires de *N. latifolia* au 2,4D, ce qui n'est pas probable, ou plutôt à une toxicité de l'hormone aux concentrations utilisées; cette auxine étant qualifiée de forte et servant d'herbicide. Ce résultat est contraire à celui obtenu par Etsè (2010) utilisant la même phytohormone sur des fragments de tige ou de feuille de *Zanthoxylum zanthoxyloides* Lam pour produire des cals. Il ne s'accorde pas non plus avec ceux rapportés par Nehra *et al.* (1990) puis Isac *et al.* (1994) qui ont obtenu une nette callogenèse chez *Fragaria annanassa* en présence de 2,4D.

Par contre l'AIB à 19,69 µM provoque la dédifférenciation cellulaire chez des fragments foliaires de *Nauclea latifolia*, ce qui permet l'apparition des cals. Youmbi *et al.* (2001) ont obtenu un résultat contraire au nôtre. En

effet ces auteurs ont montré que le 2,4-D induit la callogenèse alors qu'AIB est inefficace sur les fragments cotylédonaire de *Dacryodes edulis*.

L'ANA, à toutes les concentrations utilisées, induit la formation et le développement de racines *in vitro* à partir des fragments foliaires de *Nauclea latifolia*. Cette phytohormone est capable de réorienter les cellules foliaires de *Nauclea latifolia* vers la formation d'ébauches racinaires en présence ou non de la lumière. Ce résultat s'oppose à celui de Hammerschlag *et al.* (1987), rapportant qu'une période d'obscurité précédant ou en début d'induction stimulait la rhizogenèse.

La couleur verte des racines formées à la lumière serait due à l'action conjuguée de l'ANA et de la lumière laquelle favoriserait la formation de chlorophylle, puisque les racines obtenues *in vitro* à la lumière ne verdissent pas en l'absence d'ANA dans le milieu de culture. En effet selon Hammerschlag *et al.* (1987), il y a une interaction entre les voies de signalisation de la lumière et de l'auxine dans le contrôle de la rhizogenèse adventive (Hammerschlag *et al.* 1987).

Conclusion

Les résultats de ce travail montrent que la culture *in vitro* peut être une alternative à la production en masse et à la sauvegarde d'espèces menacées telles que *Nauclea latifolia*. L'initiation et la culture *in vitro* de racines pourrait aussi participer à réduire la pression entropique sur cette espèce sous réserve de démontrer d'une part un bon niveau de synthèse de métabolites secondaires d'intérêts dans ces organes et d'autre part d'optimiser cette biosynthèse.

References :

- Arbonnier M. (2000). Arbres, arbustes et lianes des zones sèches d'Afrique de l'Ouest Ed. CIRAD-MNHN Montpellier, 2ème édition, Paris 573p.
- Ademola I.O., Fagbemi B.O. and Idowu S.O. (2007). Anthelmintic efficacy of *Nauclea latifolia* extract against gastrointestinal nematodes of sheep: in vitro and in vivo studies. *Afr. J. Trad. Cam.* 4 (2), 148 – 156
- Anowi C.F., Cardinal N.C., Mbah C.J. and Onyekaba T.C. (2012). Antimicrobial properties of the methanolic extract of the leaves of *nauclea latifolia*. *International Journal of Drug Research and Technology* 2 (1), 45-55
- Arise R.O., Akintola A.A., Olarinoye J.B. and Balogun E.A. (2012). Effects of Aqueous Extract of *Nauclea latifolia* stem on lipid profile and some enzymes of rat liver and kidney. *International Journal of Pharmacology* 8 (5), 389-395
- Benoit-Vical F., Alexis V., Cournac V., Pelissier Y., Mallie M. and Jean-Marie B. (1998). In vitro antiplasmodial activity of stem and root extracts of *Nauclea latifolia*. *Journal of Ethno Pharmacology* 61, 173 - 178

