

PRODUCTION ET ACCLIMATATION DE PLANTS DU GROS BASILIC (*OCIMUM GRATISSIMUM*) REGENERES IN VITRO : EFFET DE L'ACIDE NAPHTALENE ACETIQUE (ANA) SUR L'ENRACINEMENT

Dossoukpevi R.

Département de Génétique et des Biotechnologies de la Faculté des Sciences
et Techniques de l'Université d'Abomey-Calavi , Bénin, Calavi
Centre Béninois de la Recherche Scientifique et Technique,
Bénin, Cotonou

Dangou S.J.

Ecole Polytechnique d'Abomey-Calavi , Bénin, Calavi

Cacai G.

Agbidinoukoun A.

Agbangla C.

Département de Génétique et des Biotechnologies de la Faculté des Sciences
et Techniques de l'Université d'Abomey-Calavi , Bénin, Calavi

Ahanhanzo C.

Département de Génétique et des Biotechnologies de la Faculté des Sciences
et Techniques de l'Université d'Abomey-Calavi , Bénin, Calavi
Centre Béninois de la Recherche Scientifique et Technique,
Bénin, Cotonou

Abstract

The present work aims to study the effect of Naphthalene Acetic Acid (NAA) on the rooting and acclimatization of *Ocimum gratissimum* plantlets. The cutting contain one knot (Explants) used are from the plantlets of first generation R_0 of *Ocimum gratissimum* in the stage of multiplication and aged between 4 and 6 weeks. Explants (1cm) were inoculated on half Murashige and Skoog (MS/2) supplemented with 20g/L of sucrose and 7g/L of agar with different concentrations of Naphthalene Acetic Acid NAA (0; 0.5; 1 and 2mg/L) for root induction. After eight (8) weeks of culture, the rooting rate, the number of roots formed and the length of the primary root is determined by counting of roots by plantlets and the measuring of root length is made by a ruler. The experimental design was constituted of four tests

with two repetitions. Each test includes 15 tubes represented treatments. The results showed that MS medium diluted to half and supplemented with 2mg/L NAA supports the root induction (4.70 ± 0.5) while that with 1mg/L of NAA has produced the lowest average of roots (2.70 ± 0.5). In acclimatization, 80% of rooted plants are able to survive. The conditions for successful rooting techniques *in vitro* under the effect of NAA (2mg/L) followed by the production of acclimated plants can be used for other research work on essential oils from plantlets of the specie studied.

Keywords: *Ocimum gratissimum*; *in vitro* culture; rhizogenesis; acclimatization; Naphthalene Acetic acid

Résumé

Le présent travail a porté sur l'effet de l'Acide Naphtalène Acétique (ANA) sur l'enracinement *in vitro* et l'acclimatation de *Ocimum gratissimum*. Les segments uninodaux utilisés sont issus des vitroplants de première génération R0 d'*Ocimum gratissimum* en phase de multiplication *in vitro* et âgés de 4 à 6 semaines. Les fragments uninodaux (1cm environ) sont ensemencés sur milieu de base Murashige et Skoog (MS) diminué de moitié (MS/2) complété de sucrose (20 g/L) et de l'agar (7 g/L) avec différentes concentrations d'Acide Naphtalène Acétique (0 ; 0,5 ; 1 ; 2 mg/L) pour l'induction racinaire. Après huit (8) semaines de culture, le taux d'enracinement, le nombre de racines formées et la longueur de la racine principale sont déterminés par comptage des racines par vitroplant et la mesure de la racine la plus longue est faite à l'aide d'une règle plate graduée. Le dispositif expérimental est constitué de quatre essais avec deux répétitions. Chaque essai comprenant 30 tubes représente un traitement. Les résultats ont montré que le milieu (MS) dilué de moitié et additionné de 2mg/L d'ANA est favorable à l'induction racinaire ($4,70\pm 0,5$) tandis que celui ayant 1mg/L d'ANA a produit le nombre moyen le plus faible de racines ($2,70\pm 0,5$). Dans l'étape de l'acclimatation, 80% des vitroplants enracinés ont pu survivre. Les conditions de la réussite des techniques d'enracinement *in vitro* sous l'effet de l'ANA (2mg/L) suivies de la production des plants acclimatés pourront être exploitées pour d'autres travaux de recherche sur les huiles essentielles des vitroplants de l'espèce étudiée.

Mots clés : *Ocimum gratissimum* ; culture *in vitro* ; rhizogenèse ; acclimatation ; Acide Naphtalène Acétique.

Introduction

Ocimum gratissimum fait partie des plantes aromatiques et médicinales de la famille des Lamiacées dont les utilisations sont nombreuses dans la thérapie traditionnelle et dans l'alimentation. En médecine traditionnelle africaine, *O. gratissimum* est recommandé pour traiter des affections respiratoires, céphalées et ulcères (Adjanooun et al., 1986). Les parties aériennes du basilic constituent une importante source d'huiles essentielles à activité antimicrobienne (Dubey et al., 2000 ; Chaumont et al., 2001 ; Koba, 2003), antifongique (Chaumont, 2000), antiseptique (Orafidiya et al., 2001). Cette espèce d'*Ocimum* fait objet de nombreuses utilisations (forte pression anthropique) si bien qu'à certaines périodes de l'année elle n'est plus disponible. Il existe des contraintes multiples et variées (les changements climatiques entravant la bonne productivité de cette espèce d'*Ocimum* par les méthodes traditionnelles de production : semis par graines, multiplication végétative) qui empêchent leur disponibilité tout au long de l'année. Pour pallier cela et dans une vision perspective de produire des métabolites secondaires à partir de cette plante, il est alors nécessaire de développer des stratégies de production à grande échelle qui constituent des techniques alternatives aux méthodes conventionnelles de multiplication telles que la *Culture In Vitro* (CIV).

