

ETABLISSEMENT D'UN PROTOCOLE EFFICACE DE GERMINATION DES GRAINES DU THE DE SAVANE (*Lippia multiflora* MOLD., VERBENACEAE)

A. B. SOUMAHORO¹, T. KONE¹, M. KONE¹, S. KONATE², J. Y. KOUADIO¹ et M. ZOUZOU²

¹Laboratoire de Biologie et Amélioration des Productions Végétales, UFR Sciences de la Nature, Université Nanguy Abrogoua, 02 BP 801 Abidjan 02, Côte d'Ivoire. E-mail : andresoumahoro@yahoo.fr

²Laboratoire de Physiologie Végétale, UFR Biosciences, Université Félix Houphouët Boigny, 22 BP 582 Abidjan 22, Côte d'Ivoire.

RESUME

Lippia multiflora Mold. est une plante aromatique qui croît spontanément dans les zones de savanes de l'Afrique subtropicale. Elle est utilisée dans les traitements de l'hypertension artérielle, du paludisme et autres affections gastriques. L'insuffisance de matériels de plantation, due au faible taux de germination des graines, limite l'extension de la culture. La présente étude vise à définir les conditions optimales pour la production de plants à partir de graines. Les graines ont ainsi été traitées avec différents agents chimiques avant le semis dans des boîtes de Pétri, sur du papier filtre ou sur le milieu de base de Murashige et Skoog (MS). Sur le papier filtre, l'imbibition dans l'eau distillée des graines, pendant 24 heures, a donné le meilleur taux de germination (59,01 %). La stérilisation des graines dans l'acide sulfurique 96 % durant 1 minute, suivie d'un trempage pendant 20 minutes dans l'hypochlorite de sodium (3,6 % de chlore actif) a favorisé un faible taux de contamination (3,38 %) et un taux élevé de germination (90,33 %) sur le milieu MS.

Mots clés : *Lippia multiflora*, germination, graine, stérilisation.

ABSTRACT

ESTABLISHMENT OF EFFICIENT PROTOCOL FOR SEEDS GERMINATION IN SAVANNAH TEA (*Lippia multiflora* MOLD., VERBENACEAE)

Lippia multiflora Mold. is an aromatic plant which spontaneously grows in savannah aereas of subtropical Africa. It is used in the treatment of diseases like arterial hypertension, malaria and other gastric affections. Deficiency of plant materials, due to the poor germination of seeds, highly reduces the culture extension. The present study aims to define optimal conditions for seedling production through seed germination. Seeds were treated with various chemical agents, before sowing in Petri dishes on filter paper or on Murashige and Skoog (MS) solidified basal medium. When seeds were placed on filter paper, imbibition of seeds in distilled water for 24 hours expressed the best rate of germination (59.01 %). Seeds surface sterilization by immersion in sulphuric acid 96 % during 1 minute, followed by soaking for 20 minutes in sodium hypochloride (3,6 % of active chlorine) exhibited a low level of contamination (3.38 %) and a high rate of germination (90.33 %) on MS medium.

Key words : *Lippia multiflora*, germination, seeds, sterilization.

INTRODUCTION

L'utilisation des plantes pour se soigner date de bien longtemps en médecine traditionnelle africaine. Aux plans national et international, l'utilisation des plantes pour l'extraction de principes actifs occupe, de plus en plus, une place importante dans les activités de nombreuses firmes pharmaceutiques. Le nombre de produits naturels, de fongicides et de médicaments élaborés à partir de plantes ne cesse de croître à l'échelle mondiale (Oussou *et al.*, 2008 ; Emmanuel *et al.*, 2009 ; Sambe *et al.*, 2010).

Toutefois, la production et l'exploitation de telles plantes, en Côte d'Ivoire, demeurent au stade traditionnel. Cette situation est surtout due à l'absence de programmes de domestication de ces plantes, ainsi qu'aux difficultés liées à l'approvisionnement en semences saines. En Côte d'Ivoire, *Lippia multiflora* Mold., connue sous le nom de thé de savane (Adjanohoun *et al.*, 1980), est l'une des principales plantes aromatiques dont les feuilles sont séchées, puis commercialisées par les femmes (N'Guessan et Yao - Kouamé, 2010). La plante est utilisée en médecine traditionnelle, en Afrique de l'Ouest, pour ses nombreuses propriétés thérapeutiques. Les feuilles de *Lippia multiflora* Mold. sont utilisées, sous forme de tisane ou de thé, pour lutter contre l'hypertension artérielle, le paludisme, le rhume, la toux, mais aussi contre les accès fébriles et grippaux, et les diarrhées (Plano, 1984 ; Pham et Pham, 1988). La plante est également utilisée pour ses effets anti-inflammatoires, relaxants et sédatifs (Oladimedji *et al.*, 2000 ; Abena *et al.*, 2001 ; 2003).