- Cordeiro S.Z., Simas N. K., Henriques A. B., Lage C.L.S. and Sato A. (2012). Micropropagation of *Mandevilla moricandiana* (A.DC.) Woodson. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant* 48, 620-626. DOI 10.1007/s11627-012-9477-5
- Cozza R., Turco D., Bati C.B. and Bitonti B. (1997). Influence of growth medium on mineral composition and leaf histology in micropropagated plantlets of *Olea europaea*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 51 (3), 215-223
- De Souza C.A., Koumaglo K. and Gbeassor M. (1989). Contribution à l'étude des propriétés microbiennes de *Dialium guineense* et *Nauclea latifolia* 14è Conférence biennale de l'Association Scientifique de l'Ouest Afrique (ASOA/WASA). Université Nationale du Bénin. Cotonou 11-15 Septembre 1989
- Deeni Y.Y. and Hussain H.S.N. (1991). Screening for antimicrobial activity and alkaloids of *Nauclea latifolia*. *J. Ethnopharmacology* 35, 91 – 96
- El Kbiach M.L., Lamarti A., Abdali A. and Badoc A.(2002). Culture *in vitro* des bourgeons axillaires de chêne-liège (*Quercus suber* L.) ii - Influence des régulateurs de croissance sur la multiplication et l'enracinement. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux* 141, 89 - 104
- El-Mahmood A.M., Doughari J.H. and Chanji F.J. (2008). *In vitro* antibacterial activities of crude extracts of *Nauclea latifolia* and *Daniella oliveri*, *Scientific Research and Essay* 3 (3), 102 - 105
- ETSE K.D. (2010). Contribution à l'étude phytochimique, à la micropropagation et à la production de composés d'intérêt thérapeutique par des cultures organisées *in vitro* de *Zanthoxylum zanthoxyloides* Lam (Zepernick et Timler).Thèse de Doctorat Unique de l'Université de Lomé. Lomé (2010) 192pp
- Etsè K.D., Aïdam A.V., De Souza C., Creche J. and Lanoue A. (2011). *In vitro* propagation of *Zanthoxylum zanthoxyloides* Lam., an endangered African medicinal plant. *Acta Botanica Gallica* 158 (1), 47-55
- Fotso, Danfagsiteli T.N., Mbouna D., Omokolo N.D. (2004). *In vitro* propagation of *Ricinodendron heudelotii* by cuttings. *Fruits* 59 (5), 351-358
- Gidado A., Ameh D. A. and Atawodi S. E. (2005). Effect of *Nauclea latifolia* leaves aqueous extracts on blood glucose levels of normal and alloxan-induced diabetic rats. *African Journal of Biotechnology* 4 (1), 91-93
- Gomes F. and CANHOTO J.M. (2009). Micropropagation of strawberry tree (*Arbutus unedi* L.) from adult plants. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant* 45, 72-82. DOI 10.1007/s11627-008-9164-8
- González-Rodríguez J.A., Ramírez-Garduza F., Robert M. L., O'Connor-Sánchez A. and Peña-Ramírez Y. J. (2010). Adventitious shoot induction from adult tissues of the tropical timber tree yellow Ip, primavera (*Tabebuia donnell-smithii* rose [Bignoniaceae]). *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant* 46, 411-421. DOI 10.1007/s11627-010-9304-