Ainsi, les techniques de culture de tissus, lorsqu'elles sont adéquatement utilisées, peuvent conduire à la disponibilité de matériels sains de plantation. Après leur production, les vitroplants devront connaître une acclimatation en vue de leur adaptation aux conditions climatiques naturelles. Des études menées tant au Bénin qu'ailleurs ont montré l'importance de la culture *in vitro* dans la production de vitroplants (Aïdam., 2005 ; Aïdam et al., 2008 ; Ahanhanzo et al., 2008 ; Rahman et Bhadra, 2011 ;), A cet effet, des études récentes ont été réalisées sur l'organogenèse de cette espèce cultivée au Bénin par les techniques de la culture *in vitro* (Dossoukpevi et al., 2012). Cette étude a révélé une bonne aptitude pour la régénération et le développement végétatif d'*Ocimum gratissimum*. Elle constitue donc un bon présage pour la poursuite des travaux relatifs à l'enracinement et l'acclimatation des vitroplants de l'espèce. Il s'agit de doter ces vitroplants d'un système racinaire capable d'absorber l'eau et les sels minéraux. Ces racines doivent pouvoir assurer la conversion des jeunes plantules de la vie hétérotrophe (vie *in vitro*) à la vie autotrophe (vie *ex-vitro*). Sans un système racinaire vigoureux et endurci, il ne peut jamais y avoir une bonne acclimatation des vitroplants. A cet effet, Gopi et al. (2006) n'avaient jamais observé d'enracinement de tiges feuillées de basilic (*Ocimum gratissimum*) en l'absence d'auxine. Un bon enracinement est le gage d'une bonne acclimatation permettant après sevrage le transfert en milieu réel des vitroplants conformes aux plantes mères. C'est dans ce

cadre que la présente étude est envisagée et est relative à l'effet de l'ANA sur l'enracinement *in vitro* de l'espèce *Ocimum gratissimum*.

Materiel et methodes

Milieu d'étude

Les travaux de la présente étude ont été exécutés au Laboratoire Central de Biotechnologies Végétales et Amélioration des Plantes. Ce laboratoire est l'un des trois laboratoires du Département de Génétique et des Biotechnologies (DGB) de la Faculté des Sciences et Techniques de l'Université d'Abomey- Calavi (FAST / UAC). L'université est située à 16 km environ au Nord de Cotonou dans la commune d'Abomey-Calavi (2° 20' 30." 1 ; 6° 24' 56") en République du Bénin.

Matériel biologique

Ocimum gratissimum (gros basilic ou basilic salulaire), de la famille des *Lamiacées*, est une plante suffrutescente, haute de 50 cm à 1.50 m ou 2 m devenant alors arbustive. Elle est vivace à odeur forte, avec de petites fleurs blanches parfumées. C'est une Dicotylédone aromatique, pérenne, appartenant au genre *Ocimum*, qui a un tronc ligneux à la base et possède beaucoup de branches secondaires. La plante est glabre ou pubescente avec des feuilles opposées, elliptiques, cunéiformes et dentelées. L'inflorescence est terminale, arrangée en racème simple ou composé. Les fleurs sont de petite taille, sessiles, blanches, hermaphrodites et verticillées. Les fleurs, bilabiées, petites et blanches, ont la lèvre supérieure découpée en quatre lobes. Elles sont de petite taille et groupées en longs épis tubulaires, en forme de grappes allongées. Les fruits sont constitués de 4 loges sèches contenant chacune une semence et entourées par le calice. Les graines fines, oblongues, sont noires.

Méthode d'enracinement

Le taux d'enracinement est calculé à partir de la deuxième semaine marquant le début de l'émission racinaire des vitroplants des quatre milieux jusqu'à la huitième semaine où nous avons observé une stabilité de cette émission. L'enracinement des vitroplants s'est produit quasiment entre la deuxième et la huitième semaine de culture.

Formule du taux d'enracinement (%)=Nombre de vitroplants ayant émis de racines/Nombre total de tubes x 100

Induction racinaire

La richesse en sels du milieu MS réduit la rhizogenèse. Plusieurs auteurs ont alors proposé la dilution de ces sels pour un bon enracinement des espèces végétales à savoir les ligneux et les herbacées. Ainsi Aïdam et

al. (2008) ont démontré qu'un environnement minéral moins concentré facilite l'enracinement d'espèces ligneuses. Pour d'autres auteurs, un milieu appauvri en sels minéraux favorise l'allongement des racines (Favre., 1980 ; Bettaieb . et *al.*, 2008). Pour la présente étude, les segments uninodaux utilisés sont issus des vitroplants de *Ocimum gratissimum* 4 à 6 semaines d'âge ayant subi la prolifération *in vitro*. Les vitroplants ont été morcelés en de fragments uninodaux (1cm environ) et transférés sur milieu de base Murashige et Skoog (MS) (1962) dilué de moitié auquel on a ajouté différentes concentrations d'ANA (0 ; 0,5 ; 1,0 et 2mg/L). Ce milieu MS/2 est additionné de sucrose (20 g/L) et de l'agar (7,0 g/L). La mise en culture a été réalisée dans les conditions de température ($27^{\circ}\text{C} \pm 1$), d'humidité (80%) et d'éclairement (5000 lux pendant 12 heures). Après huit (8) semaines de culture, le pourcentage de racines formées, le nombre de racines par vitroplant et la longueur de la racine principale sont déterminés par un comptage des racines par vitroplant et la mesure, à l'aide d'une règle plate graduée en centimètre (cm), à partir du collet de la tige jusqu'à l'extrémité inférieure de la racine.