En plus de ses vertus thérapeutiques, l'importance socio-économique de cette plante est avérée aux niveaux national et régional. Les feuilles de la plante sont également utilisées pour la production de substances naturelles, notamment, les huiles essentielles ou les principes actifs.

Malgré cette importance, *Lippia multiflora* Mold. demeure un produit de cueillette et n'est pas cultivée, à cause de l'insuffisance du matériel de plantation et du faible taux de germination des graines (Ket *et al.*, 2004). L'utilisation de boutures pour la propagation végétative semble être l'une des voies pour contourner ces contraintes. Toutefois, l'enracinement des

boutures est difficile et nécessite l'emploi de substances hormonales dont l'apport entraîne souvent un fort taux de mortalité, quelques jours après le bourgeonnement (Ameyaw, 2009). L'adoption de la micropropagation a été décrite chez quelques espèces du genre *Lippia* incluant *Lippia junelliana* Mold. (Juliani *et al.*, 1999) et *Lippia alba* Mold. (Gupta *et al.*, 2001).

La littérature sur la production de plants de *Lippia multiflora* Mold. à partir de graines est pratiquement inexistante. L'application de différents régimes hydriques et l'utilisation de divers types de substrats, pour favoriser les conditions de germination des graines et de croissance de plants ont récemment été rapportées (Hien *et al.*, 2012 ; Alui *et al.*, 2013). Le développement d'une méthodologie simple et efficace pour la production en masse de plants de *Lippia multiflora* Mold. à partir des graines serait possible. Ainsi, la présente étude a pour objectif d'améliorer le taux de germination des graines de *Lippia multiflora* Mold. au moyen des techniques de culture *in vitro*. L'influence de divers traitements chimiques sur différents paramètres de germination des graines de *Lippia multiflora* Mold. a ainsi été évaluée. La définition des conditions optimales de germination favorisera la promotion de la culture, ainsi qu'une meilleure exploitation des propriétés médicinales de la plante.

MATERIEL ET METHODES

MATERIEL VEGETAL

Le matériel végétal est constitué de graines de *Lippia multiflora* Mold. issues de fruits matures, récoltés sur les inflorescences sèches. Ces dernières ont été récoltées sur la parcelle expérimentale de l'Université Nangui Abrogoua (Abidjan). Ce site est localisé au Sud de la Côte d'Ivoire, entre 5°23' de latitude Nord et 4°11' de longitude Ouest.

METHODES

Germination des graines sur du papier filtre

Influence des agents chimiques

Les agents chimiques utilisés ont été l'acide sulfurique (H₂SO₄) à 96 % et l'eau oxygénée

(H₂O₂) à 30 %. Ces solutions étant des substances de scarification chimique, réduiraient l'épaisseur et la dureté des téguments des graines et, de ce fait, faciliteraient leur germination. Différents lots de 90 graines ont été trempés respectivement pendant 1, 5, 15 et 20 minutes dans ces solutions. Elles ont ensuite été abondamment rincées à l'eau distillée stérile avant d'être dispersées sur du papier filtre tapissant le fond des boîtes de Pétri. Le témoin est constitué de graines non traitées.

Influence de la durée de l'imbibition dans l'eau sur la germination des graines

Les meilleures durées de temps de trempage ont été retenues pour déterminer l'effet de l'imbibition sur la germination des graines. Les graines ont ainsi été imbibées dans l'eau distillée stérile, pendant 24 heures avant le semis, sur papier filtre, en boîte de Pétri. Le témoin réalisé a été constitué de graines qui n'ont subi aucun traitement. Chaque traitement a été répété trois fois, à raison de 90 graines par répétition.

Conditions de germination

Les semis effectués en boîtes de Pétri ont été incubés à l'obscurité continue, dans un germoir, à une température de 27 ± 2 °C, et une humidité relative comprise entre 70 et 80 %.

