

EFFETS DE DEUX PHYTOHORMONES EXOGENES ET DU NAACL SUR LA MORPHOGENESE *IN VITRO* D'*OCIMUM CANUM* SIMS

Aliaki Essozima
Etse Kodjo Djidjole
Glato Kodjo
Pitekélabou Rassimwàï

Laboratoire de Physiologie et Biotechnologies Végétales, Département de
Botanique, Faculté des Sciences, Université de Lomé, Lomé, Togo

Koba Koffi

Unité de Recherches sur les Agroressources et la Santé Environnementale
(URASE), Ecole supérieure d'agronomie, Université de Lomé, Lomé, Togo

Aïdam Atsou

Laboratoire de Physiologie et Biotechnologies Végétales, Département de
Botanique, Faculté des Sciences, Université de Lomé, Lomé, Togo

Abstract

In vitro regeneration of *Ocimum canum* has been possible by the use of micropropagation methods. The seeds need the light to germinate. The plantlets obtained from the germinated seeds are used for the micropropagation. The plantlets are sliced in to single nodal fragments and grown on the Murashige and Skoog basic medium containing Indol-butyric acid (IBA), Benzylaminopurine (BAP) and sodium chlorite.

The results have shown that the Murashige and Skoog medium favored the normal growth of the vitroplants of *Ocimum canum*. The Indol-butyric acid (IBA) facilitated the plants rooting with a maximum of 25 roots/vitroplant at the concentration of 3 mg/L. The Benzylaminopurine (BAP) increased the multiplication rate. The combination of the IBA and the BAP induced organogenetics callus which initiated roots. The sodium chlorite (NaCl) at the concentration of 5 g/L inhibited the growing of the vitroplants. Rooted plantlets were successfully acclimatized at a rate of 100%.

Keywords: *Ocimum canum*, *in vitro* germination, rhizogenesis, organogenesis callus, growth of vitroplants, acclimatization

Résumé

La régénération des vitroplants d'*Ocimum canum* a été effectuée par les techniques de culture *in vitro*. La germination des graines nécessite la lumière. Les plantules issues de la germination *in vitro* des graines sont utilisées pour la micropropagation.

Ces dernières sont découpés en fragments uninodaux et cultivées sur le milieu de base MS additionné de l'Acide Indole butyrique (AIB), de 6-Benzyl Amino- Purine(BAP) et du chlorure de sodium

Les résultats obtenus ont montré que le milieu de Murashige et Skoog (MS) favorise le développement normal des plantules d'*O. canum*. L'AIB favorise la rhizogenèse des plantules avec un maximum de 25 racines/vitroplant à la concentration de 3 mg/L. La BAP augmente le taux de multiplication. La combinaison de l'AIB et de la BAP a permis d'obtenir des cals organogènes qui initient des racines. Le chlorure de sodium(NaCl) à la concentration de 5g/L inhibe le développement des plantules. Le taux de réussite de l'acclimatation est de 100%.

Mots clés : *Ocimum canum*, rhizogenèse, cals organogènes, croissance des vitroplants, acclimatation

INTRODUCTION

Ocimum canum de la famille des Lamiacées, est une plante très utilisée par plusieurs tribus africaines dans le domaine médical et rituel. Au Togo, on en fait usage pour ses multiples vertus culinaires et thérapeutiques (Iwu, 1993). En effet, son décocté aqueux par voie orale sert à calmer les vomissements, les coliques, la diarrhée et la splénomégalie. Le suc de ses feuilles est instillé dans les yeux pour traiter les affections oculaires (Adjanohoun *et al.*, 1986). Certains chimiotypes de l'huile essentielle extraite de ses parties aériennes sont douées de propriétés antispasmodiques puissantes et anticatarrhales (Yayi, 1994). L'infusion de ses feuilles est recommandée dans le traitement de la tension artérielle (Walla, 1996). Le suc de ses feuilles est utilisé dans le traitement du rhume par inhalation et dans la lutte contre les eczémas par simples applications cutanées (Franchomme et Fendel, 1990). Toutefois ses huiles essentielles sont contre indiquées chez les bébés, les enfants et les femmes enceintes (Yayi, 1994).