Phase d'acclimatation

Les vitroplants bien enracinés sont enlevés avec délicatesse des tubes au risque de casser les racines ; puis par l'élimination de la gélose de la base des vitroplants par un lavage à l'eau distillée. Ils sont ensuite trempés dans de l'eau distillée contenant un fongicide (agriette à 1g/L) pour protéger leur système racinaire contre d'éventuelles infections fongiques. Après ce traitement, les vitroplants sont rincés à nouveau avec de l'eau distillée avant d'être transférés dans des pots en plastiques remplis de substrats nivelés et perforés à la base. Le substrat utilisé pour l'ensemble des vitroplants est constitué de tourbe en boulettes provenant du Laboratoire Central de Biotechnologies Végétales et Amélioration des Plantes. Ce substrat est préalablement stérilisé à l'étuve (BINDER) à 200°C pendant 2h. cette stérilisation thermique est renforcée par une désinfection chimique avec du carbodan (carbofuran) à une dose de 4‰ (g :g). Les pots repotés sont déposés dans un bac d'acclimatation où les parties aériennes des vitroplants sont abritées par un cache en plastique transparent de manière à les maintenir dans un environnement qui avoisine 100% d'humidité relative. Le bac d'acclimatation contenant les vitroplants et couvert d'une toile cirée blanche transparente est ouvert graduellement (Alderson et Mekinless, 1988). Ils sont installés dans une chambre de culture avec une température de $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$ et une photopériode de 12h de lumière et 12h d'obscurité et y ont séjourné au plus deux semaines avant d'être transférés dans une serre. Les pots ont été arrosés avec la solution de Shives. Les vitroplants du bac d'acclimatation ouvert ont été transférés dans des sachets en polyéthylène remplis de terreau

stérilisé. Ces sachets sont déposés à même le sol dans la serre. Après six semaines, les observations ont porté sur le taux de vitroplants ayant survécu après leur transfert aux conditions *ex-vitro*.

Le dispositif expérimental : C'est un bloc complètement aléatoire constitué de quatre essais à deux répétitions chacun. Quatre milieux de culture ont été utilisés dont chaque milieu correspond à un essai. Pour chaque essai, 30 tubes ont été utilisés.

Analyses statistiques

Les résultats ont été traités par analyse de la variance (ANOVA) et les moyennes significativement différentes ont été séparées par le test de Tukey au seuil de 5 %. Par ailleurs, la variable « longueur de racine » a subi une transformation logarithmique pour assurer la normalité et l'homogénéité des variances nécessaires pour l'application de l'analyse de la variance. La formule logarithmique est : $\ln x$ avec x =longueur de racine par vitroplant.

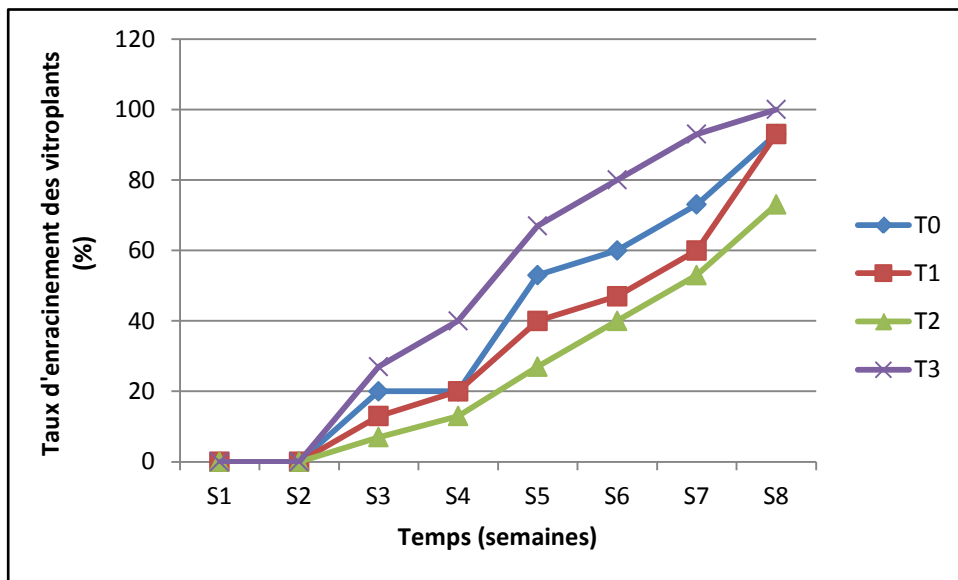
Des classes de variation sont également constituées en utilisant une échelle proposée par Ouédraogo (1995): (1) variation faible (CV= 0-10 %); (2) variation moyenne (CV= 10-15 %); (3) variation assez importante (CV= 15-44 %); et (4) variation importante (CV > 44 %). Les analyses statistiques des résultats ont été effectuées avec le logiciel STATISTICA version 6.31.

