



CLIVIA

MISE EN CULTURE DE MERISTEMES D'OEILLET

C'est dans les années 1950 que la découverte des propriétés du méristème, conjointement aux résultats obtenus sur la culture des tissus végétaux a donné un nouvel essor à la culture *in vitro*. Limasset et Cornuet ont observé en 1949 l'existence d'un gradient de contaminations diminuant quand on s'approche du méristème.

Le méristème est une petite masse de cellules indifférenciées, en multiplication, d'une dimension inférieure à 0.5 mm. Quel que soit l'état sanitaire de la plante, le méristème reste toujours indemne de virus.

L'œillet (*Dianthus*), plante de la famille des Caryophyllaceae est un modèle de choix pour l'étude de la mise en culture de méristèmes.

PRINCIPE GENERAL

Des méristèmes sont prélevés sur des plants d'œillet et mis en culture sur un milieu MOE coulé en boîtes de Petri (D. 55 mm). Au bout de quelques jours, les méristèmes se développent et forment des petites plantules. Ces plantules peuvent être multipliées (sur le milieu OE1) ou placées sur un milieu d'enracinement (OE3) permettant la régénération d'un plant indemne de virus.

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

PREPARATION DU MATERIEL ET DES MILIEUX

1 Matériel nécessaire :

- loupe binoculaire
- eau de Javel (de type Javel Plus)
- alcool à brûler
- bec Bunsen ou une lampe à alcool
- marmite à pression ou autoclave
- éprouvettes pour mesurer l'eau
- Erlenmeyer ou ballon ... pour faire fondre le milieu de culture
- pinces
- scalpels
- boîtes de Petri de diamètre 55 mm
- feuilles d'œillet (à demander chez un fleuriste ou acheter plants d'œillet à repiquer)

2 Préparation du milieu :

Verser la poudre dans un récipient qui servira pour la stérilisation et ajouter la quantité d'eau distillée correspondant au volume de la dose.

Si vous stérilisez à l'aide d'une marmite à pression, placer environ 2 litres d'eau au fond de la marmite et posez le récipient 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).

A la fin du temps de stérilisation, laissez refroidir sans enlever la soupape.

Sortez le récipient et coulez le milieu de culture dans les boîtes de Petri à raison d'environ 8 ml de milieu par boîte.

Laissez refroidir pour que le milieu se gélifie.

Avec le milieu de culture, vous pouvez également stériliser les instruments (pinces, scalpels ...) après les avoir enveloppés dans du papier aluminium.

MISE EN CULTURE

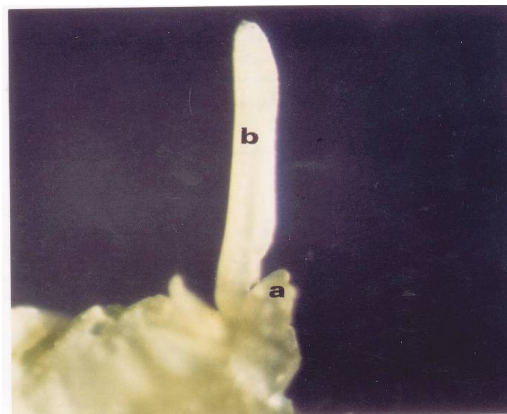
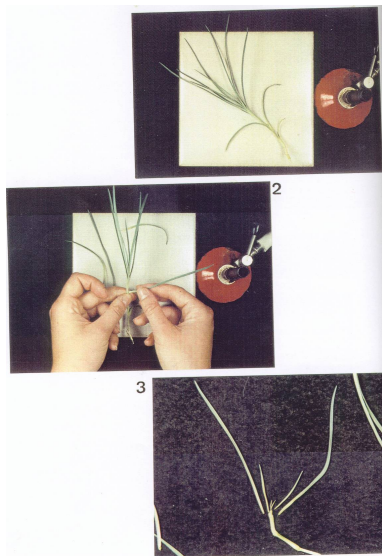
1 Préparation du plan de travail :

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 la loupe binoculaire.
Placez sur la droite le bec Bunsen ou la lampe à alcool.
Placez à côté un verre contenant de l'alcool dans lequel seront placés les instruments.
Devant le bec Bunsen, placez une boîte de Petri contenant le milieu de culture.

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.

2 Mise en culture :

Les méristèmes étant stériles, il n'est pas nécessaire de désinfecter la plante.
Sur les pieds mères retenus, choisir les boutures à l'extrémité des rameaux.



A l'œil nu, commencer à enlever délicatement les feuilles entourant le méristème. (photo n°2).
Quand elles deviennent très petites, placez vous sous la loupe binoculaire et continuez à enlever les feuilles à l'aide d'une épingle ou d'un microscalpel (éclat de lame de rasoir monté sur un manche d'oese).
Quand le méristème devient visible, enlevez les dernières ébauches de feuilles et le prélever en le sectionnant à sa base. (photo n° 4).
Repiquez le alors dans la boîte de Petri et placez la 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 boîtes matin et soir avec des lampes de type lumière du jour.

Cette manipulation doit être réalisée le plus rapidement possible afin d'éviter le dessèchement du méristème et le risque de contamination.
Les instruments utilisés doivent être stérilisés mais il faut faire très attention à ne pas brûler la plante.

3 Evolution :

Au bout de quelques jours, les méristèmes augmentent de volume puis verdissent. Ensuite, on observe le développement de petites feuilles

Les plantules peuvent être repiquées au bout d'environ 1 semaine sur les milieux de culture pour œillet. Il existe trois milieux différents permettant d'obtenir soit une multiplication (OE1), soit un cal (OE2), soit un enracinement (OE3).

Les plants enracinés pourront 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 y repiquer les plantules enracinées.

Placez les pots en serre.

Arrosez.

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.