Par ailleurs *O. canum* est exploité abusivement par les populations togolaises dans les rituels, notamment la purification des êtres humains par le lavage des mains de son infusion au retour de l'enterrement des morts et dans les cérémonies de veuvage en pays gain au Togo. On note également dans la littérature que ses feuilles fraîches ou séchées brûlées ont un effet répulsif sur les moustiques (Owusu, 2000). Cette

propriété anti-moustique est due aux substances comme le terpinéol et le linalol (Chogo et Crank, 1981). Ces deux substances ont des propriétés de pesticides (Sanda *et al.*, 1998, Akantetou *et al.*, 2011). Son huile essentielle a une activité insecticide sur les larves des moustiques (Lukwa *et al.*, 1994) et des insectes responsables des pertes de céréales en stockage (Keita *et al.*, 2000). Son huile essentielle est également acaricide ; elle est très efficace contre les différents stades de *Ripicephalus appendienlathus* (Mwangui *et al.*, 1995). De nos jours l'exploitation abusive de cette plante par les populations togolaises, et son un faible taux de germination en conditions naturelles (Tchépan, 1996), conduiront à une raréfaction et à une disparition graduelle de cette espèce si rien n'est fait pour la préserver.

L'objectif du présent travail est de régénérer les plantules par le biais de la micropropagation pour la production en masse et la préservation de l'espèce.

MATERIEL ET METHODES

A- Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé est constitué de jeunes plantules issues des semis, après germination *in vitro* sur le milieu MS, en condition aseptique. Avant la mise en germination des graines, ces dernières étaient lavées à l'eau courante, puis trempées dans la bétadine à 80% pendant 2 min suivies de trois rinçages à l'eau distillée stérile, ensuite elles sont désinfectées à l'alcool à 70% pendant 1 min et dans l'hypochlorite de sodium (NaOCl) à 80% pendant 10 min. Après donc cette dernière opération les graines ont été rincées trois fois à l'eau distillée stérile.

B- Méthodes

L'influence de la lumière sur la germination des graines a été étudiée sur deux lots de 60 (soixante) graines chacun :

- le premier lot est exposé à la lumière (16 h de lumière par jour),
- le deuxième lot de graines est exposé à l'obscurité.

Les jeunes plantules (6 semaines) issues de la germination sont découpées en plusieurs fragments uninodaux. Ces fragments sont ensuite repiqués sur le milieu MS neuf.

La croissance des plantules est souvent influencée par les régulateurs de croissance. C'est dans ce but que deux phytohormones ont été choisies afin d'étudier leurs effets sur le comportement des vitroplants.

Dans un premier temps, l'étude a été faite avec une auxine : l'AIB en (mg/L) à des concentrations suivantes : 0 ; 0,5 ; 1 ; 2 ; 3 ; 4 et 5, dans un second temps avec une cytokinine : la BAP en (mg/L) à des concentrations 0 ; 0,5 ; 1 ; 2 ; 3 ; 4 et 5 et dans un troisième temps l'effet combiné de l'AIB en (mg/L) à des concentrations 3 ; 4 et 5 et de la BAP en (mg/L) à ces

mêmes concentrations. Pour chaque concentration 10 tubes ont été reconstitués.

Pour vérifier le comportement des plantules sur le milieu MS additionné du chlorure de sodium, les jeunes plantules ont été découpées en explants uninodaux et ces derniers sont repiqués sur le milieu MS associé au NaCl à des concentrations de 0g/L ; 5g/L et 10g/L à raison de 10 tubes par concentration.

Les observations et les mesures sont effectuées chaque jour pour la germination pendant trois semaines et les paramètres suivants: nombre de racines, nombre de nœuds, nombre de feuilles, nombre de pousses et la taille sont relevés chaque semaine pendant quatre semaines. Les taux de débourrement, de survie, et d'enracinement sont évalués. Le nombre de graines germées et le nombre d'explants ayant débourré sont notés

C- Acclimatation

Cent vitroplants bien enracinés âgés de huit semaines sont retirés du milieu de culture. Leurs racines sont débarrassées de l'agar-agar à l'aide de l'eau de robinet puis les vitroplants sont plantés dans des pots d'acclimatation contenant du sable stérile arrosés d'eau de robinet.