Germination des graines sur le milieu MS

Effet de la nature et de la concentration des agents stérilisants

Quatre agents désinfectants, à savoir : l'acide sulfurique, l'éthanol, l'hypochlorite de sodium et le chlorure de mercure, ont été utilisés pour la stérilisation des graines, sous une hotte à flux laminaire. Les graines ont été trempées pendant 1 minute, dans l'acide sulfurique ou dans l'alcool, aux concentrations suivantes : 50 ; 70 et 96 %. L'hypochlorite de sodium (NaOCl) et le chlorure de mercure (HgCl₂) ont été utilisés aux concentrations de 1 ; 2,4 et 3,6 % (v/v) de matière active, et les graines y ont été trempées pendant 10 minutes. Après chaque traitement, les graines ont été abondamment rincées avec de l'eau distillée stérile puis conservées à l'obscurité dans de l'eau distillée stérile, pendant 24 h. Au terme de l'imbibition, les graines, ont été placées sur le milieu de germination à raison d'une graine par tube à essai. L'incubation est réalisée dans

une salle de culture, à la photopériode de 16 h et à la température de 25 ± 2 °C. Toutes les expériences ont été répétées trois fois, à raison de 30 graines par répétition.

La concentration optimale d'agents stérilisants est utilisée pour tester différentes durées d'immersion des graines.

Effet du temps d'application de l'agent stérilisant

Les temps de trempage testés ont été de 1 ; 5 et 10 minutes, dans l'acide sulfurique. Dans l'hypochlorite de sodium et le chlorure de mercure, les graines ont été trempées pendant 10 ; 15 ; 20 et 30 minutes. Les conditions de germination ont été les mêmes que celles décrites précédemment. Les meilleures durées du temps de trempage des graines ont été retenues pour déterminer l'effet de l'association de deux agents stérilisants.

Effet de l'association de deux agents stérilisants

L'effet de la combinaison de deux agents stérilisants a été étudié selon le protocole établi par Marcin (2007). Les graines ont successivement été trempées dans H₂SO₄ (1 minute) et NaOCl ou HgCl₂ (20 minutes). Après les trempages, les graines ont abondamment été rincées à l'eau distillée stérile avant d'être placées sur le milieu de germination.

Le milieu de germination est celui de Murashige et Skoog (1962) contenant les vitamines B₅ (Gamborg *et al.*, 1968) et 3 % de saccharose. Le pH du milieu a été ajusté à 5,8 puis le gelrite à 0,25 % (m/v) a été additionné comme agent gélifiant. Le milieu a ensuite été stérilisé à l'autoclave, à la température de 121 °C, sous une pression de 1 bar, pendant 30 minutes.

Evaluation de la germination

Les paramètres mesurés ont été : le temps maximum de germination, les taux de germination et de contamination. Le temps maximum de germination (tm), exprimé en jour (j), est le temps au-delà duquel aucune germination de graine n'a été observée. Les taux de germination (TG) et de contamination (TC) des graines par les microorganismes, exprimés en pourcentage (%), sont calculés par les relations suivantes :

TG = Nombre de graines germées / Nombre total de graines mises en culture x 100 ;

TC = Nombre de graines contaminées / Nombre total de graines mises en culture x 100

Analyse statistique des données

Le dispositif expérimental adopté est celui de la randomisation totale. Après dix jours de culture, le temps maximum de germination, les taux de germination et de contamination ont été déterminés.

L'analyse de variance (ANOVA) a été utilisée pour vérifier l'égalité des variances. Lorsqu'une différence a été observée, le test des rangs multiples de Newman-Keuls, au seuil de 5 %, a été appliqué pour séparer les moyennes. Les tests statistiques ont été effectués à l'aide du logiciel STATISTICA 7.0. Avant les analyses de variance des taux de germination et de contamination, une transformation Arc sin \sqrt{p} (p = proportion) a été réalisée.

RESULTATS

GERMINATION DES GRAINES SUR DU PAPIER FILTRE

Effet des agents chimiques

Les temps et les taux de germination des graines traitées sont présentés dans le tableau 1. Les premières germinations ont été observées après quatre jours d'incubation, pour les graines traitées avec H₂SO₄ concentré à 96 %. Le taux de germination obtenu après le trempage des graines dans H₂SO₄ a été significativement plus

élevé (30,66 %) que celui du témoin (22,33 %) et celui obtenu après traitement des graines avec H₂O₂ à 30 % (26,66 %).