Résultats

Effet des différentes concentrations d'ANA sur le taux d'enracinement

Deux semaines après le repiquage des fragments uninodaux issus des vitroplants sur les différents milieux d'enracinement, il a été observé l'émission racinaire au niveau de certains tubes des quatre traitements. Entre la 6^{ième} et la 8^{ième} semaine, le taux d'enracinement s'est accru d'environ 40% pour l'ensemble des quatre traitements (Fig.1). Cette figure nous révèle que le nombre le plus élevé de racines ($4,70 \pm 0,5$) est issu du traitement T3 (2 mg/L d'ANA) avec un taux d'enracinement de 100% en huit semaines ; tandis que celui ayant le nombre le plus faible ($2,40 \pm 0,5$) est T2 (1 mg/L d'ANA) avec un taux d'enracinement de 73%. Pour ce qui concerne les traitements T0 (0 mg/L d'ANA) et T1 (0,5 mg/L d'ANA), la figure 1 révèle que chacun d'eux a un taux d'enracinement de 93%. Au regard des résultats ci-dessus, nous pouvons dire qu'il existe une corrélation entre le temps d'enracinement et les différentes concentrations d'ANA utilisées.

Figure 1 : Taux d'enracinement des vitroplants en fonction du temps



T₀ = 0 mg/L ; T₁ = 0,5 mg/L ; T₂ = 1 mg/L ; T₃ = 2 mg/L S (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 et 8)= Semaines (1,2, 3, 4, 5, 6, 7 et 8)

Effet des différentes concentrations d'ANA sur le nombre et la longueur des racines

Après huit (8) semaines de culture *in vitro*, les résultats montrent qu'il existe une différence significative au seuil de 5% d'une concentration d'ANA à une autre pour le nombre de racines et la longueur de racines (tableau1). Par rapport au nombre de racines, le nombre moyen le plus faible de racines ($2,40 \pm 0,5$) est obtenu sur le milieu contenant 1 mg/L d'ANA tandis que celui le plus élevé ($4,70 \pm 0,5$) est produit par le milieu ayant 2 mg/L d'ANA. En ce qui concerne la longueur de la racine principale, la longueur moyenne la plus faible ($1,97 \text{cm} \pm 0,15$) est issue du milieu témoin (0 mg/L d'ANA) alors que celle la plus élevée ($2,93 \text{cm} \pm 0,15$) est donnée par le milieu contenant 1mg/L d'ANA (tableau 1).

Par ailleurs, le tableau1 montre un fort coefficient de variation (> 44 %) pour le nombre de racines (47%) et une variation assez importante ($15 < CV\% < 44$) pour la longueur de racine (24%). Ce qui indique une dispersion plus large du nombre de racines par rapport à sa moyenne qu'en ce qui concerne la longueur de racine par rapport à sa moyenne. Globalement la différence est hautement significative ($p \leq 0,006$) pour le nombre de racines alors qu'elle est très hautement significative ($p \leq 0,000$) pour la longueur de racine.

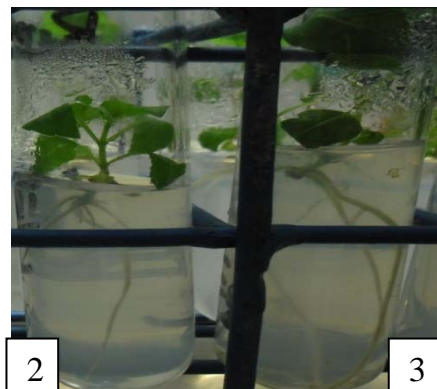
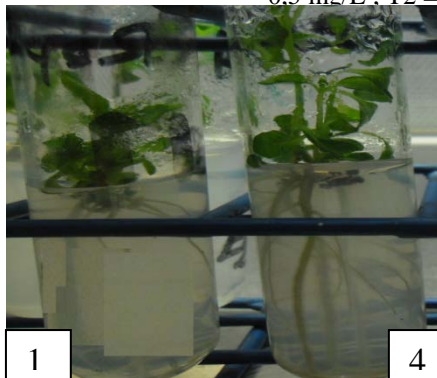
Le milieu de culture avec auxine (ANA) combiné avec la durée a une influence significative sur le nombre de racines. L'évaluation de l'effet

du milieu de culture sur l'apparition des racines a révélé une différence hautement significative ($p < 0,006$) du nombre de racines entre les quatre milieux testés. Il ressort clairement que la rhizogenèse est un phénomène qui est fonction de la composition du milieu de culture. Ce qui indique que la composition du milieu de culture est le facteur principal qui influence le développement racinaire des espèces végétales cultivées *in vitro*.

Tableau 1: Effet des différentes concentrations d'ANA sur le nombre et la longueur des racines des vitroplants de *Ocimum gratissimum*

Concentrations d'ANA	Nombre de racines	Longueur racine (cm)
T0	4,60 ± 0,5a	1,97 ± 0,15c
T1	3,40 ± 0,5ab	2,30 ± 0,15bc
T2	2,40 ± 0,5b	2,93 ± 0,15ab
T3	4,70 ± 0,5a	2,70 ± 0,15a
Moy	3,76 ± 0,28	2,48 ± 0,09
CV%	47	24
P	0,006**	0,000***

Les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas statistiquement différentes au seuil de 5%; **: Différence significative au seuil de 1%; ***: Différence significative au seuil de 0,1% ; Moy = moyenne ; CV% = coefficient de variation ; P = probabilité. T0=0 mg/L ; T1 = 0,5 mg/L ; T2 = 1 mg/L ; T3 = 2 mg/L.