D- Analyses statistiques

La discrimination des moyennes a été faite au test de Newman et Keuls au seuil de 5%. Les différences significatives sont relevées par une ANOVA uni variée. La probabilité $P < 0,05$ est considérée comme significative. Les valeurs affectées de la même lettre ne sont pas statistiquement différentes.

RESULTATS ET DISCUSSION

A- Initiation de la culture

La germination des graines placées à la lumière a commencé le troisième jour après la mise en germination et s'est étendue sur 4 jours. Le taux de germination est de 100% (Tableau 1).

Quant aux 60 graines placées à l'obscurité, aucune germination n'a été observée pendant 21 jours. Ces graines transférées à la lumière le 22^{ème} jour, ont commencé par germer du 23^{ème} jour au 25^{ème} jour. Toutes les graines ont germé (le taux de germination est de 100% également).

La lumière agit sur les graines de façon stricte. Les graines d'*O. canum* sont à photosensibilité positive stricte car placées seulement pendant 3 jours à la lumière, elles germent correctement ; alors que les graines placées à l'obscurité pendant 21 jours ne germent pas. Cette photosensibilité pourrait s'expliquer par la présence dans ces graines de phytochrome P660 (forme inactive qui empêche la germination à l'obscurité) qui en présence de

la lumière se transforme en phytochrome P730 (forme active) favorisant donc la germination des graines à la lumière. En effet la lumière stimule l'apparition et le développement de l'épicotyle d'*O. canum* alors qu'elle inhibe le développement de l'hypocotyle. Ces résultats confirment ceux de Najiba *et al.*, (2002) sur l'olivier et de Hovi (2007), sur *Garcinia afzelii*. Ces auteurs ont découvert respectivement que les graines de l'olivier et de *Garcinia afzelii* ne germent seulement qu'à la lumière.

Tableau 1 : Taux de germination des graines

Photopériode	Lumière (16 heures /jour)	Obscurité
Nombre de graines mises en germination	60	60
Nombre de graines germées	60	0
Taux de germination	100%	0
Temps minimum mis par les graines pour germer (jours)	3	0

Avant de procéder à la multiplication végétative *in vitro* d'une espèce végétale, il est important de vérifier le comportement des explants de cette espèce sur un milieu de culture qui servira de milieu base. Le milieu de Murashige et Skoog (1962) est le plus utilisé.

C'est ainsi que les explants issus des jeunes plantules provenant de la germination *in vitro* des graines d'*Ocimum canum* sont cultivés sur le milieu MS. Ainsi 48 explants choisis au hasard ont été cultivés. L'observation de la culture est faite durant quatre semaines.

Tableau 2. Développement morphogénétique *in vitro* des segments uninodaux d'*O. canum* sur le milieu de base MS au bout de 4 semaines.

Formations développées à partir de segments uninodaux	Milieu de Murashige et Skoog
Racines	3,59 ± 2,21
Feuilles	7,91 ± 3,42
Nœuds	3,93 ± 1,74
Pousses	1,95 ± 0,92
Longueur des tigelles (cm)	0,87 ± 0,46

On note un bon comportement des plantules sur le milieu de base ; le milieu de Murashige et Skoog (1962) (Fig1).

En effet le milieu de Murashige et Skoog (1962), est très riche en sels minéraux (NH₄⁺, NO₃⁻, Mg²⁺, K⁺). La réussite de la reprise des activités morphologiques des explants primaires mis en culture *in vitro* dépend de la composition du milieu nutritif (Nard *et al.*, 1987). Chez *Ocimum canum*, le milieu de Murashige et Skoog (1962) favorise le développement de la tige des plantules. Ces résultats confirment ceux de Etsè (2002) qui a observé un bon comportement des explants d'*Ocimum gratissimum* sur le même milieu. Ce milieu selon Dossoukpèvi *et al.*, (2012)

s'est révélé être plus performant pour le déclenchement de l'organogenèse en particulier pour la néoformation des bourgeons chez l'*Ocimum gratissimum* et l'*Ocimum basilicum*.

