



CULTURE *in vitro* DU MURIER

Les mûriers, tout comme les framboisiers, sont souvent atteints de maladies virales et bactériennes. La culture *in vitro* de méristèmes est un moyen d'assainissement des plants malades.

Prélevés aseptiquement sous la loupe, les méristèmes comportent généralement une ou deux feuilles préformées (primordia). D'une taille de 0.2 à 0.5 mm, ils ont la qualité essentielle d'être exempts de microorganismes pathogènes (bactéries et virus) et de pouvoir régénérer une plante entière saine. L'obtention de plants à partir de méristèmes est une opération délicate qui nécessite souvent une préparation préalable des plants.

Les plants régénérés sont ensuite contrôlés afin de vérifier leur bon état sanitaire puis multiplier par culture *in vitro*. C'est cette étape de multiplication qui sera réalisée dans un premier temps dans ce TP et ensuite, on procédera à l'enracinement des plants.

PRINCIPE GENERAL

A partir d'une touffe de mûrier provenant d'une culture *in vitro*, on isole des plantules que l'on repique sur un milieu de multiplication M1. Quand la touffe s'est reformée, on peut soit remultiplier la plante, soit repiquer les plantules isolées sur un milieu d'enracinement M2.

Les plants enracinés peuvent être transférés en terre dans une mini-serre pour la phase d'acclimatation.

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
- flacons pour répartir les milieux
- un bec Bunsen ou une lampe à alcool
- pinces
- scalpels ou ciseaux
- soucoupes stériles ou boîtes de Petri stériles
- alcool à brûler

2 Préparation du milieu :

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

Faire 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.

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

Fermer 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 poser les flacons 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 ou 20 mn à 120°C).

A la fin du temps de stérilisation, laisser refroidir sans enlever la soupape (ce qui ferait sauter les bouchons).

Sortir les flacons encore chauds et les poser en position verticale afin qu'ils puissent refroidir et se solidifier (prévoir environ 3 heures).

Avec les milieux de culture, 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 :

- 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 :

- alcool à brûler

Plante :

- un plant de mûrier pour environ 4 groupes

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.

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

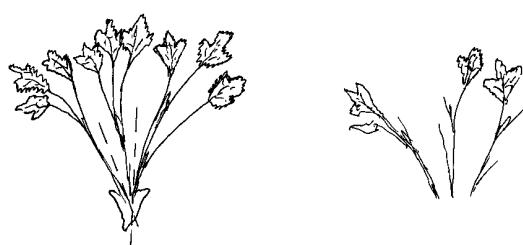
Placer sur la droite (pour un droitier) un verre contenant de l'alcool dans lequel seront placés les instruments.

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

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

3 Mise en culture sur le milieu de multiplication M1 :

A côté du bec Bunsen, ouvrir le pot contenant le plant de mûrier et poser la touffe dans la boîte de Petri stérile ou sur la soucoupe stérile.



Séparer la touffe et isoler les plantules à l'aide d'un scalpel stéril.

A l'aide de la pince stérile, repiquer chaque plantule sur le milieu de multiplication M1 (comme si on repiquait une plante en terre).
Flamber l'encolure du flacon et le reboucher.

Placer 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.

4 Repiquage sur le milieu d'enracinement M2 :

Procéder exactement comme pour la première étape mais dans ce cas, les plantules isolées sont repiquées sur le milieu d'enracinement M2.

TRANSFERT EN TERRE

Quand les racines se sont bien développées, les mûriers peuvent être transférés en serre et le travail en conditions stériles n'est plus nécessaire.

Stériliser du terreau pour repiquage de jeunes plants à la marmite à pression en procédant comme pour les milieux de culture.

Placer ce terreau dans des petits pots et y repiquer les mûriers (bien rincer les racines avant afin d'éliminer toute trace de gélose).

Bien arroser.

Placer ces pots dans une mini-serre et la maintenir fermée une quinzaine de jours.

Au bout de ces 15 jours, vous pouvez entrouvrir progressivement la serre afin d'habituer la plante à passer d'une atmosphère humide à une atmosphère plus sèche.

PLANNING DE LA MANIPULATION