Légende

- 1 = 0mg/L d'ANA
- 2 = 0,5mg/L d'ANA
- 3 = 1mg/L d'ANA
- 4 = 2mg/L d'ANA

Figure 2 : Enracinement des vitroplants d' *Ocimum gratissimum* sur milieux comportant différentes concentrations d'ANA dont le milieu de base est MS dilué de moitié.

Acclimatation

La figure 3 a révélé que pendant les quatre premières semaines d'acclimatation tous les vitroplants au nombre de trente (30) par essai ont survécu (100% de survie). Ce taux a connu une baisse sur les deux dernières semaines et se retrouve respectivement à 87% à la cinquième semaine et à 80% à la sixième semaine S6.

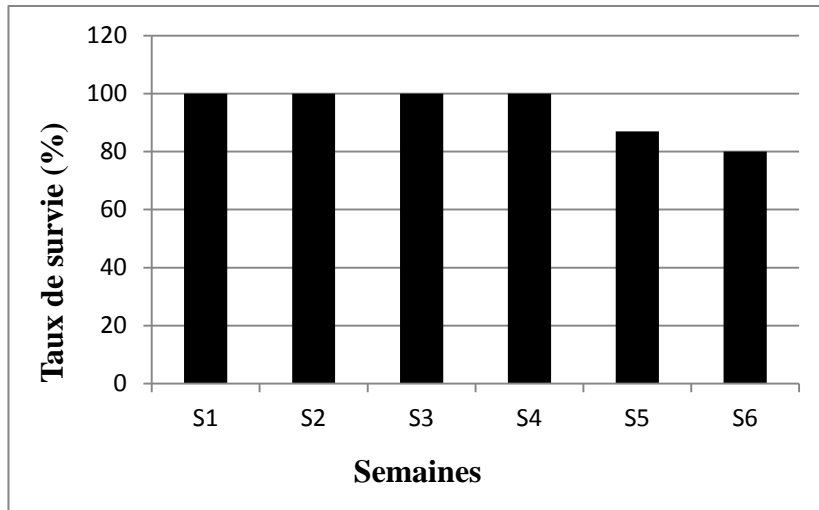


Figure 3 : Taux de survie des vitroplants du traitement (T) après six semaines d'acclimatation.

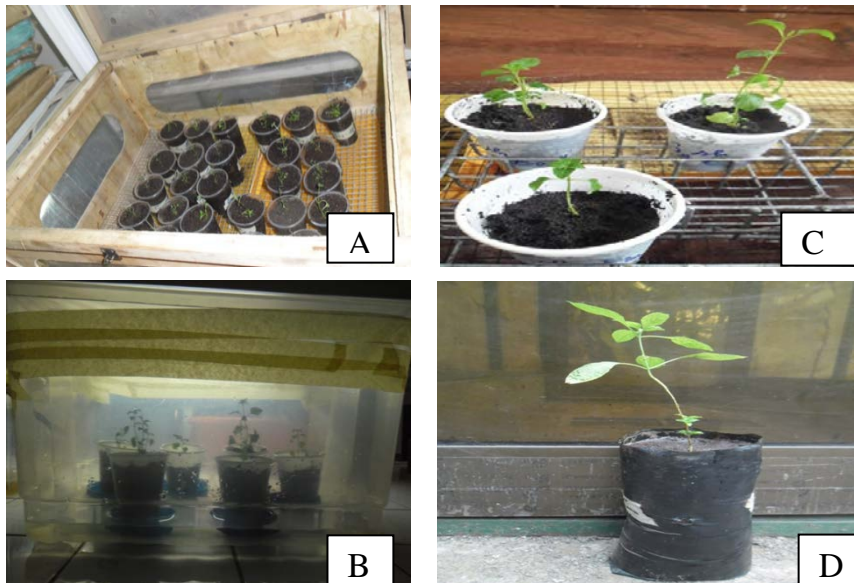


Figure 4 : Photos montrant le processus d'acclimatation des vitroplants d'*Ocimum gratissimum* ; A : Vitroplants mis sur pots en plastiques et disposés dans un bac d'acclimatation ; B : Bac d'acclimatation couvert de plastique transparent ; C : Ouverture totale par perforation progressive du bac d'acclimatation après quatre semaines de culture ; D : Dépôt à même le sol dans la serre du vitroplant acclimaté dans un sachet noir en polyéthylène rempli de terreau.

Discussion

Avant l'étape d'enracinement, les deux premières étapes à savoir l'initiation *in vitro* a été déjà réalisée sur *Ocimum basilicum* et *Ocimum gratissimum* au Laboratoire Central des Biotechnologies Végétales et Amélioration des Plantes (Dossoukpevi et al., 2012). Cette étape de multiplication *in vitro* est incontournable pour l'obtention des explants à mettre sur milieu d'enracinement.

L'enracinement constitue une étape importante de la micropropagation *in vitro* qui prépare les plantules au sevrage, car les plantules sans racines ou ayant peu de racines sont rapidement sujettes à la dessiccation. L'optimisation de bonnes conditions d'enracinement est fondamentale pour la suite du travail, car la formation d'un système racinaire développé pourrait lever toute ambiguïté quant à la reprise des vitroplants en serre. Le taux d'enracinement, le nombre et la longueur des racines varient significativement par rapport aux concentrations d'auxine utilisées. La richesse en sels du milieu MS réduit la rhizogenèse. Plusieurs auteurs ont proposé alors la dilution de ces sels pour un bon enracinement des espèces ligneuses ou non.. Aïdam et al. (2008) ont révélé qu'un environnement minéral moins concentré facilite l'enracinement d'espèces ligneuses. Aussi, selon Kulchetscki et al. (1995), une faible concentration ionique du milieu de base stimule mieux la formation des racines. Sanyal et al. (2005) ont rapporté que le taux d'induction racinaire très élevé est obtenu des vitroplants ensemencés sur milieu MS dilué avec réduction de la concentration en sucrose.