B- Influence des régulateurs de croissance : AIB et BAP.

Les pousses d'*O. canum* cultivées en présence de l'AIB à des concentrations 0 ; 0,5 ; 1 ; 2 ; 3 ; 4 et 5 (mg /L) montrent qu'après quatre semaines de mise en culture, on constate que d'une façon générale l'AIB favorise la production de racines par rapport au témoin. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Pitékélabou (2007) sur *Nauclea latifolia* et ceux de Aïdam *et al.*, (2008) sur *O. gratissimum*. Les racines obtenues avec l'AIB sont bien développées et grosses.

Par contre la BAP à ces mêmes concentrations inhibe la formation de racines et favorise la production de pousses (Fig2 et Fig3). Les mêmes observations ont été notées sur *Nauclea latifolia* par Pitékélabou *et al.*,(2013).

Tableau 3 Développement morphologique *in vitro* des segments uninodaux d'*O. canum* sur les milieux MS supplémenté avec l'AIB ou de la BAP.

Concentration		Racines	Feuilles	nœuds	Taille
MS +	0,0	3,8a±0,28	6,2a±0,13	3,1a±0,03	0,89a±0,06
	0,5	6,9ab±0,28	6,7a±0,13	3,3a±0,03	0,66a±0,06
	1	12,4abc±0,28	8,6a±0,13	4,3a±0,03	0,73a±0,06
	2	13,3abc±0,28	6,8a±0,13	3,4a±0,03	0,87a±0,06
	3	25c±0,28	6a±0,13	3a±0,03	0,59a±0,06
	4	18,5c±0,28	5,8a±0,13	2,9a±0,03	0,38a±0,06
MS +	0,0	9,2b±0,3	11,5a±1,8	5,8a±0,4	1,16a±0,01
	0,5	4,7a±0,3	8a±1,8	4a±0,4	0,82a±0,01
	1	3a±0,3	8,4a±1,8	4,2a±0,4	0,85a±0,01
	2	3a±0,3	10,6a±1,8	5,2a±0,4	1,01a±0,01
	3	2,8a±0,3	11,4a±1,8	5,8a±0,4	0,87a±0,01
	4	0,4a±0,3	13a±1,8	6,5a±0,4	0,88a±0,01
	5	0,3a±0,3	13,4a±1,8	6,7a±0,4	0,91a±0,01

- Valeur ± au 1/10 de l'écart type de chaque moyenne.

- a, b, c, ab,abc bc, les différences significatives à (p < 0,05). Les valeurs sont classées en groupes homogènes croissants selon le test de Newman et Keuls

Les moyennes affichées avec des lettres différentes sont significativement différentes (P< 0,05), selon le test de Newman-Keuls. La barre ± représente l'écart-type de chaque valeur.

L'effet combiné de l'AIB (auxine) et de la BAP (cytokinine) favorise la formation des cals qui initient des racines bien développées (tableau4). Cette production de racines est importante dans les milieux dont la concentration en AIB est plus élevée que celle de la BAP. Ces résultats

confirment ceux de Glato (2009) sur *Ipomea batatas*). Ce dernier a obtenu des cals organogènes initiant des racines avec des fragments foliaires en combinant l'AIB et la BAP.

En effet depuis les travaux de Skoog (1971), il est admis que l'initiation racinaire dépend du rapport des concentrations auxine/cytokinine. Cet équilibre hormonal dépend aussi des teneurs endogènes des deux phytohormones.

Les pousses obtenues sont produites dès la première semaine et sont de taille très réduites et les entre-nœuds sont très courts. Ceci peut s'expliquer par le fait que les cals qui naissent à la base des explants évoluent vers les apex ralentissant ainsi le développement des bourgeons apicaux (Tableau 4)

La variabilité de la couleur des cals est une manifestation de passage à différentes étapes physiologiques de ces cals dans l'expression de l'organogénèse. Ces résultats sont en accord avec ceux de Prakash *et al.*, (1995) sur *I. batatas*.

