



**CLIVIA**

## **CULTURE *in vitro* DE L'ŒILLET**

L'œillet (*Dianthus*), plante de la famille des Caryophyllaceae est un modèle de choix pour l'étude de la mise en culture de méristèmes. Une manipulation plus simple peut également être réalisée à partir de cette plante afin de montrer le rôle des régulateurs de croissance (ou phytohormones) dans les milieux de culture.

### **PRINCIPE GENERAL**

Des graines d'œillet sont mises à germer dans du terreau. Les jeunes pousses sont prélevées, désinfectées et mises en culture sur trois milieux permettant soit la multiplication des plants, soit la formation de cals, soit leur enracinement.

La composition de base des milieux est la même dans les trois cas et la différence ne porte que sur la composition en phytohormones.

Au bout de quatre à six semaines, on peut observer les différents résultats.

Les plants enracinés peuvent éventuellement être transférés en serre pour la phase d'acclimatation.

### **GERMINATION DES GRAINES D'ŒILLET**

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

Placer l'ensemble à la lumière du jour.

Penser à toujours humidifier et éventuellement, ajouter un peu d'engrais.

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 pousses

#### **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

### 1 Matériel et produits nécessaires par groupe :

#### Matériel :

- 2 bocaux pour la désinfection
- 1 verre pour placer les instruments dans l'alcool
- 1 scalpel ou 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 :

- 3 plantules d'œillet.

### 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.



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.

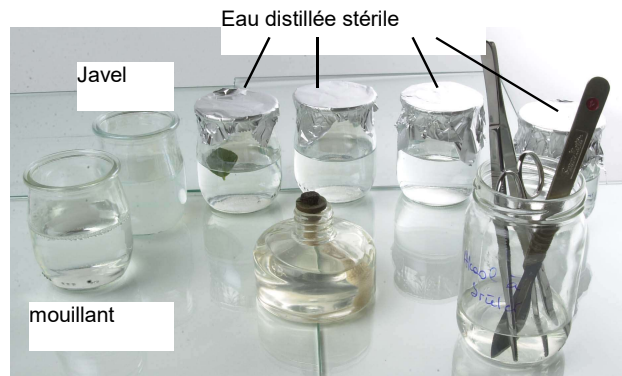
Sur la gauche du bec Bunsen, placez le flacon contenant le milieu de culture.

Derrière le bec Bunsen, 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 !).

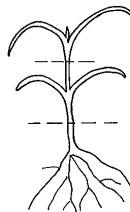
La plantule étant désinfectée, les étapes suivantes doivent être réalisées en milieu stérile avec du matériel stérile. Pour stériliser les instruments, placez les dans l'alcool puis flambez les rapidement afin d'éliminer l'alcool. Répétez cette opération 2 à 3 fois avant chaque utilisation.

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 l'extrémité de la plantule juste en dessous des dernières feuilles.



Ouvrir un flacon (OE1, OE2 ou OE3) à côté du bec Bunsen.

Repiquez la bouture en la piquant à l'intérieur de la gélose (comme si on repiquait une plante en terre).

Flambez l'encolure du flacon et le reboucher.

Répétez la même opération pour les 3 milieux.

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 de 4 à 6 semaines, la plantule va se multiplier sur le milieu OE1, former un cal sur le milieu OE2 et s'enraciner sur le milieu OE3.

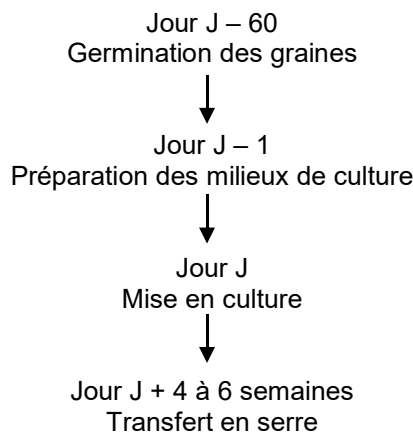
Les plants enracinés peuvent être repiqués en terre et sous serre pour la phase d'acclimatation.

## TRANSFERT EN SERRE :

Stérilisez du terreau pour repiquage de jeunes plants en procédant comme pour l'eau distillée.  
Placez ce terreau dans des petits pots et repiquez les plantules enracinées.  
Placez les pots en serre.  
Bien arroser.

Pour l'acclimatation, laissez la serre fermée environ 15 jours puis ouvrez la petit à petit en surveillant que la plante ne se dessèche pas.  
Quand la plantule est suffisamment vigoureuse, on peut retirer le couvercle de la serre.  
On peut éventuellement vaporiser les plantules avec un insecticide et un fongicide.

## PLANNING DE LA MANIPULATION



## COMPOSITION DES MILIEUX DE CULTURE

### Milieu OE1 :

Base MS400/2  
Thiamine : 0.1 mg/l  
**6 BA : 0.5 mg/l**  
Saccharose : 20 g/l  
Gélose : 7 g/l

### Milieu OE2 :

Base MS400/2  
Thiamine : 0.1 mg/l  
**kinétine : 1 mg/l**  
**2.4 D : 1 mg/l**  
Saccharose : 20 g/l  
Gélose : 7 g/l

### Milieu OE3 :

Base MS400/2  
Thiamine : 0.1 mg/l  
**ANA : 0.1 mg/l**  
Saccharose : 20 g/l  
Gélose : 7 g/l