Les résultats obtenus de l'étude que nous avons réalisée sur *Ocimum gratissimum* ont montré que la prolifération des racines et leur développement sont très prononcés sur les milieux T3 (4,70±0,5) et T0 (4,60±0,5). L'ANA (T3= 2mg/l) favorise la formation d'un plus grand nombre de racines tandis que le milieu témoin sans régulateur de croissance (T0 = 0mg/L d'ANA) l'est également. Mais il aurait eu une différence entre le durcissement des racines sur les deux milieux. Il est observé que le développement racinaire est faible quand les concentrations d'ANA sont inférieures à 1mg/L. Ce qui indique que les racines issues du milieu contenant 2mg/L d'ANA seraient plus endurcies que celles du milieu ayant 0mg/L d'ANA et permettraient une bonne acclimatation. Contrairement à notre témoin, Gopi et al. (2006) n'observaient jamais d'enracinement de tiges feuillées de basilic en l'absence d'auxine. Des résultats similaires ont été observés sur *Tylophora asthmatica* avec 2 mg/L d'ANA par Mukundan et al. (2002).

La racine la plus longue est obtenue sur le milieu 1 mg/L d'ANA qui a produit le nombre moyen de racines le plus faible (2,40±0,5). Jabeen et al. (2005) ont observé que l'ANA est l'auxine qui donne le meilleur taux

d'enracinement chez *Solanum nigrum*. D'autres auteurs ont prouvé que l'ANA permet un meilleur enracinement des vitroplants chez bon nombre d'espèces végétales (Gyana Ranjan Rout, 2004; Mohammad et al., 2003; Kambaska et Santilata, 2009; Andrew et Siva, 2004). Il est à noter que l'auxine est connue pour ses propriétés de stimulation de la rhizogenèse. Mais parmi les auxines, l'Acide Indole Butirique (AIB) est connu pour sa stimulation plus efficace à l'enracinement des espèces en raison de sa faible toxicité et sa plus grande stabilité sur l'induction racinaire (Han et al., 2009). Liu et al., (2002) ont décrit que l'AIB est physiologiquement une auxine plus active que l'ANA et l'Acide Indole Acétique (AIA) en favorisant le déclenchement des racines car il agit en tant que précurseur pour l'AIA endogène. Ainsi, l'AIB a donné les bons résultats en nombre de racines parce qu'il est très efficace d'une part dans l'accroissement du contenu endogène d'auxine (AIA) et d'autre part montre une stabilité plus élevée contre le catabolisme et l'inactivation des inhibiteurs de croissance (Georges et al., 2008). L'ajout de l'auxine seule ou en association (ANA et/ou AIB) pour l'enracinement des vitroplants a été rapporté sur beaucoup d'espèces végétales ((Gopi et al. 2006; Baksha et al., 2007; Kalidass et al., 2008; Kalidass et Mohan, 2009). A l'instar de l'ANA qui a favorisé l'enracinement de *Ocimum gratissimum* révélé par la présente étude, l'addition de l'AIB au milieu MS a permis l'enracinement d'autres plantes médicinales comme *P. kurroo* (Chandra et al., 2006), *S. cordifolia* (Sivanesan et Jeong, 2007a), *P. indicum* (Sivanesan et Jeong, 2007b), et *W. somnifera* (Sivanesan, 2007). Cependant, l'auxine peut avoir un effet inverse lorsqu'elle est additionnée à forte dose et peut même conduire à la létalité des vitroplants (Bettaieb et al., 2008).

Au cours de l'acclimatation, on observe un bon développement des plantules. Elles présentent une bonne adaptation lorsque les conditions de nutrition et d'environnement sont optimales. En dehors des paramètres de température et d'humidité qui doivent être rigoureusement contrôlés lors de l'acclimatation, la réussite dépend de certains facteurs comme l'âge, la nature du substrat et les conditions tropicales (Trichine, 1998 ; Ben-Abdallah et al., 2002). Dans le cas d'*Ocimum gratissimum*, Aïdam (2005) a observé chez les plantules âgées de huit semaines, transférées sur le compost et la vermiculite un bon comportement morphogénétique au cours de l'acclimatation lorsque les conditions de l'environnement sont optimales. Le pourcentage de réussite est de 100% quelle que soit la nature du substrat. Des pourcentages plus faibles ont été enregistrés chez des espèces fruitières comme *Irvingia gabonensis* (Ndonou et al., 2004) et *Rinodendron heudoletti* (Fotso et al., 2004). Nos résultats confirment ceux de ces auteurs car étant de 80% donc inférieurs à 100% trouvés par Aïdam en 2005. En effet, le compost, en plus de sa capacité de rétention d'eau est assez riche en

constituants minéraux. Au cours de l'acclimatation, les plantules doivent être endurcies (Trichine, 1998), en perdant une partie de leur eau contenue dans les tissus pour acquérir une lignification conduisant à davantage de rigidité. Ce phénomène intervient plus rapidement chez les plantules relativement âgées, peu sujettes aux stress, que chez les plus jeunes plantules. Celles-ci s'adaptent très tôt aux nouvelles conditions de l'environnement à savoir les variations thermiques et d'humidité.

