



CLIVIA

## CULTURE *in vitro* DU CACTUS

### PRINCIPE GENERAL

Pour cette manipulation, on peut partir soit de graines soit d'un plant de cactus.

Si on part de graines, elles sont désinfectées puis repiquées sur un milieu de développement (= milieu d'enracinement 2).

Si on part d'un plant, on découpe des tranches désinfectées et on les repique sur un milieu de multiplication 1. Quand le plant s'est multiplié on peut alors repiquer les plants sur un milieu d'enracinement 2 .

Les plants enracinés peuvent être transférés en terre dans une mini-serre pour la phase d'acclimatation.

### PREPARATION DU MATERIEL ET DES MILIEUX

#### 1 Matériel et produits nécessaires :

- une marmite à pression (cocotte-minute) ou un autoclave
- éprouvettes pour mesurer l'eau
- Récipient ... pour faire fondre le milieu de culture
- Petits pots pour répartir les milieux

#### 2 Préparation du milieu :

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 flacons qui serviront pour la culture.

Fermer les flacons.

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 flacons 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 (ce qui ferait sauter les bouchons).

Sortir les flacons encore chauds et les poser en position verticale afin qu'ils puissent refroidir et se solidifier (prévoir environ 3 heures).

Avec les milieux de culture, vous pouvez également stériliser les instruments (pince, scalpel ...) après les avoir enveloppés dans du papier aluminium.

## MISE EN CULTURE

### 1 Matériel et produits nécessaires :

#### Matériel :

- 1 verre pour placer les instruments dans l'alcool
- 1 scalpel
- 1 pince
- 1 boîte de Petri stérile ou 1 soucoupe stérile
- 1 bec Bunsen ou 1 lampe à alcool
- si on part de graines : 1 spatule, 1 flacon de 100 ml, 1 tube à semis, 1 entonnoir, 1 papier filtre.

#### Solutions et produits :

- alcool à brûler
- eau de Javel
- eau déminéralisée
- hypochlorite de calcium (si on part de graines)

#### Plante :

- un plant de cactus désinfecté ou des graines

### 2 Préparation du plan de travail :

Avant de manipuler, se laver soigneusement les mains et les avant-bras au savon.

Nettoyer le plan de travail avec de l'eau de Javel.

Placer au centre le bec Bunsen ou la lampe à alcool.

Placer sur la droite (pour un droitier) un verre contenant de l'alcool dans lequel seront placés les instruments.

Devant le bec Bunsen, placer une boîte de Petri ou une soucoupe stérile dans laquelle sera découpée la plante.

Sur la gauche du bec Bunsen, placer le flacon contenant le milieu de culture.

### 3 Désinfection de la plante :

#### A partir d'un plant :

Prélever un morceau de cactus.

Le rincer à l'eau du robinet.

Le placer 5 minutes dans un mouillant composé d'une goutte de liquide vaisselle dans de l'eau.

Placer le environ 20 secondes dans de l'alcool à 70°.

Désinfecter ensuite par passage de 10 minutes dans l'eau de Javel.

Le plant étant désinfecté, les étapes suivantes doivent être réalisées en milieu stérile avec du matériel stérile. Pour stériliser les instruments, les placer dans l'alcool puis les flamber rapidement afin d'éliminer l'alcool. Répéter cette opération 2 à 3 fois avant chaque utilisation.

Rincer le plant par 4 bains de 5 minutes chacun dans l'eau distillée stérile.

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

#### A partir de graines :

Préparer la solution de désinfection de la façon suivante :

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

Pour désinfecter :

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

- 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

#### **4 Mise en culture sur le milieu de multiplication :**

##### **A partir d'un plant :**

A côté du bec Bunsen, déposer le plant désinfecté dans une boîte de Petri stérile ou sur une soucoupe stérile.

Découper des tranches à l'aide d'un scalpel stérile.

A l'aide de la pince stérile, les repiquer sur le milieu de multiplication.

Flamber l'encolure du pot et le reboucher.

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 flacons matin et soir avec des lampes de type lumière du jour.

#### **5 Repiquage sur le milieu d'enracinement :**

##### **A partir d'un plant :**

Récupérer les plants et les repiquer sur le milieu d'enracinement préparé comme le milieu de multiplication. Pensez toujours à bien respecter les conditions de travail en milieu stérile.

##### **A partir de graines :**

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.

A l'aide de cette spatule, prélever les graines et les étaler rapidement sur le milieu de culture (2).

Flamber l'encolure du pot avant de le refermer.

### **TRANSFERT EN TERRE**

Quand les racines se sont bien développées, les cactus peuvent être transférés en serre et le travail en conditions stériles n'est plus nécessaire.

Préparer un substrat à base de sable adapté à vos cactus et le placer dans des petits pots.

Repiquer les cactus (bien rincer les racines avant afin d'éliminer toute trace de gélose).

Arroser.

Placer ces pots dans une mini-serre et la maintenir fermée une quinzaine de jours.

Au bout de ces 15 jours, vous pouvez entrouvrir progressivement la serre afin d'habituer la plante à passer d'une atmosphère humide à une atmosphère plus sèche.