On note des différences significatives quant aux paramètres nombre de racines ; nombre de nœuds ; et nombre de feuilles. Cependant pas de différence significative pour les paramètres nombre de pousses et la taille des vitroplants.

Tableau 4 : Morphogénèse et croissance des explants d'*O. canum* sous l'effet combiné de l'AIB et de la BAP en mg/L après 6 semaines de culture

Paramètres étudiés	AIB: 3 BAP: 3	AIB: 3 BAP: 5	AIB: 4 BAP: 3	AIB: 4 BAP: 5	AIB: 5 BAP: 3	AIB: 5 BAP: 5
Racines	9,3a ± 0,29	00 a ± 0,00	8ab ± 0,29	1,7a ± 0,29	9,9ab ± 0,29	1,7a ± 0,29
Nombre moyen d'organes						
Feuilles	7,6abcd ± 0,23	10,3abcd ± 0,23	5ab ± 0,23	5,6ab ± 0,23	9,2abcd ± 0,23	7,8abcd ± 0,29
Nœuds	3,8abcd ± 0,5	5,2abcd ± 0,5	2,5ab ± 0,5	2,8ab ± 0,5	4,6abcd ± 0,5	4,0abcd ± 0,5
Pousses	2,6a ± 0,11	2,8a ± 0,11	2a ± 0,11	1,9a ± 0,11	2,8a ± 0,11	2,0a ± 0,11
Taille moyenne par explant	0,49a ± 0,02	0,65a ± 0,02	0,45a ± 0,03	0,46a ± 0,01	0,45a ± 0,03	0,44a ± 0,01

- Valeur ± au 1/10 de l'écart type de chaque moyenne.

- a, ab,abcd, les différences significatives à (p < 0,05). Les valeurs sont classées en groupes homogènes croissants selon le test de Newman et Keuls

C- Influence du chlorure de sodium sur les explants d'*O. canum*.**Tableau 5.** Effet du NaCl sur le comportement morphogénétique des explants d'*O. canum* après trois semaines de culture.

Milieu de culture	Paramètres étudiés				
	Nombre moyen de racines par explant	Nombre moyen de feuilles par explant	Nombre moyen de nœuds par explant	Nombre moyen de pousses par explant	Taille moyenne par explant
MS	4,5b ± 0,29	5,4a ± 0,27	2,8 ± 0,14 ns	1,7a ± 0,04	0,7b ± 0,04
MS+NaCl (5g/L)	1,2a ± 0,14	3,6a ± 0,24	1,5b ± 0,12	1a ± 0,08	0,24a ± 0,02
MS+NaCl (10g/L)	0a ± 0,00	0a ± 0,00	0a ± 0,00	0a ± 0,00	0a ± 0,00

- Valeur ± au 1/10 de l'écart type de chaque moyenne.

- a,b : les différences significatives à (p < 0,05) . Les valeurs sont classées en groupes homogènes croissants selon le test de Newman et Keuls.

Pour l'étude de l'influence du NaCl sur les explants, les résultats montrent qu'*O. canum* ne se développe pas bien sur les milieux riches en NaCl (Fig5). Le développement anormal des plantules sur les milieux MS contenant du NaCl pourrait s'expliquer par le phénomène de l'osmose. En effet les jeunes plantules sur les milieux riches en NaCl n'arrivent pas à absorber les sels minéraux indispensables pour leur développement. En effet l'absorption des sels minéraux est donc ralentie, ce qui favorise ainsi un mouvement d'eau du milieu intra cellulaire des plantules vers le milieu extra cellulaire (milieu sur lequel se développent les plantules). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Aïdam (2005) dans la culture d'*O. gratissimum* et *O. basilicum*.

Les différences des paramètres sont statistiquement significatives pour les milieux MS simple et MS associé au NaCl à 5g /L, alors que pour le milieu MS à 10 g/L, il n'y a pas de différence significative par rapport aux paramètres étudiés.