- Guede N. Z., Lengo M., Frederic G.G., Bernard B. and Philippe G. (2005). *In vitro* antiplasmodial activity and cytotoxicity of 33 West African plants used for treatment of malaria. *Journal of Ethnopharmacology* 98, 281 - 285
- Gurnani, V. Kumar, S. Mukhija, A. Dhingra, S. Rajpurohit and P. Narula, *In vitro* regeneration of brahmi (*bacopa monneiri* (L.) penn.) - a threatened medicinal plant. *Kathmandu University Journal of Science, Engineering and Technology* 8 (1), 97- 99
- Hammerschlag F.A., Bauchan G.R. and Scorza R. (1987). Factors influencing *in vitro* multiplication and rooting of peach cultivars. *Plant Cell Tiss. Org. Cult* 8, 243 - 8
- Hottelier F., Delaveau P. and Pousset J.L. (1979). Alcaloïdes et Gluco-Alcaloïdes des feuilles de *Nauclea latifolia*. *Planta Medica, Journal of Medicinal plant Research* 35, 242-246
- Isac V., Popescu A.N. and Coman M. (1994). Studies on plant regeneration from tissue-derived callus in *Fragaria x ananassa* Duch. In Schmidts(H), Kellerhals(M) *Progress in temperate fruit breeding*. Kluwer Academic Publishers, 395 - 398
- Iwu M.M. (1993). *Handbook of African medicinal plants*. 1st Ed., CRC Press, Boca Raton, FL., 464pp
- Kabore Z.I., Guissou I.P. and Sourabi S. (1995). Etude Pharmacologique chimique de *Nauclea latifolia*. Relation Principe chimiques et activité antimicrobienne. *Pharm. Méd. Trad. Afr.* 43-45
- Leonardi C., Ruggeri A., La Malfa S. (2001). Hormone effects on *in vitro* proliferation and rooting of *Grevillea* explants. *Scientia Horticulturae* 90, 335-341
- Leva A.R., Petruccelli R., Panicucci M. (1992). Ruolo di alcuni microelementi e carboidrati nella proliferazione *in vitro* di cv Di olivo (*Olea europea* L) *Atti quattava olio extravergine di oliva*, Firenze, 1-3, 333pp
- Lloyd G. and McCown B. (1980). Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Int. Plant Prop. Soc. Proc.* 30, 421
- Manzanera J.A., and Pardos J.A. (1990). Micropropagation of juvenile and adult *Quercus suber* L. *Plant Cell. Tiss. Org. Cult.* 21, 1 – 8
- Mehta J., Sain M., Mathuriya B.L., Naruka R., Kavia A. and Sharma R.D. (2012). Rapid micropropagation and callus induction of *Terminalia bellerica* Roxb. *Asian Journal of Plant Sc and Research* 2 (3), 364-368
- Murashige T. and Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473 - 497
- Nehra N.S., Stushnoff C. and Kartha K.K. (1990). Regeneration of plants from immature leaf-derived callus of strawberry (*Fragaria x ananassa*). *Plant. Sci. Shannon, Irel* 66 (1), 119-126

- Nikiema W.P.R. (2005). Propriétés pharmacochimiques de *Calotropis procera* ait. (Asclepiadaceae) récolté au mali : étude préclinique des effets anti inflammatoires et antimicrobiens des extraits des écorces de racines. Thèse de Doctorat d'Etat en Pharmacie. Université de Bamako, 162pp
- Njomnang P.S. (2008). Recherche de nouveaux composés à activité antipaludique à partir de différentes pharmacopées traditionnelles. Thèse de doctorat de l'Université de Toulouse. Université de Toulouse (2008) 167pp
- Omokolo D.N., Fotso, Oumar and Duclaire M. (2004). Propagation d'*Irvingia gabonensis* par microbouturage *in vitro*. Fruits 59 (1), 31- 38. DOI: <http://dx.doi.org/10.1051/fruits:2004004>
- Romano A., Noronha C. and Martins-Louçao M.A. (1992). Influence of growth regulators on shoot proliferation in *Quercus suber* L. Ann. Bot. (London) 70, (6) 531 - 536
- Soami F.C.D., Renato P., Patricia D.O.P. and Magdi A.I.A. (2005). La micro propagation d'*Annona glabra* L. à partir de segments nodaux. Fruits 60, 319 - 325
- Taiwe G.S., Ngo Bum E., Dimo T., Talla E., Weiss N., Dawe A., *et al.* (2010). Antidepressant, myorelaxant and anti-anxiety-like effects of *Nauclea latifolia* Smith. (Rubiaceae) roots extract in murine models. International Journal of Pharmacology 6 (4), 364-371
- Youmbi E. and Abdelatif B. (2001). Effects of auxins on cotyledon lobes of African bush butter (*Dacryodes edulis* (Don) Lam.) cultivated *in vitro*. Cahiers d'études et de recherches francophones/Agricultures 10 (6), 397 - 400