

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° 2

Technique d'acclimatation des vitro plants de *Ocimum basilicum* et de *Ocimum gratissimum* cultivés au Bénin

Dr. Ir. Coovi René DOSSOUKPEVI

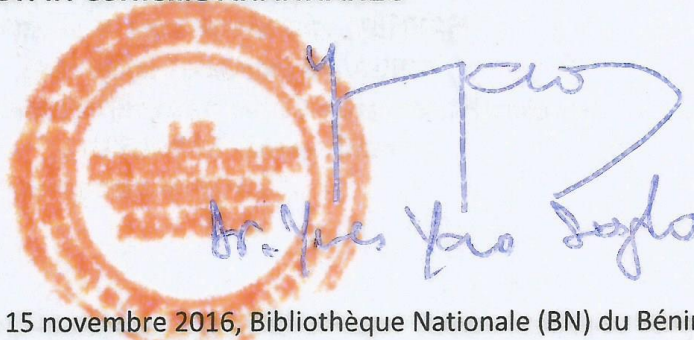
Dr. Ir. Moussibaou DJABOUTOU

Dr. Codjo Clément GNIMADI

Dr. Gilles CACAÏ

Pr. Dr. Ir. Guy Apollinaire MENSAH

Pr. Dr. Ir. Corneille AHANHANZO



Dépôt légal n° 9035 du 15 novembre 2016, Bibliothèque Nationale (BN) du Bénin,
4ème trimestre 2016, ISBN : 978-99919-2-601-8

Novembre 2016

SOMMAIRE

PREFACE

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 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 Eléonore YAYI, 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 *Ocimum basilicum* et *Ocimum gratissimum* font objet de nombreuses utilisations (forte pression anthropique) si bien qu'à certaines périodes de l'année elles ne sont plus disponibles. Pour pallier cela et dans une vision perspective de produire des métabolites secondaires (huiles essentielles) 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, lors de leur production *in vitro*, les vitroplants devront connaître une bonne acclimatation en vue de leur adaptation aux conditions climatiques naturelles. 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 de *Ocimum gratissimum*. Elle constitue donc un bon présage pour la poursuite des travaux relatifs à l'enracinement et à 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. 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 au sevrage et au transfert en milieu réel des vitroplants de *Ocimum basilicum* et de *Ocimum gratissimum*.

1. METHODOLOGIE

1.1 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 il a été 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 (%) = $\frac{\text{Nbre de vitroplants ayant émis de racines}}{\text{Nbre total de tubes}} \times 100$.

1.2 Induction racinaire

La richesse en sels du milieu MS réduit la rhizogénèse. Plusieurs auteurs ont alors proposé la dilution de ces sels pour un bon enracinement des espèces végétales à savoir les ligneux et les herbacées. Pour la présente fiche technique, les segments uninodaux utilisés sont issus des vitroplants de *Ocimum gratissimum* et de *Ocimum basilicum* de 4 à 6 semaines d'âge ayant subi la prolifération *in vitro* (Dossoukpevi *et al.*, 2012). 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 il est ajouté quatre 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 ($27^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}$), d'humidité (80%) et d'éclairement (6000 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 est faite, 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.

1.3 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 4g par pot rempli du substrat (dossoukpevi, 2008). 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°C \pm 2° 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*.

2. RESULTATS

2.1 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 (milieux c'est-à-dire les quatre concentrations d'ANA). Entre la 6^{ème} et la 8^{ème} semaine, le taux d'enracinement s'est accru d'environ 40% pour l'ensemble des quatre traitements (Fig.1). Cette figure 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, on peut conclure qu'il existe une corrélation entre le temps d'enracinement et les différentes concentrations d'ANA utilisées.