Après leur transfert dans la tourbe, l'unique substrat utilisé, les vitroplants d'*Ocimum gratissimum* âgés de huit semaines ont montré un bon comportement morphogénétique et poursuivent leur croissance sous serre en bac de sevrage. Ces conditions optimales d'acclimatation ont abouti à un pourcentage de réussite égal à 80%. Des pourcentages plus faibles ont souvent été observés, notamment chez *Irvingia gabonensis* Baill. (Ndomou et al., 2004) et *Ricinodendron heudoletii* Baill. (Oumar et al., 2004).

Au regard de tout ce qui précède, pour d'autres expérimentations sur l'acclimatation des espèces d'*Ocimum*, il serait souhaitable d'utiliser plusieurs substrats en combinaison ou seuls afin d'optimiser leur taux. à 100%.

Conclusion

L'enracinement des vitroplants est obtenu après un séjour de quatre semaines au moins sur les quatre milieux retenus ayant pour base le milieu MS dilué de moitié. C'est le milieu contenant 2mg/L d'ANA qui a produit le nombre le plus élevé de racines ($4,70 \pm 0,50$). Le stress climatique constitue une contrainte à la réussite de l'acclimatation des vitroplants. En effet, dans le milieu naturel, l'humidité relative est très faible, la température est variable, la luminosité est très forte et l'atmosphère est contaminée. En définitif, ces facteurs doivent être rigoureusement contrôlés lors de l'acclimatation. Ainsi, l'acclimatation des vitroplants d'*Ocimum gratissimum* réalisée sur la tourbe ne pose pas de problèmes particuliers puisque la survie des vitroplants a été générale et la croissance a été uniforme quel que soit le milieu d'enracinement d'où ils proviennent. Cette voie de micropropagation d'*Ocimum gratissimum* permettant une obtention massive de vitroplants pourrait être exploitée d'une part dans la production à grande échelle de plantes uniformes et d'autre part pour l'extraction d'huiles essentielles. L'optimisation du taux d'acclimatation devrait être envisagée pour les protocoles futurs à travers l'utilisation de plusieurs substrats.

References:

Adjanohoun E., M.R.A. Ahyi Aké Assi., L.K. Akpagana, P. Chibon, A. El-Had., I. Eymen, E. Goutote, S. Ginko, K.K. Hodouto, P. Hougnon, A. Keita, Y. Kéoula, W.P. Klouga-Ocloo, I. Lo, K. Siamevi, K.K. Taffame, M. Garba,

- J.N. Gassita & M. Gbeassor, 1986. - Médecine traditionnelle et pharmacopée : contribution aux études ethnobotaniques et floristiques du Togo . ACCT, Paris, 671 p.
- Ahanhanzo C., Agbangla C., Dangou J., Toukourou F., Dansi A., Montcho D.. 2008 : Influence du chlorure mercurique et de la cytokinine sur la survie et la morphogenèse *in vitro* d'explants de différents génotypes d'igname (*Dioscorea Spp*). Annales des sciences Agronomiques du Bénin 11 (1) 33-47.
- 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. V., 2005 : Etablissement de 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 158 pages.
- Alderson, P. G. et McKiniess, J. 1988. Rooting of cultured -rose shoots. Acta Horticulturae 226: 175-178.s
- Andrew et Siva , 2004 Genotypic variation in the micropropagation of Sri Lankan *Exacum* hybrids. Journal of the American Society for Horticultural Science. 129(5): 698-703.
- Baksha, R., Miskat Ara Akhter Jahan., Rahima Khatun and John Liton Munshi. 2007. In vitro Rapid Clonal Propagation of *Rauvolfia serpentina* (Linn.) Benth Bangladesh J. Sci. Ind. Res. 42(1): 37-44.
- Ben Abdallah F., Zemmi H., Fnayou A., Ghorbel A. 2002: Comportement de plants de vigne issus de microgreffage d'apex. Cahiers Agricultures 11(5) : 349-54.
- Bettaieb T., M. Mhamdi et I. Hajlaoui. 2008: Micropropagation of *Nolina recurvata* Hemsl.: β -Cyclodextrin effects on rooting. Scientia Horticulturae, 117 366–368.
- Chandra, B., Palni, L.M.S, Nandi, S.K. 2006 : Propagation and conservation of *Picrorhiza kurrooa* Royle ex Benth.: an endangered Himalayan medicinal herb of high commercial value. Biodivers. Conserv. 15: 2325-2338.
- Chaumont J.P., D. Mandin, K. Sanda, K. Koba & C.A. de Souza, 2001.- Activités antimicrobiennes de cinq huiles essentielles de Lamiacées togolaises vis-à-vis de germes représentatifs de la microflore cutanée. Acta. Bot. Gallica , 148 (2), 93-101.
- Chaumont J.P.. 2000.- Antifungal properties of *Ocimum gratissimum* essential oil (ethyl cinnamate chemotype). Fitoterapia , 71 , 567-569
- 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. Int. J. Biol. Chem. Sci. 6(6): 4046-4057. .
- Dubey N. K., Tiwari T. N., Mandin D., Andriamboayonjy H., Chaumont J-P. 2000: Antifungal properties of *Ocimum gratissimum* essential oil (ethyl cinnamate chemotype). Fitoterapia 71 : 567-569.
- Favre J. M.. 1980. Rhizogenèse et bouturage. In: La multiplication végétative des plantes supérieures. Ed. Chaussat R., Bigot C., Gauthier-Villars, Bordas, Paris. 1980/ 51-75.
- Fotso A., Tchinda N.D., Duclaire M. & Ndoumou D.O., 2004. Propagation de *Ricinodendron heudelotii* par bouturage in vitro. Fruits, 10, 351-358.
- George EF, Hall MA, Deklerk GJ. 2008. Plant propagation by tissue culture. Springer, 1: 206-217.
- Gopi, C., Nataraja Sekhar, Y and Ponmurugan, P. 2006. In vitro multiplication of *Ocimum gratissimum* L. through direct regeneration. African Journal of Biotechnology . 5 (9), pp. 723726
- Gyana Ranjan, R. 2004. Effect of cytokinins and auxins on micropropagation of *Clitoria ternatea* L. Biol. Lett. 41(1): 21.26.
- Han H, Zhang S, Sun X. 2009. A review on the molecular mechanism of plant rooting modulated by auxin. Afr. J. Biotechnol. 8: 348-353.
- Jabeen, F.T.Z., Venugopal, R.B., Kiran, G., Kaviraj, C.P. and Rao, S. 2005. Plant regeneration and *in vitro* flowering from leaf and nodal explants of *Solanum nigrum* (L). - An important medicinal plant. Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology. 6(1&2): 17-22
- Kalidass, C and Mohan, V.R. 2009. In vitro rapid clonal propagation of *Phyllanthus urinaria* Linn. (Euphorbiaceae)- A medicinal plant. Researcher 1(4): 56-61.
- Kalidass, C. Manickam, V.S and Glory, M. 2008. In vitro studies on *Leptadenia reticulata* (Retz.) Wight & Arn. (Asclepiadaceae). Indian Journal of Multidisciplinary Research, 4(2): 221 – 225.
- Kambaska, B. H. and Santilata, S. 2009. Rapid in vitro micropropagation of sugarcane (*Saccharum officinarum* L. cv-Nayana) through callus culture. Nature and Science. 7(4): 1-10.
- Koba K., 2003.- Activités antimicrobiennes des huiles essentielles de quatre Lamiacées de la flore togolaise sur des germes de la microflore cutanée : application à la formulation d'émulsions à usage topique. Thèse de doctorat, Université de Lomé, 174 p.
- Kulchetscki L., Harry I.S., Yeung E.C., Thorpe T.A. 1995. : *In vitro* regeneration of Pacific silver fir (*Abies amabilis*) plantlets and histological analysis of shoot formation. Tree Physiology, 15: 727–738.
- Liu J, Harris A, Kanwisher N. Stages of processing in face perception 2002. : An MEG study. Nature Neuroscience ;5:910–916.