Les valeurs relatives à l'influence du temps de trempage dans les solutions chimiques sur la germination des graines sont consignées dans le tableau 2. Avec l'acide sulfurique ou l'eau oxygénée, les temps de trempage inférieurs ou égaux à 10 minutes ont permis une germination à des temps maximums, statistiquement, identiques. Toutefois, à ces différents temps, la germination est intervenue plus rapidement avec l'acide sulfurique. Pour les temps d'immersion plus longs (15 et 20 minutes), aucune germination n'a été observée. Le taux maximum de germination (30,66 %) a été obtenu pour un bref temps de trempage (1 minute) des graines dans H₂SO₄.

Effet de l'imbibition dans l'eau

Le temps maximum pour assurer la germination avec les graines imbibées directement dans l'eau, ou après un traitement avec H₂SO₄ ou H₂O₂, a varié de trois à quatre jours. Aucune différence statistique n'existe entre ces valeurs, qui sont significativement inférieures au temps exprimé avec le témoin (Tableau 3). Les taux de germination ont été identiques lorsque les graines ont été imbibées (59,01 %) ou traitées avec H₂SO₄ (57,52 %) ou H₂O₂ (58,34 %) avant l'imbibition. Ces taux sont statistiquement différents de celui exprimé par le témoin (22,33 %).

Tableau 1 : Germination des graines de *Lippia multiflora* Mold. sur le papier filtre après traitement à l'acide sulfurique (96 %) et à l'eau oxygénée (30 %).

Germination of Lippia multiflora Mold. seeds on filter paper after treatment with sulphuric acid (96 %) and hydrogen peroxide (30 %).

Traitement	Temps maximum de germination (jours)	Taux de germination (%)
Témoin (sans traitement)	6,33 ± 0,57 b	22,33 ± 0,33 a
H ₂ SO ₄	4,00 ± 0,57 a	30,66 ± 0,33 b
H ₂ O ₂	6,00 ± 0,00 b	26,66 ± 0,45 a
<i>P</i>	< 0,0001	< 0,0001

Dans une même colonne, les chiffres suivis de la même lettre ne sont pas significativement différents selon le test de Newman-Keuls ($P < 0,05$). ± : erreur standard

Tableau 2 : Germination sur le papier filtre des graines de *Lippia multiflora* Mold. soumises à différents temps d'immersion dans l'acide sulfurique (96 %) et dans l'eau oxygénée (30 %).

Germination on filter paper of Lippia multiflora Mold. seeds submitted to different times of immersion in sulphuric acid (96 %) and hydrogen peroxide (30 %).

Traitement	Temps de trempage (min.)	Temps maximum de germination (jours)	Taux de germination (%)
H ₂ SO ₄	1	4 ± 0,57 a	30,66 ± 0,33 e
	5	4 ± 0,57 a	22,20 ± 1,04 d
	10	4 ± 0,57 a	05,01 ± 1,00 b
	15	-	0,00 ± 0,00 a
	20	-	0,00 ± 0,00 a
H ₂ O ₂	1	6,00 ± 0,00 b	26,66 ± 0,45 d
	5	6,00 ± 0,00 b	17,06 ± 0,12 c
	10	6,00 ± 0,00 b	06,48 ± 0,22 b
	15	-	0,00 ± 0,00 a
	20	-	0,00 ± 0,00 a
<i>P</i>		< 0,0001	< 0,0001

Dans une même colonne, les chiffres suivis de la même lettre ne sont pas significativement différents selon le test de Newman-Keuls (P < 0,05). ± : erreur standard

Tableau 3 : Germination des graines de *Lippia multiflora* Mold. sur du papier filtre après avoir été imbibées suite au traitement à l'acide sulfurique (96 %) et à l'eau oxygénée (30 %).

Germination on filter paper of Lippia multiflora Mold. seeds submitted to an imbibition step after the treatment with sulphuric acid (96 %) and hydrogen peroxide (30 %).

Traitement	Temps maximum de germination (jours)	Taux de germination (%)
Témoin	6,33 ± 0,57 b	22,33 ± 0,33 a
Imbibition eau	4,00 ± 0,57 a	59,01 ± 0,64 b
H ₂ SO ₄ + imbibition eau	3,33 ± 0,57 a	57,52 ± 1,01 b
H ₂ O ₂ + imbibition eau	3,33 ± 0,57 a	58,34 ± 0,86 b
<i>P</i>	< 0,0001	< 0,0001

Témoin : les graines ont été directement mises sur du papier filtre, sans aucun traitement.

Dans une même colonne, les chiffres suivis de la même lettre ne sont pas significativement différents selon le test de Newman-Keuls (P < 0,05). ± : erreur standard.