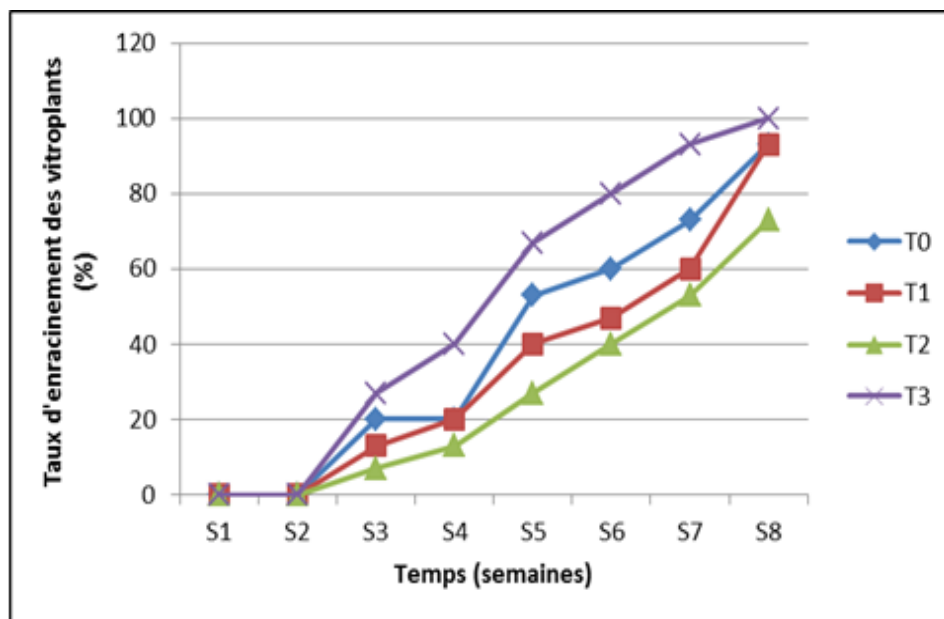


Figure n°1 : Taux d'enracinement des vitroplants en fonction du temps

T0 = 0 mg/L ; T1 = 0,5 mg/L ; T2 = 1 mg/L ; T3 = 2 mg/L

2.2 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 0 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 2 mg/L d'ANA (Tableau 1). Par ailleurs, le tableau 1 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. Par conséquent, la composition du milieu de culture est le facteur principal qui influence le développement racinaire des espèces végétales cultivées *in vitro*.

Tableau n° 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	2,40 ± 0,5a	1,97± 0,15c
T1	2,60 ± 0,5ab	2,30± 0,15bc
T2	3,40 ± 0,5b	2,70± 0,15ab
T3	4,70 ± 0,5a	2,93± 0,15a
Moy	3,76± 0,28	2,48± 0,09
CV%	47	24
P	0,006**	0,000***