ACCLIMATATION

L'acclimatation a été réussie à un taux de 100% et les plantules montrent un bon comportement morphologique (Fig 6).

La réussite de l'acclimatation serait probablement due aux conditions de température et au substrat qui sont favorables au développement des plantules. Ces résultats sont proches de ceux obtenus par Aïdam *et al.*, (2008) qui ont obtenu un taux de réussite de 100% chez *O. gratissimum*.

CONCLUSION

Les résultats obtenus montrent que la lumière favorise la germination des graines d'*O. canum* alors que l'obscurité l'inhibe. Le milieu MS additionné ou non de phytohormones est propice à la micropropagation.

L'action du chlorure de sodium engendre des nécroses des plantules d'*O. canum*.

Les plantules s'acclimatent facilement et poursuivent une bonne croissance. La culture *in vitro* se révèle ainsi comme un moyen de production rapide d'*Ocimum canum*.



Fig 1: Vitroplant d'*O. canum* de 4 semaines cultivé sur le milieu MS (barre = 0,5 cm).



Figure 2: Vitroplant d'*O. canum* de 4 semaines sous l'effet de l'AIB (4mg/L (barre = 0,5 cm).



Fig3 : Vitroplants d'*O. canum* sur milieu MS additionné de BAP à 3mg/L (barre = 0,5cm)



Fig4 : Cal obtenu à la base d'une plantule et initiant de grosses racines sur milieu MS contenant l'AIB (3mg/L) et BAP (5mg/L) (barre = 0,5cm)



Fig5 : Vitroplant nécrosé sur le milieu MS contenant du NaCl (5mg/L) après trois semaines de culture (barre = 0,5 cm)



Fig6 : Vitroplants d'*O. canum* acclimaté

References:

- Adjanohoun , M.R. Ahyi, L. Aké Assi, K. Akpagana, P. Chibon, A. EL-HADJ, J. Eymen, M. Garba, J.N. Gassita M. Gbéassor, E. Goutote, S. Ginko, K. K. Hodouto, P. Hougnon, A. Kéita, Y. Kéoula, W. P. Klouga – Ocloo, I. Lo, K. K. Taffame (1986), Médecine traditionnelle et Pharmacopée. Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques au Togo. Paris (France): Agence de Coopération Culturelle et Technique (ACCT). 672pp.
- Aïdam A. ; Etsè K. D. ; Koba K. ; Raymond C. ; Sanda K. ; Chaumont J. P. ; Trémouillaux- Guiller J. 2008 : Capacités morphologiques *in vitro*, performance au champ et production d'huiles essentielles chez *Ocimum gratissimum* L. *Acta Bot. Gallica*, 155(3), pp 341-354.
- Aïdam A. (2005) : Etablissement des cultures organisées d'*Ocimum gratissimum* L. et d'*Ocimum basilicum* L. en vu de la production des composés d'intérêt thérapeutique. Thèse de Doctorat d'Etat. Univ. Lomé 165p.
- Akantetou P. K., Koba Koffi, Nenonene A. Y., Poutouli, C. Raynaud, Sanda K. (2011). Evaluation du potentiel insecticide de l'huile essentielle de *Ocimum canum* Sims sur *Aphis gossypii* Glover (Homoptera : Aphididae) au Togo.
- Chogo, J. B. and Crank, G. (1981). Chemical composition and biological activity of the Tanzanian plant *Ocimum suave*. *J. Nat. Prod. (Lloydia)* 44, pp. 3 08-311.
- Dossoukpèvi R.; C. Ahanhanzo; H. Adoukonou-Sagbadja ; G. Cacaï; H. Naïtchédé et C. Agbangla (2012); Contribution à l'amélioration de la production *in vitro* de deux espèces d'*Ocimum* spp (*Lamiaceae*): *Ocimum basilicum* et *Ocimum gratissimum* cultivées au Bénin.

