



CLIVIA

MULTIPLICATION *in vitro* DE LA POMME DE TERRE

Après la guerre de 1945, la variété de pomme de terre appelée Belle de Fontenay n'était pratiquement plus cultivée du fait de la petite taille de ses tubercules. Ceci était dû en partie à la présence d'un virus. La culture de méristèmes a permis, grâce à deux chercheurs français Morel et Martin (1954) de sauver cette variété et de réobtenir des tubercules de taille normale.

Outre cet aspect de la culture *in vitro* dans la guérison des plantes, on peut citer l'exemple du Viêt-Nam. Du fait de la dépendance de ce pays vis à vis des pays à climat tempéré pour son approvisionnement en semences, le pays devait trouver d'urgence une solution d'autonomie. La culture *in vitro*, par sa capacité à multiplier des plants génétiquement intéressants sur la plan agronomique, répond à cet impératif. Ainsi, au bout de 8 mois et à partir d'un seul vitroplant, 10000 bourgeons apicaux et axillaires munis de racines sont prêts à être plantés à des fins d'exploitation commerciale. La récolte sera de 10 tonnes de pomme de terre en 1 an et pour couvrir 1 hectare, il suffira de 3 vitroplants.

PRINCIPE GENERAL

Des germes de pomme de terre sont prélevés, désinfectés et repiqués sur un milieu P1 permettant le développement d'une plantule. Cette plantule sera multipliée sur un milieu P2 puis les pousses obtenues seront transférées sur un milieu P3 permettant l'obtention de petits tubercules *in vitro*.

Remarque : il est conseillé de faire ce TP en mars-avril, période à laquelle on trouve facilement des pommes de terre germées.

PREPARATION DU MATERIEL ET DES MILIEUX

1 Matériel et produits nécessaires :

- une marmite à pression ou un autoclave
- éprouvettes pour mesurer l'eau
- Erlenmeyer ou ballon ... pour faire fondre le milieu de culture
- six bocal par groupe pour la désinfection des pousses
- flacons pour répartir les milieux
- un bec Bunsen ou une lampe à alcool
- pincettes
- scalpels ou ciseaux
- soucoupes stériles ou boîtes de Petri stériles
- eau distillée ou déminéralisée
- eau de Javel (de type Javel Plus)
- alcool à brûler

2 Préparation du milieu :

Versez la poudre dans un récipient et ajoutez 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, placez 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
- 1 pince
- 1 boîte de Petri stérile ou 1 soucoupe stérile
- 1 bec Bunsen ou 1 lampe à alcool

Solutions :

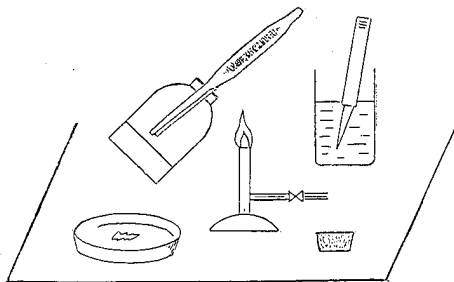
- liquide vaisselle
- alcool à brûler
- eau de Javel de type « Javel plus » diluée selon les conseils du fabricant
- 4 bocaux d'eau distillée stérile

Plante :

- tubercules de pomme de terre germés.

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.

Derrière le bec Bunsen, placez les bocaux servant à la désinfection.

3 Désinfection de la plante :

Prélevez un germe et rincez le à l'eau du robinet.



Placez le 5 minutes dans un mouillant composé d'une goutte de liquide vaisselle dans de l'eau. Désinfectez ensuite par passage de 15 minutes dans l'eau de Javel de type « Javel plus ».

Le germe étant désinfecté, 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 le germe 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 le germe au scalpel en section comprenant au moins un entrenœud.

Ouvrez un flacon P1 à côté du bec Bunsen.

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

Flambez l'encolure du flacon et rebouchez le.

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 Multiplication des vitroplants :

Au bout de 4 à 6 semaines, la plantule va pousser et former une tige.

En manipulant sur le plan de travail désinfecté et dans les mêmes conditions que pour la première étape, posez cette tige en position horizontale sur le milieu P2.

Au bout de 4 mois, on verra apparaître des mini-tubercules le long des plantules.

6 Tubérisation :

Quand les plants se sont suffisamment multipliés, repiquez chaque plantule obtenue sur le milieu P3 en position verticale. La manipulation se fera toujours dans les mêmes conditions que pour la première étape.

Au bout de 4 mois, on verra apparaître des mini-tubercules le long des plantules.

TRANSFERT EN TERRE

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 tubercules.

Bien arroser.

Chaque tubercule régénère en 8 jours environ (après qu'il ait germé) un plant qui pourra produire des tubercules de taille normale au bout de 3 mois environ.

PLANNING DE LA MANIPULATION