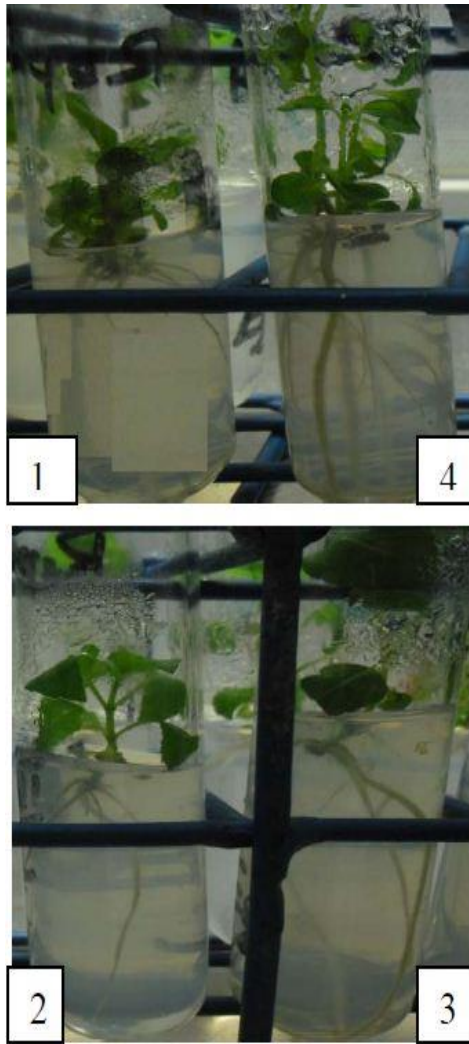


Figure n°2 : Enracinement des vitroplants de *Ocimum gratissimum* sur milieux comportant différentes concentrations d'ANA dont le milieu de base est MS dilué de moitié.

Légende

1 = 0 mg/l d'ANA

2 = 0,5 mg/l d'ANA

3 = 1 mg/l d'ANA

4 = 2 mg/l d'ANA

Les résultats obtenus de l'étude réalisée sur *Ocimum gratissimum* ont montré que la prolifération des racines et leur développement sont très prononcés sur les milieux T3 ($4,70 \pm 0,5$) et T0 ($2,40 \pm 0,5$). L'ANA (T3= 2mg/l) favorise la formation d'un plus grand nombre de racines. 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 permet une bonne acclimatation.

2.3 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.

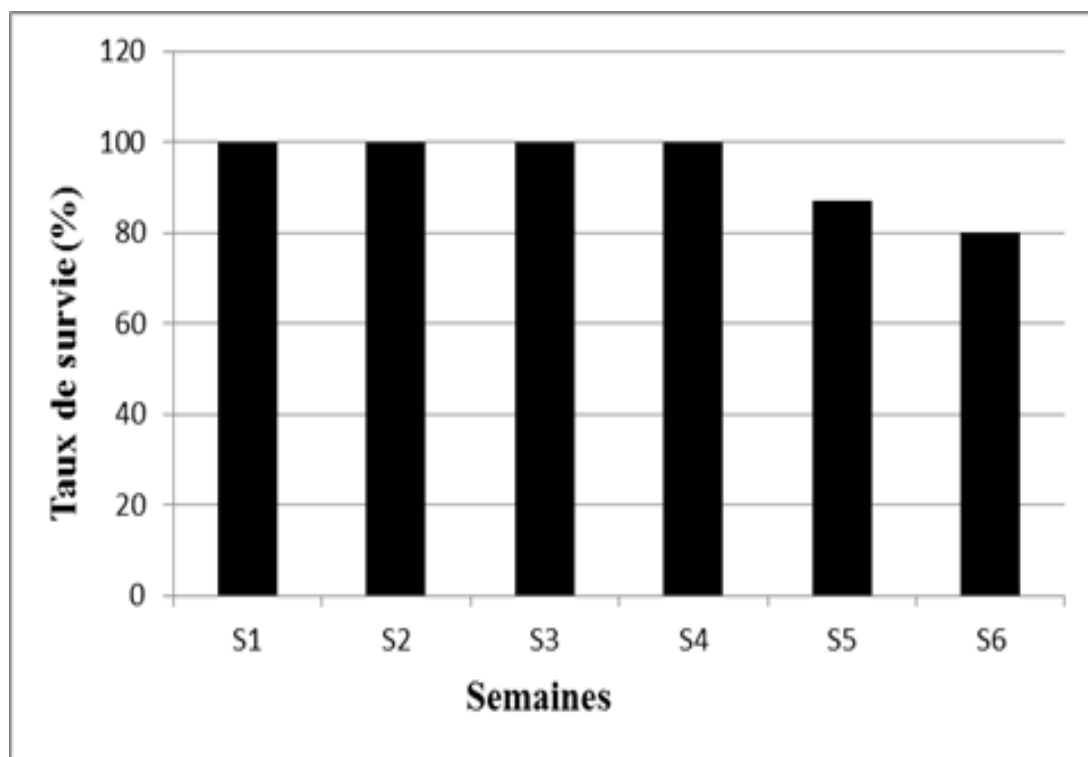
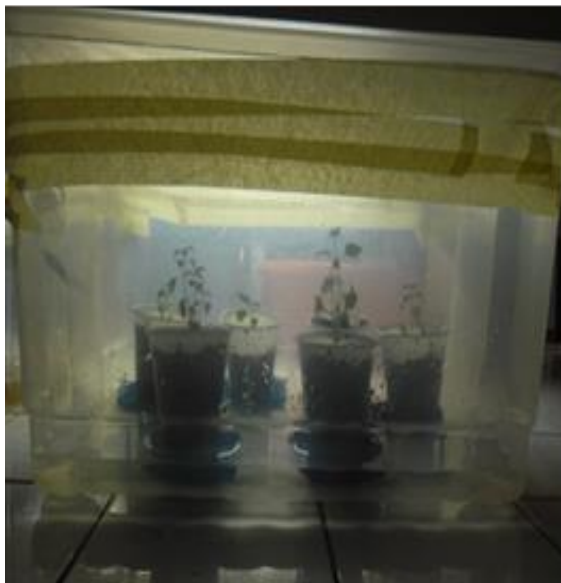