Germination des graines sur le milieu MS

Effet de la concentration des agents stérilisants

Les valeurs concernant l'effet des concentrations des agents stérilisants sur les paramètres de germination sont consignées dans le tableau 4. Aucune germination n'a été observée chez les graines traitées avec l'alcool pendant une

minute, et le taux de contamination a été maximal (100 %) quelle que soit la concentration. Lorsque les graines sont traitées avec différentes concentrations de H₂SO₄ pendant une minute, le taux de germination est faible (2,33 % à 14,36 %), tandis que le taux de contamination est important (91 % à 70,31 %). Ce même constat est noté avec les graines traitées pendant 10 minutes avec différentes concentrations de NaOCl et de HgCl₂.

Tableau 4 : Germination sur le milieu de base MS des graines de *Lippia multiflora* Mold. traitées avec différentes concentrations d'agents stérilisants.

Germination on MS basal medium of Lippia multiflora Mold. seeds treated with different concentrations of sterilized agents.

Traitement	Concentrations (%)	Temps maximum de germination (jours)	Taux de contamination (%)	Taux de germination (%)
C ₂ H ₅ OH (1 min)	50	-	100 d	0,00 a
	70	-	100 d	0,00 a
	96	-	100 d	0,00 a
H ₂ SO ₄ (1 min)	50	9,00 ± 1,00 b	91,00 ± 1,52 d	2,33 ± 1,52 b
	70	8,66 ± 0,57 b	90,73 ± 1,52 d	5,00 ± 1 c
	96	5,66 ± 0,57 a	70,31 ± 1,66 c	14,36 ± 1,76 d
NaOCl (10 min)	1	-	100 d	0,00 a
	2	-	100 d	0,00 a
	3,6	7,66 ± 0,57 b	74,79 ± 2,06 c	4,00 ± 1 bc
HgCl ₂ (10 min)	1	6,66 ± 0,57 b	78,40 ± 2,47 c	3,00 ± 1 b
	2,4	-	64,66 ± 4,93 b	0,00 a
	3,6	-	48,33 ± 2,51 a	0,00 a
	<i>P</i>	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001

Dans une même colonne, les chiffres suivis de la même lettre ne sont pas significativement différents selon le test de Newman-Keuls ($P < 0,05$). ± : erreur standard.

Effet de la durée de trempage des graines dans l'agent stérilisant

Le tableau 5 présente les résultats relatifs à l'étude de la durée de trempage des graines sur les paramètres de germination.

Le taux de contamination a été significativement réduit lorsque le temps de trempage des graines augmente chez les agents stérilisants testés.

Pour les graines traitées avec (H₂SO₄) (96 %), le faible taux de contamination (14,66 %) a été obtenu après un temps de trempage de 10 minutes. Cependant, ce temps de trempage n'a pas favorisé la germination des graines. Avec NaOCl et (HgCl₂), les plus faibles taux de contamination ont été obtenus à partir de 20 minutes pour des taux de germination respectifs de 13,66 % et 14,66 %.

Tableau 5 : Germination sur le milieu de base MS des graines de *Lippia multiflora* Mold. soumises à différents temps d'immersion dans les solutions d'agents stérilisants.

Germination on MS basal medium of Lippia multiflora Mold. seeds treated with various sterilized agents at different times of immersion.

Traitement	Durée de trempage (min.)	Temps maximum de germination (jours)	Taux de contamination (%)	Taux de germination (%)
H ₂ SO ₄ (96 %)	1	5,66 ± 0,57ab	70,31 ± 1,66 d	14,36 ± 1,76 d
	5	5,33 ± 0,57 ab	51,35 ± 6,04 b	3,33 ± 0,57 b
	10	5,33 ± 0,57 ab	14,66 ± 1,52 a	0,00 a
	10	7,66 ± 0,57 c	74,79 ± 2,06 de	4,00 ± 1,00 b
NaOCl (3,6 %)	15	6,66 ± 0,57 bc	70,37 ± 1,60 d	6,33 ± 0,57 c
	20	5,33 ± 0,57 ab	62,52 ± 2,87 c	13,66 ± 0,57 d
	30	5,33 ± 0,57 ab	59,01 ± 1,65 c	4,66 ± 0,57 b
	10	6,66 ± 0,57 bc	78,40 ± 2,47 e	3,00 ± 1,00 b
HgCl ₂ (1 %)	15	6,66 ± 0,57 bc	72,72 ± 3,01 de	4,00 ± 1,00 b
	20	4,66 ± 0,57 a	64,13 ± 1,39 c	14,66 ± 0,57 d
	30	4,33 ± 0,57 a	60,44 ± 0,60 c	2,66 ± 0,57 b
	<i>P</i>	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001

Dans une même colonne, les chiffres suivis de la même lettre ne sont pas significativement différents selon le test de Newman-Keuls ($P < 0,05$). ± : erreur standard.

