



CLIVIA

MULTIPLICATION VEGETATIVE

IN VITRO DU SAINTPAULIA

La multiplication végétative *in vitro* du Saintpaulia est un exemple remarquable du phénomène de différenciation cellulaire caractéristique du monde végétal.

Partant d'un fragment de feuille saine, on peut obtenir des milliers de plantes identiques à la plante mère et ceci dans un temps très court et indépendamment des saisons.

Obtenir une telle multiplication de plantes à partir d'un fragment de feuille serait impossible avec les techniques classiques de multiplication des végétaux (bouturage en terre...) : la contamination par les bactéries du sol, les champignons et la nécrose détruiraient le fragment.

En revanche, dans des conditions aseptiques, on maîtrise complètement la multiplication de la plante puisque l'on connaît et au besoin on peut faire varier les conditions physiques (lumière, température...), la composition chimique du milieu et l'action des phytohormones.

C'est l'exemple d'une biotechnologie.

PRINCIPE GENERAL

Une feuille de Saintpaulia est désinfectée, rincée à l'eau déminéralisée stérile, découpée avec un scalpel (ou des ciseaux) et déposée sur le milieu de multiplication SP1.

Après environ 4 à 6 semaines, sous l'effet des phytohormones, on voit apparaître un grand nombre de microfeuilles de quelques millimètres. A ce stade, on peut diviser cette touffe en plusieurs petits plants et les remultiplier en les repiquant sur le milieu SP1 (micropropagation). Cette opération peut être répétée plusieurs fois.

Après la phase de multiplication, on peut diviser la touffe et repiquer les petites plantules sur le milieu d'enracinement SP2.

6 à 8 semaines plus tard, les plantules enracinées peuvent être transférées en serre pour la phase d'acclimatation.

PREPARATION DU MATERIEL ET DES MILIEUX

1 Matériel et produits nécessaires :

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

2 Préparation du milieu de culture :

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 pots qui serviront pour la culture.

Fermez les pots.

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 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 bocal 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.

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 diluée selon les conseils du fabricant
- 4 bocaux d'eau distillée stérile

Plante :

- un plant de Saintpaulia.

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.

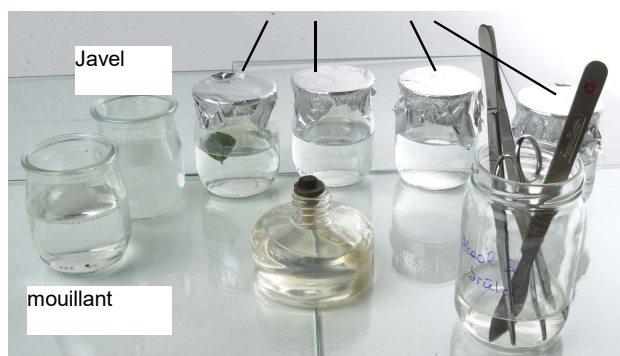
Derrière le bec Bunsen, placez les bocaux servant à la désinfection.

3 Désinfection de la plante :

Prélevez une feuille mature, c'est à dire située à la périphérie de la plante.

Rincez la à l'eau du robinet.

Eau distillée stérile



Placez la 5 minutes dans un mouillant composé d'une goutte de liquide vaisselle dans de l'eau. Désinfectez ensuite par passage de 12 minutes dans l'eau de Javel. La feuille 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 la feuille 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.

4 Mise en culture :

Dans la boîte de Petri ou la soucoupe stérile, coupez selon la taille de la feuille entre 1 et 6 carrés d'environ 1 cm de côté, de préférence à la base de la feuille. Ces carrés sont appelés explants. Ouvrez un pot de milieu SP1 à côté du bec Bunsen. Placez un explant dans le pot, face inférieure de la feuille en contact avec le milieu de culture. Flambez l'encolure du pot et le reboucher.

Placez 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.

MULTIPLICATION DES VITROPLANTS (étape facultative)

Au bout de 4 à 6 semaines, on voit de nombreuses touffes de Saintpaulia à la surface de l'explant. Ces touffes peuvent être divisées et chaque plantule isolée peut être repiquée sur le milieu SP1 pour obtenir une nouvelle multiplication.

Pour effectuer cette étape, posez la touffe sur une soucoupe ou une boîte de Petri stérile sur le plan de travail servant pour la manipulation et à l'aide d'un scalpel stérile, divisez la. Repiquez les plantules obtenues sur un milieu SP1.

PASSAGE SUR MILIEU D'ENRACINEMENT

Quand les plants se sont suffisamment multipliés, repiquez chaque plantule obtenue sur le milieu SP2.

1 Matériel nécessaire :

- bec Bunsen ou lampe à alcool
- scalpel
- pince
- boîte de Petri ou soucoupe stérile

2 Préparation du milieu SP2 :

Procédez comme pour le milieu SP1

3 Manipulation :

Placez le pot de milieu SP1 près de la flamme du bec Bunsen ou de la lampe à alcool près du plan de travail préparé comme indiqué auparavant.

Flambez l'encolure du pot de milieu SP1 et sortez délicatement la touffe avec la pince stérile et posez la dans la boîte de Petri stérile.

Isolez des plantules à l'aide du scalpel et repiquez les sur le milieu d'enracinement SP2.

Flambez l'encolure du pot et refermez.

4 Evolution :

Les plantules se développent et les racines se forment.

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

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.

Prélevez les plantules à partir des pots de milieu SP2 en faisant attention à ne pas casser les racines.

Éliminez la gélose qui adhère aux racines en les trempant dans de l'eau.

Repiquez les plantules enracinées dans les petits pots.

Arrosez.

Placez les pots dans une mini-serre.

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 le plant de Saintpaulia paraît suffisamment vigoureux, on peut le sortir de la serre.

Pendant cette phase d'acclimatation, on peut également appliquer des fongicides et insecticides.

PLANNING DE LA MANIPULATION

