



CLIVIA

CULTURE *IN VITRO* DE L'ORCHIDEE

PRINCIPE DE LA MANIPULATION

Des graines d'orchidées sont désinfectées et mises à germer sur un milieu de culture. Environ 4 semaines plus tard, elles auront formé de petites boules vertes appelées le « caviar vert » qui sera repiqué sur un nouveau milieu. Les manipulations sont effectuées en milieu stérile, à côté d'un bec Bunsen, d'un bleuet ou d'une lampe à alcool.

En conditions naturelles, les graines d'orchidées ne germent qu'en présence d'un champignon mycorhizien. D'autre part, nombreuses d'entre elles ne se développent pas à cause des contaminants et des prédateurs. En culture *in vitro*, les graines sont dans une atmosphère très protégée permettant un taux de germination très important et le milieu de culture contient tout ce qui est nécessaire au développement de la graine.

Il faut environ 6 mois pour que les plantules aient une taille suffisante permettant de les sortir du flacon et les transférer en conditions *in vivo*. Pour cela, on passe par une phase dite d'acclimatation qui a pour but d'habituer la plante à passer d'une atmosphère très protégée à des conditions plus difficiles.

PREPARATION DU MATERIEL ET DES MILIEUX DE CULTURE

1 Matériel et produits nécessaires :

* pour les milieux de culture :

- une marmite à pression ou un autoclave
- éprouvettes pour mesurer l'eau (ou verre doseur)
- eau distillée ou déminéralisée
- flacon pour faire fondre le milieu de culture
- pots pour répartir les milieux

* pour la désinfection des graines :

- flacon pour préparer la solution de désinfection
- tube à semis
- entonnoir
- papier filtre
- eau distillée ou déminéralisée
- hypochlorite de calcium

* pour la manipulation :

- bec Bunsen ou bleuet ou lampe à alcool
- spatule
- pince
- alcool à brûler

2 Préparation du milieu de culture :

Verser la poudre dans un récipient et ajouter la quantité d'eau distillée correspondant au volume de la dose.

Faire fondre le milieu dans un bain-marie bouillant ou au four à micro-ondes. Quand le milieu est totalement fondu, il est limpide. Il est très important que le milieu soit entièrement fondu avant de le stériliser.

Répartir le milieu dans les pots qui serviront pour la culture.

Fermer les pots.

Si vous stérilisez à l'aide d'une marmite à pression, placer environ 2 litres d'eau au fond de la marmite et poser les pots dans le panier. Stériliser 30 mn à partir du sifflement de la soupape en maintenant la pression au maximum ou à l'autoclave (25 mn à 115°C ou 20 mn à 120°C).

A la fin du temps de stérilisation, laisser refroidir sans enlever la soupape.

Sortir les pots encore chauds et les afin qu'ils puissent refroidir et se solidifier (prévoir environ 3 heures).

3 Préparation de la solution de désinfection :

- verser environ 5 g d'hypochlorite de calcium dans un flacon
- ajouter 100 ml d'eau distillée ou déminéralisée
- mélanger énergiquement puis laisser reposer 1 minute
- sur l'entonnoir, placer le papier filtre
- filtrer la solution dans le tube à semis et l'utiliser immédiatement.

4 Préparation du plan de travail :

- choisir une pièce bien éclairée et sans courants d'air
- avant de manipuler, se laver soigneusement les mains et les avant-bras au savon
- bien désinfecter votre plan de travail à l'eau de Javel
- placer au centre le bec Bunsen ou le bleuet ou la lampe à alcool
- placer sur la droite (pour un droitier) un verre contenant de l'alcool à brûler dans lequel seront placés les instruments.
- sur la gauche du bec Bunsen, placer le pot contenant le milieu de culture.

DESINFECTION DES GRAINES

- verser la totalité des graines dans le tube à semis
- fermer le tube et bien l'agiter
- le retourner et laisser reposer pendant exactement 3 minutes. Les graines remontent et forment un bouchon au dessus de la solution

MISE EN CULTURE

Attention : pendant la manipulation, ne jamais toucher l'extrémité des instruments ou les graines avec les mains, ne pas parler, ne pas faire de courants d'air, bien fermer portes et fenêtres.

- allumer le bec Bunsen ou le bleuet ou la lampe à alcool.
- lorsque les graines sont désinfectées, maintenir le tube renversé et l'ouvrir lentement au dessus d'un récipient : l'air rentre, le liquide s'écoule et les graines restent collées sur la paroi du tube
- stériliser la spatule en la trempant dans l'alcool à brûler et en la flambant rapidement sur la flamme en répétant cette manipulation 3 fois de suite
- à l'aide de cette spatule, prélever les graines et les étaler rapidement sur le milieu de culture
- flamber l'encolure du pot avant de le refermer.

Placer les pots à la lumière du jour en évitant l'ensoleillement direct (qui risquerait de brûler la plante). L'hiver, en période de jours courts, vous pouvez éclairer les pots matin et soir avec des lampes de type lumière du jour.

La germination a lieu au bout de 4 à 5 semaines.

REPIQUAGE

1 Matériel nécessaire :

- bec Bunsen ou bleuet ou lampe à alcool
- pince

2 Préparation du milieu de repiquage :

Procéder comme pour le milieu de germination.

3 Manipulation :

Au bout de 4 à 5 semaines, les graines qui ont germé ont formé des petites boules vertes appelées le « caviar vert ». On peut alors les repiquer dans un nouveau milieu de culture de la même composition que le milieu de germination mais sur lequel on va les isoler afin qu'elles puissent se développer correctement.

En conditions stériles (plan de travail désinfecté, bec Bunsen, bleuet ou lampe à alcool allumés, instruments désinfectés...), les petites boules sont prélevées à l'aide d'une pince et repiquées directement sur le nouveau milieu de culture.

L'encolure des pots est flambée avant de les refermer.

Placer les pots dans les mêmes conditions que pour la germination des graines.

4 Evolution :

Les plantules se développent et les racines se forment.

Quand les racines se sont développées, au bout d'environ 6 mois, elles peuvent être transférées en pots sous serre.

TRANSFERT EN SERRE :

Les jeunes plantes sorties de culture *in vitro* réclament des conditions particulières pour leur adaptation à leur vie en conditions *in vivo*. Il faut les habituer à passer d'une atmosphère très protégée à une vie à l'air libre avec présence de contaminants, humidité variable...

1 matériel nécessaire :

- compost spécial orchidées
- mini-serre
- petits pots
- fongicide

2 manipulation :

- lorsque les plantules présentent plusieurs feuilles et plusieurs racines, les sortir avec précaution à l'aide d'une pince (non stérile)
- rincer les jeunes plantes de façon à éliminer toute trace de gélose
- préparer la solution de fongicide selon les indications du fabricant
- les tremper dans le fongicide
- les repiquer dans les petits pots contenant le compost
- placer les pots dans la mini-serre dans de bonnes conditions de lumière, de température et d'humidité.

Au bout d'environ 15 jours, on peut commencer à entrouvrir progressivement la mini-serre afin d'acclimater la plante à une atmosphère plus sèche. Lorsque la plante paraît suffisamment vigoureuse, on peut la sortir de la serre.

Pendant cette phase d'acclimatation, on peut également appliquer des fongicides et insecticides au bout d'une quinzaine de jours.