Effet de l'association de deux agents stérilisants sur la germination des graines

Les graines ont successivement été traitées par deux agents stérilisants différents. Les paramètres de la germination ont été évalués, puis consignés dans le tableau 6. La combinaison H_2SO_4 -NaOCl ou H_2SO_4 -HgCl₂ a

amélioré significativement la germination des graines de *Lippia multiflora* Mold. Le meilleur taux de germination (90,33 %) a été obtenu pour une brève immersion des graines dans (H_2SO_4) (96 %) pendant 1 minute, suivie d'un trempage dans NaOCl (3,6 % chlore actif), pour une durée de 20 minutes.

Tableau 6 : Germination sur le milieu de base MS des graines de *Lippia multiflora* Mold. traitées dans différentes combinaisons d'agents stérilisants.

Germination on MS basal medium of Lippia multiflora Mold. seeds treated with different combinations of sterilized agents.

Traitement	Temps maximum de germination (jours)	Taux de contamination (%)	Taux de germination (%)
H_2SO_4 (96 %)	5,66 ± 0,57 a	70,31 ± 1,66 c	14,36 ± 1,76 a
NaOCl (3,6 %)	5,33 ± 0,57 a	62,52 ± 2,87 c	13,66 ± 0,57 a
HgCl ₂ (1 %)	4,66 ± 0,57 a	64,13 ± 1,39 c	14,66 ± 0,57 a
H_2SO_4 + NaOCl	4,66 ± 0,57 a	3,38 ± 0,57 a	90,33 ± 1,52 c
H_2SO_4 + HgCl ₂	5,33 ± 0,57 a	21,33 ± 1,52 b	56,41 ± 1,52 b
<i>P</i>	0,101	< 0,0001	< 0,0001

Dans une même colonne, les chiffres suivis de la même lettre ne sont pas significativement différents selon le test de Newman-Keuls ($P < 0,05$). ± : erreur standard.

DISCUSSION

GERMINATION DES GRAINES SUR LE PAPIER FILTRE

L'utilisation des agents chimiques a permis la germination des semences de *Lippia multiflora* Mold. L'amélioration de la germination des graines pourrait s'expliquer par le fait qu'en scarifiant chimiquement les téguments, l'acide sulfurique aurait augmenté leur perméabilité à l'air et à l'eau, et, de ce fait, aurait favorisé plus rapidement le processus de la germination. Ces résultats sont similaires à ceux de Sambé *et al.* (2010) qui ont montré que le trempage des graines de *Parkia biglobosa* L. dans l'acide sulfurique absolu favorise une bonne germination. L'effet favorable de H_2SO_4 sur la germination des graines a aussi été rapporté par Todd et Duryea (1993) chez *Dialium guineense* L., et chez *Tamarindus indica* L. par Muhammad et Amusa (2003).

Le traitement par trempage de courte durée (1 min.) des graines dans H_2SO_4 , a été efficace pour la germination sur papier filtre. Au-delà d'une minute de trempage, l'acide sulfurique affecterait l'embryon à cause de son effet corrosif.

Muhammad et Amusa (2003) ont montré que les graines de *Tamarindus indica* L. trempées dans l'acide sulfurique à 98 %, à des temps plus longs, ont des taux de germination faibles. Le délai de trempage des graines, qui est favorable à la germination, a été qualifié de durée inoffensive par Çavusoglu et Kabar (2010). Selon ces mêmes auteurs, le traitement des graines avec H_2O_2 induit une accumulation des enzymes antioxydants (AOE) qui éliminent l'excès des activités spécifiques d'oxygène (active oxygen species : AOS). Cette élimination favoriserait une bonne germination des graines. Par ailleurs, l'imbibition des graines dans l'eau a permis d'améliorer significativement le taux de germination. Cette imbibition faciliterait l'élimination des inhibiteurs hydrosolubles de la germination présents dans le tégument, tel que suggéré par Mazliak (1982), chez les graines ayant une germination difficile en condition naturelle. Les travaux effectués par Ogawa et Iwabuchi (2001) puis Çavusoglu et Kabar (2010), respectivement, sur les graines de *Zinnia elegans* L. et de *Hordeum vulgare* L., ont montré qu'un traitement à l'eau, à l'éthanol ou au peroxyde d'hydrogène, neutralise l'acide abscissique qui est un inhibiteur de la germination. Ainsi, l'imbibition des graines dans

l'eau distillée, pendant 24 heures, se présente comme un moyen efficace pour réaliser une bonne germination chez *Lippia multiflora* Mold., et serait complémentaire de l'utilisation d'un meilleur sol (Alui et al., 2013).