Figure n°3 : Taux de survie des vitroplants après six semaines d'acclimatation (*O. gratissimum*)

A

C



B

D

Figure n°4 : Photos montrant le processus d'acclimatation des vitroplants de *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.

3. IMPLICATION POUR LE DEVELOPPEMENT

Avant l'étape d'enracinement, les deux premières étapes à savoir l'initiation *in vitro* et la multiplication *in vitro* ont été réalisées sur *Ocimum basilicum* et *Ocimum gratissimum* au Laboratoire Central des Biotechnologies Végétales et Amélioration des Plantes (Dossoukpevi et al., 2012). Au cours de l'acclimatation, il est observé 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 tropiques (Ben-Abdallah et al., 2002). 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. Il en résulte alors une obtention massive de vitroplants acclimatés identiques aux plantes mères qui pourraient être exploités par les populations d'une part dans la production à grande échelle de plantes uniformes et d'autre part pour l'extraction de leurs huiles essentielles.

Conclusion

L'optimisation de bonnes conditions d'enracinement est fondamentale dans la mesure où la formation d'un système racinaire développé peut lever toute ambiguïté quant à la reprise des vitroplants en serre. Ainsi, l'acclimatation des vitroplants de *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 sur le milieu d'enracinement de 2 mg/l d'ANA d'où ils proviennent. Enfin, l'optimisation du taux d'acclimatation devrait être envisagée pour les protocoles futurs à travers l'utilisation de plusieurs substrats.

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 me touchent particulièrement. Il n'a épargné aucun effort pour m'aider à soulever toutes les difficultés rencontrées lors de la rédaction de ces fiches. Ses remarques et ses précieux conseils donnés, avec une extrême amabilité, ont été très utiles pour mener à bien le présent travail. Je le prie de trouver ici le gage de 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 du Développement Participatif (EleDP) et la réalisation un peu commune des activités de recherche. Il fut fort agréable de parcourir ce bout du chemin avec toi, et ainsi de devenir amis. Merci de tes coups de mains dans l'élaboration de mes fiches techniques.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Alderson, P. G. et McKiniess, J. 1988. Rooting of cultured -rose shoots. *Acta Horticulturae* 226: 175-178. 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.

Ben Abdallah F., Zemmi H., Fnayou A. and Ghorbel A., 2002: Comportement de plants de vigne issus de microgreffage d'apex. Cahiers Agricultures 11(5) : 349-54.

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 de *Ocimum*spp (*Lamiaceae*): *Ocimum basilicum* et *Ocimum gratissimum* cultivées au Bénin. Int. J. Biol. Chem. Sci. 6(6): 4046-4057.

Murashige, T and Skoog, F. 1962: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 443- 477.

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.