- Mohammad A., Faisal M. and Singh S.K. 2003.: Micropropagation of mulberry (*Morus alba* L.) through in vitro culture of shoot tip and nodal explants. *Plant Tissue Cult* 13:47-51.
- Mukundan Usha, Latha Sivaram and Anil Kumar 2002. : Micropropagation of *Tylophora asthmatica* and *Uararia picta*. *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology*. 3(1&2): 73-76.
- Murashige, T and Skoog, F. 1962: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*. 15: 443- 477.
- Ndoumou D. O., Oumar F., Mbouna D. 2004: Propagation d'*Irvingia gabonensis* par microbouturage *in vitro*. *Fruits* 59 : 31-38.
- Orafidiya L. O., Oyedele A. O., Shittu A. O., Elujoba A. A., 2001: The formulation of an effective topical product containing *Ocimum gratissimum* leaf essential oil. *International Journal of Pharmaceutics*. 224: 177-183.
- Ouédraogo, A. S. 1995 : *Parkia biglobosa* (Fabaceae) en Afrique de l'Ouest. Biosystématique et amélioration. Thèse. Univ. agron. Wagening. Inst. For. Nat. Res. IBN-DLO. Netherlands. 205 p.
- Oumar F, Donfagsiteli T. N., Mbouna D., Ndoumou D. O. 2004 : Propagation de *Ricinodendron heudelotii* par bouturage *in vitro*. *Fruits* 59 : 351-358.
- Rahman M. M. and Bhadra S. K. 2011. Development of protocol for in vitro culture and rapid propagation of *Wedelia chinensis* (Osbeck) Merr. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(11): 2387-2392.
- Sanyal I, Singh AK, Kaushik M, Amla DV (2005). Agrobacterium mediated transformation of chickpea (*Cicer arietinum* L.) with *Bacillus thuringiensis* cry1Ac gene for resistance against pod borer insect *Helicoverpa armigera*. *Plant Sci*. 168: 1135-1146.
- Sivanesan I, Jeong BR. 2007b: Micropropagation and in vitro flowering in *Pentanema indicum* Ling. *Plant Biotechnol*. 24: 527-532.
- Sivanesan, I and Jeong, B.R. 2007a: Direct shoot regeneration from nodal explants of *Sida cordifolia* Linn. *In Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant* 43: 436-441.
- Sivanesan, I. 2007: Direct regeneration from apical bud explants of *Withania somnifera* Dunal. *Indian J. Biotechnol*. 16: 125-127.
- Trichine A. 1998 : Etude des contraintes d'acclimatation et de transfert en sol des plants de palmier dattier issus de la culture *in vitro*. Rapport de stage : Centre Régional du Houze Pré-Sahara. INRA Maroc. 11p.