GERMINATION DES GRAINES SUR LE MILIEU MS

Les concentrations des agents stérilisants ont des effets différents sur la germination, selon le produit utilisé. Les concentrations les plus efficaces pour la germination des graines ont été de 96 % pour H_2SO_4 ; 3,6 % pour NaOCl et 1 % pour $HgCl_2$. Aux fortes concentrations, H_2SO_4 et NaOCl éliminent les microorganismes qui ont infecté leurs téguments. Par ailleurs, H_2SO_4 , par son action de scarification, lève l'inhibition tégumentaire des graines et facilite ainsi leur germination. Contrairement aux autres agents stérilisants, $HgCl_2$ serait plus active sur la germination à faible concentration. Les fortes concentrations de cet agent stérilisant ont été létales pour l'embryon et, de ce fait, auraient rendu les graines inaptées à la germination.

En relation avec la durée de trempage des graines dans l'agent stérilisant, un traitement avec H_2SO_4 (96 %), au-delà de 1 minute, exercerait un effet corrosif. Cette substance détruirait l'embryon des graines et empêcherait ainsi leur germination. Joshi et Pant en 2010 ont également montré que H_2SO_4 , tout en améliorant la germination des graines de *Canna indica* L., réduit cependant leur viabilité lorsque que le temps d'immersion devient long.

Après un traitement des graines avec H_2SO_4 (96 %), le trempage subséquent de celles-ci dans NaOCl (3,6 %) ou $HgCl_2$ (1 %), aurait accru leur capacité à éliminer les microorganismes au contact des semences. La synergie d'action de ces deux solutions, a permis de désinfecter efficacement les graines et, ainsi, améliorer leur taux de germination. L'efficacité de l'association de H_2SO_4 et de NaOCl sur la germination des graines, a déjà été signalée chez *Taxus baccata* L. (Marcin, 2007).

CONCLUSION

Cette étude a permis de développer un protocole efficace de germination des graines chez *Lippia multiflora* Mold. Les résultats ont montré que les graines de cette espèce présentent une inhibition de germination qui pourrait être levée

par un trempage des semences dans l'eau, pendant 24 heures. La germination des graines de *Lippia multiflora* Mold., sur le milieu MS, nécessite une désinfection des graines. Celle-ci peut se faire par immersion des graines pendant 1 minute, dans l'acide sulfurique concentré (96 %), suivie d'un trempage dans l'hypochlorite de sodium à 3,6 % de chlore actif, pendant 20 minutes.

REFERENCES

- Abena A. A., Atipo-Ebata J. k., Hondi A. T. and M. Diatewa. 2001. Psychopharmacologica Properties of crude extract and essential oil of *Lippia multiflora*, Encephale. 27 (4) : 360 - 364.
- Abena A. A., Diatewa M., Gakosso G., Gbeassor M., Hondi-Assah T. and J. M. Ouamba. 2003. Analgesic; antipyretic and anti-inflammatory effects of essential oil of *Lippia multiflora*. Fitoterapia 74 : 231 - 236.
- Adjanohoun E. J., Ake A. L., Floret J. J., Guinko S., Kouame M., Ahyi A. M. R. and J. Raynal. 1980. Médecine traditionnelle et pharmacopée ; Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques au Mali. 279 p.
- Alui K. A., Ballo K. C., Yapi A., Kouadio K. H., Kouadio K. P., Touré N., N'Guessan K. A., Kwadio K. E. and A. Yao-Kouamé. 2013. Improvement Test on the Germination in *Lippia Multiflora* : Influence of Some Factors Related to Soil on Germination and Seed Development. Asian J. Agric. Ru. Dev. 3 (1) : 18 - 29.
- Ameyaw Y. 2009. A growth regulator for the propagation of *Lippia multiflora* Moldenke, a herbal for the management of mild hypertension in Ghana. J. Med. Plant. Res. 3(9) : 681 - 685.
- Çavusoglu K. and K. Kabar. 2010. Effects of hydrogen peroxide on the germination and early seedling growth of barley under NaCl and high temperature stresses. EurAsia J. BioSci. 4 : 70 - 79.
- Emmanuel S., Thierry R., Sandra C. and B. Ben. 2009. Polar *Lippia* extracts as alternatives for the postharvest control of Guazatine resistant strains of *Penicillium digitatum* in citrus. Fruit, Cirad EDP Sci. All righ. Res. 64 : 75 - 82.
- Gamborg O. L., Miller R. A. and K. Ojima. 1968. Nutrient requirement of suspension cultures of Soybean root cells. Exp. Cell Res. 50 : 151 - 158.

