



CLIVIA

CULTURE *in vitro* DE LA CAROTTE

La carotte, légume racine, se cultive *in vitro* d'une façon un peu différente des autres plants. En effet, c'est une plante riche en phytohormones naturelles et de ce fait, quand on la cultive *in vitro*, il est nécessaire de passer par le stade de cal afin de diminuer ce taux intrinsèque. Ensuite, on peut la repiquer sur différents milieux pour obtenir soit une multiplication soit un enracinement. Il s'agit d'un exemple d'embryogenèse somatique.

PRINCIPE GENERAL

Des graines de carotte sont mises à germer dans du terreau. Les jeunes pousses sont prélevées, désinfectées et mises en culture sur un premier milieu permettant la formation de cal au bout d'environ 1 mois .

Les cals sont ensuite repiqués sur un milieu permettant leur différenciation en une touffe de plants de carottes au bout de 6 à 8 semaines.

Quand on laisse vieillir les plants, ils finissent par s'enraciner.

GERMINATION DES GRAINES DE CAROTTE

Préparer des bacs de germination contenant du terreau pour repiquage de jeunes plants, arroser et verser les graines de carotte.

Placer l'ensemble à la lumière du jour.

Penser à toujours humidifier.

Attendre un à deux mois pour que les plantules aient assez poussé.

PREPARATION DU MATERIEL ET DES MILIEUX

1 Matériel nécessaire :

- eau distillée
- eau de Javel (de type Javel Plus)
- alcool à brûler
- bec Bunsen ou une lampe à alcool
- marmite à pression ou autoclave
- six bocal pour la désinfection des plantules

2 Préparation du milieu :

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

Faites 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.

Répartissez le milieu dans les flacons qui serviront pour la culture.

Fermez 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 posez les flacons dans le panier. Stérilisez 30 mn à partir du sifflement de la soupape en maintenant la pression au maximum ou à l'autoclave (25 mn à 115°C).

A la fin du temps de stérilisation, laissez refroidir sans enlever la soupape (ce qui ferait sauter les bouchons).
Sortez les flacons encore chauds et posez les en position verticale afin qu'ils puissent refroidir et se solidifier (prévoir environ 3 heures).

Prévoyez également de stériliser l'eau distillée servant à la désinfection de la plante (4 bocaux par groupe). Le temps de stérilisation peut dans ce cas être un peu plus long.
Avec l'eau, vous pouvez également stériliser les instruments (pinces, scalpels, ciseaux ...) après les avoir enveloppés dans du papier aluminium.

MISE EN CULTURE SUR LE PREMIER MILIEU

1 Matériel et produits nécessaires par groupe :

Matériel :

- 2 bocaux pour la désinfection
- 1 verre pour placer les instruments dans l'alcool
- 1 paire de ciseaux
- 1 pince
- 1 boîte de Petri stérile ou 1 soucoupe stérile
- 1 bec Bunsen ou 1 lampe à alcool

Solutions :

- liquide vaisselle
- alcool à brûler
- eau de Javel de type « Javel plus » diluée selon les conseils du fabricant
- 4 bocaux d'eau distillée stérile

Plante :

- plantules de carotte.

2 Préparation du plan de travail :

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

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

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

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

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

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

A proximité, placez les bocaux servant à la désinfection.

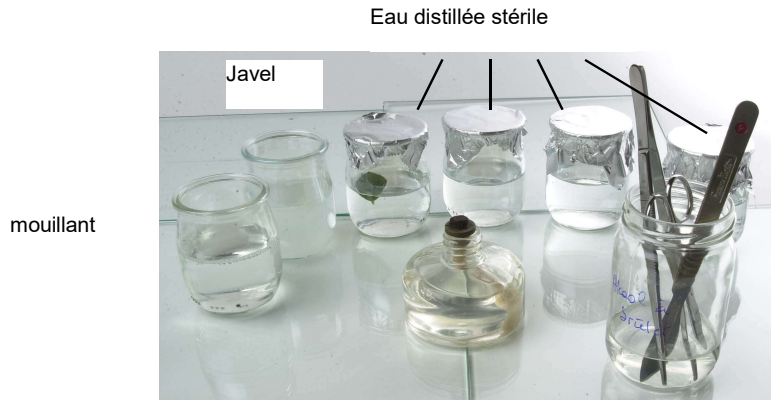
3 Désinfection de la plante :

Prélevez les plantules dans le terreau.

Rincez les à l'eau du robinet afin d'enlever la terre et la poussière.

Par groupe d'élève, placez au moins 3 plantules dans un mouillant composé d'une goutte de liquide vaisselle dans de l'eau.

Désinfectez ensuite par passage de 8 minutes dans l'eau de Javel de type « Javel plus ». (attention à bien respecter ce temps !).



La plantule étant désinfectée, les étapes suivantes doivent être réalisées en milieu stérile avec du matériel stérile. Pour stériliser les instruments, placez les dans l'alcool puis flambez les rapidement afin d'éliminer l'alcool. Répétez cette opération 3 fois et reflamber les instruments au moins 1 fois avant chaque utilisation.

Rincez les plantules par 4 bains de 5 mn 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.

4 Mise en culture :

Dans la boîte de Petri ou la soucoupe stérile, coupez des tronçons d'hypocotyles d'environ 0,5 cm de long.

Ouvrir un flacon de milieu pour cals à côté du bec Bunsen.
Placez un tronçon à la surface du milieu de culture.
Flambez l'encolure du flacon et le reboucher.

Placez les flacons 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 Evolution :

Au bout d'environ 1 mois, on verra apparaître un cal (masse de cellules indifférenciées). Ces cals pourront alors être repiqués sur le deuxième milieu.

MISE EN CULTURE SUR LE DEUXIEME MILIEU

Préparer le milieu de culture de la même façon que pour le premier milieu.
Prélever un fragment de cal et le repiquer sur le milieu 2 en procédant comme précédemment décrit.
Au bout de 6 à 8 semaines, les cals se seront différenciés en une touffe de carotte.
Quand on laisse ces carottes en culture, elles finissent par s'enraciner sur ce même milieu.

PLANNING DE LA MANIPULATION