- Evenari M. J. ; Cicero M. S. ; Silva W. R. da. (1987); Avaliação da qualidade das sementes. Piracicaba: FEALQ. 320p.
- Fun C. E. and A. Baerheim Svendsen (1990). Composition of the essential oil of *Ocimum basilicum* L. var *canum* Sims and *Ocimum gratissimum* L. grown on Aruba. *Flav. Fragr. J.*, 5 : 173-177.
- Fun C. E. and A. Baerheim Svendsen (1990). Composition of the essential oil of *Ocimum basilicum* L. var *canum* Sims and *Ocimum gratissimum* L. grown on Aruba. *Flav. Fragr. J.*, 5 : 173-177.
- Hutchinson J., Dalziel J. M., Keay R. W. J. & Hepper F. N. (1963). Flora of West Tropical Africa. Vol. II. 2ème éd. The Whitefriars Press ed., London & Tonbridge, 544p.
- Jones O. P., Hopgood M. E. & O'Farrell D. (1976): Propagation *in vitro* of fruit trees. Rep E Mailling Res Stn: 79p
- Le Nard M., Ducommun C., Weber G., Dorion N., Bigot C. (1987) : Observations sur la multiplication *in vitro* de Tulipe, *Tulipa gesneriana* L., à partir de hampes florales prélevées chez les bulbes en cours de conservation. *Agronomie*, 7 PP 321-329.
- Murashige T., Skoog F. (1962): A Review medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiologia plantarum* 15: 473-497.
- Mwangui E. N., Hassanali A., Essunam S., Myandat E., Moreka L., Kimondo M. (1995): Repellent and acaricidal properties of *Ocimum suave* against *Ripicephalus appendiculatus* ticks. *Exp.Appl. Acarol.* 19 (1): 11-18.
- Najiba, B.; Walali, L.D.M.; Abousalim, A. 2002. Etude de l'effet de type et de conservation de cytokinines sur la prolifération de l'olivier (*Olea europaea* L.). cv. Picholine marocaine. Actes des VIIIè Journées Scientifiques- AUF- Marrakech 7-9 octobre 2002, Maroc, p. 118-120.
- Owusu E. O. (2000): Effet of somme Ghanian plant Component on control of stored-product insect pests of cereals. *J. Prod Res* 37(1): 85-91.
- Pitékèlabou R. (2007) : Micropropagation et production de racines *in vitro* d'une espèce médicinale menacée de disparition au Togo : *Nauclea latifolia*. Mémoire du DEA, Université de Lomé. 96p.
- Pitékèlabou R., K. D. Etsè, A. V. Aïdam (2013) : Micropropagation et rhizogénèse *in vitro* chez *Nauclea latifolia* SMITH (Rubiaceae).
- Prakash C. S., Porobo D. A., Gosukonda R. M. Blay E., Korsi C. D., Medina-Bolivar F., 1995: Plant regeneration of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) from explants *in vitro* using a two stage protocol. *Scientia Horticulturae* 62, pp 217-224.
- Skoog F. (1971): Aspects of growth factors interactions in morphogenesis of tobacco tissue cultures. *In: Les cultures de tissus des plantes. Colloq. Int. CNRS.* 193 : 115-136.

Skoog F. (1971): Aspects of growth factors interactions in morphogenesis of tobacco tissue cultures. *In: Les cultures de tissus des plantes. Colloq. Int. CNRS.* 193 : 115-136.

Tchépan, T. (1996): *Effet de la fumure et de l'âge sur la production de biomasse et d'huile essentielle chez O.basilicum L., O. canum Sims et O. gratissimum L.* Mémoire d'Ingénieur Agronome n°96/05/PV. ESA. UB – Lomé. 74pp.

Walla B. A. (1996): *Etude exploratoire au Togo du genre ocimum et culture expérimentale de Ocimum basilicum (L) : mémoire Ingénieure Agronome P6* (1, 2, 3, 4 lignes)

Yayi, E. (1994): Contribution à l'étude des huiles essentielles de trois espèces du genre *Ocimum* : *O. basilicum*, *O. gratissimum*. Mémoire du D.E.A. UNB-57PP.