- Gupta S. K., Khanuja S. P. S. and S. Kumar. 2001. *In vitro* micropropagation of *Lippia alba*. *Curr. Sci.* 81 : 206 - 210.
- Hien. M. P., Yao-Kouamé A. and R. Yao. 2012. Incidence de l'alimentation hydrique sur la conduite des pépinières de graines de *Lippia multiflora* au nord-est de la Côte d'Ivoire (Bondoukou). *J. Appl. Biosci.* 56 : 4108 - 4117.
- Joshi S. C. and S. C. Pant. 2010. Effect of H₂SO₄ on Seed Germination and Viability of *Canna indica* L. a Medicinal Plant. *J. AmSci.* 6 (6) : 24 - 25.
- Juliani H. R. J., Koroch A. R., Juliani H. R. and V. S. Trippi. 1999. Micropropagation of *Lippia junelliana* (Mold.) Tronc. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 59 : 175 - 179.
- Ket N. V., Hahn E. J., Park S. Y., Chakrabarty D. and K. Y. Paek. 2004. Micropropagation of an endangered orchid *Anoectochilus formosanus*. *Biol. Planta.* 48 : 339 - 344.
- Marcin Z. 2007. A practical method for overcoming the dormancy of *Taxus baccata* isolated embryos under *in vitro* conditions. *In vitro Cell Dev. Biol. Plant.* (43) : 623 - 630.
- Mazliak P. 1982. Croissance et développement, Collection Méthodes. Ed. Paris : Hermann, 465 p.
- Muhammad S. and N. A. Amusa. 2003. Distribution and socio-economic of two leguminous tree species. *Glob. J. Agric. Sci.* 2 : 122 - 126.
- Murashige T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with Tobacco virus cultures. *Physiol. Planta.* 15 : 473 - 497.
- N'Guessan K. A. and A. Yao-Kouamé. 2010. Filière commercialisation et usage des feuilles de *Lippia multiflora* en Côte d'Ivoire, *J. Appl. Biosci.* 29 : 1743 - 1752
- Ogawa K. and M. Iwabuchi. 2001. A mechanism for promoting the germination of *Zinnia elegans* seeds by hydrogen peroxide. *Plant Cell Physiol.* 42 : 286 - 291.
- Oladimeji F., Orafidiya O., Ogunniyi T. and T. Adewunmi. 2000. Periodical and scabical properties of *Lippia multiflora* essential oil. *J. Ethnopharmacol.* 72 (1 - 2) : 305 - 311.
- Oussou K. R., Yolou S., Boti J. B., Guessennd K. N., Koffi C., Ahibo C. and J. Casanova. 2008. Etude chimique et activité antidiarrhéique des huiles essentielles de deux plantes aromatiques de la pharmacopée ivoirienne. *Eur. J. SciRes.* 24 (1) : 94 - 103.
- Pham H. K. and H. A. Pham. 1988. Comparative hypotensive effects of compounds extracted from *Lippia multiflora* leaves. *Planta. Med.* 54 : 294 - 296.
- Plano C. 1984. Contribution à l'étude de *Lippia multiflora* Moldenke (Verbénacée). Thèse de doctorat d'Etat en pharmacie, Faculté des Sciences Pharmaceutiques, Université Paul Sabatier Toulouse (France), 92 p.
- Sambe M. A. N. Sangna M. and M. O. Sy. 2010. Seed germination and *in vitro* plant regeneration of *Parkia biglobosa* benth. *Afr. J. Biotechnol.* 9 (21) : 3099 - 30108.
- Todd B. A. H and M. L. Duryea. 1993. Seed pre-treatment methods to improve germination of the multipurpose West African forest Species *Dialium guineense*. *For. Ecol. Manage* 57 : 257 - 273.