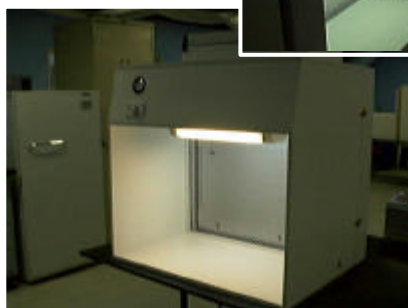


Micropropagation pour l'entreprise serricole

Cahier de références techniques



CENTRE D'INFORMATION
ET DE DÉVELOPPEMENT EXPÉRIMENTAL
EN SERRICULTURE

Édition 1999

Table des matières

1. Introduction	5
2. Les phases de la micropropagation	6
2.1 Stade 0 : Conditionnement des plants mères	6
2.2 Stade 1 : Établissement d'une culture aseptique : Durée 6 à 8 semaines	6
2.3 Stade 2 : La multiplication des tiges : Durée 4 à 5 semaines.	7
2.4 Stade 3 : La rhizogénèse (enracinement) : Durée 2 à 4 semaines	8
2.5 Stade 4 : L'acclimatation : Durée 3 à 4 semaines	8
3. La préparation d'un milieu de culture	9
3.1 Solution-mères de macro et micro-éléments, fer et vitamines pour le milieu MS	9
3.2 Régulateurs de croissance	11
3.3 Volume des solution-mères	12
3.4 Préparation du milieu MS pour un volume de 1 000 ml	14
3.5 Préparation du milieu MS pour un volume de 500 ml	14
3.6 Préparation du milieu MS avec sachet commercial	15
3.7 La stérilisation	17
3.7.1 Stérilisation à l'autocuiseur	18
3.8 Matériel et équipement requis	19
4. Les constituants des milieux nutritifs	21
4.1 Les sels minéraux	21
4.2 Les vitamines	21
4.3 Les régulateurs de croissance	21
4.3.1 Les auxines	22
4.3.2 Les cytokinines	23
4.3.3 Les gibberellines	23
4.3.4 Balance hormonale vs réponse physiologique	24
4.3.5 Nomenclature	24
4.4 Les sucres	26
4.5 Les géloses	26
4.5.1 Agar-agar	26
4.5.2 Gels synthétiques (Substituts d'agar)	27
4.6 Charbon activé	27
4.7 Les composés organiques divers	28
4.8 Les produits antibiotiques ou antiseptiques	28

5. Les contenants	30
5.1 Pots de bébé	30
5.2 Pots à conserve (Mason)	30
5.3 Pots de boucher	31
6. Préparation des solutions stérilisantes	32
6.1 Préparation d'une solution de javel	33
6.2 Préparation de l'alcool 70 %	33
6.3 Préparation d'une solution anti-oxydante	34
7. Stérilisation de la hotte	34
8. Manipulations des végétaux sous la hotte	34
8.1 Matériel requis	34
8.2 Stérilisation des végétaux	35
8.3 Conditions et difficultés de l'asepsie	36
8.4 Les infections et quelques unes de leurs causes:	37
9. Inventaire global du matériel et des équipements	39
10. Glossaire des termes	43

1. Introduction

La culture *in vitro* est un terme très général pour désigner la culture de cellules ou de tissus qui se développent dans un milieu nutritif en conditions d'asepsie pour une période de temps indéfinie. Les trois principaux champs d'action de la culture *in vitro* concernent :

- la culture de cellules individuelles ou de protoplastes;
- la culture de tissus ou d'organes;
- la culture de plantes entières.

La micropropagation s'inscrit dans ce dernier champ d'activités et a pour principal objectif la multiplication de clones à grande échelle. Elle consiste à multiplier un individu donné à partir d'un fragment de végétal placé sur un milieu nutritif en conditions aseptiques. La base biologique de la méthode est le développement de bourgeons préexistants sur les fragments de plantes mis en culture, ou l'induction de nouveaux bourgeons dits « adventifs » (néoformation) sur les explants.

2. Les phases de la micropropagation

Voici globalement les cinq stades de la micropropagation :

0. Conditionnement des plants mères;
1. Établissement (ou initiation) d'une culture aseptique;
2. Multiplication des tiges;
3. Rhizogénèse (ou enracinement des tiges);
4. Acclimatation des plantules.

2.1 *Stade 0 : Conditionnement des plants mères*

Dans la description de cette technique on passe souvent sous silence le stade 0 qui contribue pourtant pour beaucoup au succès des stades suivants. Ce stade 0 réfère au conditionnement du plant mère. En effet, le plant mère devrait être dépourvu de carences minérales et en pleine turgescence donc sans stress hydrique important. Au mieux et dans presque tous les cas, le plant devrait être en croissance active, donc mis en culture en dehors de sa période de dormance. Ceci limite dans le calendrier de production, les dates préférables de mises en culture pour le stade d'initiation. Mais, une fois *in vitro*, ces plants pourront être multipliés à l'année longue. Aussi les plants mères choisis le seront en fonction de leur état sanitaire. Des plants infestés d'insectes peuvent apporter des problèmes de taille à toute une chambre de culture. A titre d'exemple, les œufs de thrips qui se logent dans les interstices des bourgeons résisteront à la stérilisation de surface des apex. Par la suite, des conditions favorables permettront leur éclosion. Les larves et les adultes particulièrement se déplaceront d'un tube à l'autre en quête de nourriture. Ces insectes sont suffisamment petits pour se glisser sous les bouchons et pénétrer dans les tubes. On peut soupçonner leur visite lorsque des moisissures envahissent les contenants longtemps après la mise en culture.

2.2 *Stade 1 : Établissement d'une culture aseptique : Durée 6 à 8 semaines*

La littérature fournit souvent les premières informations essentielles au départ d'une culture. On trouve dans les livres ou revues spécialisés le détail des formulations (recettes) de milieux nutritifs convenant à de très nombreuses espèces végétales. Généralement les auteurs précisent aussi le protocole de désinfection de surface des explants ainsi qu'une description de l'explant mis en culture. Ce stade est de première importance puisqu'il comporte de nombreux facteurs critiques :

- Le choix du plant mère;
- Le choix du fragment végétal à mettre en culture;
- Une stérilisation de surface adéquate garantissant la survie de l'explant tout en assurant l'asepsie;
- La découpe de l'explant et sa position sur la gélose;

- Le choix du milieu de culture qu'il est parfois nécessaire d'ajuster légèrement par la suite suivant la réponse de l'explant;
- La qualité du travail en asepsie de la technicienne ou du technicien.

Dans plus de 50 % des cas, les premiers essais de mise en culture sont très satisfaisants et demandent très peu ou pas d'ajustements. Pour certains autres cas, la difficulté réside dans la désinfection des végétaux, pour d'autres dans l'ajustement de l'équilibre hormonal. Mais selon tous les auteurs, théoriquement tous les végétaux quels que soient leur espèce ou leur cultivar, peuvent être cultivés *in vitro*.

Les explants les plus aptes à entreprendre une multiplication sont généralement riches en bourgeons ou en zones méristématiques potentielles. Ils varient selon les espèces :

- Les feuilles (ex. Ficus, Saintpaulia, Bégonia...);
- Les tiges (asperge, colza...);
- Les bourgeons (fraisier, vigne, lilas, bleuet...);
- Inflorescences (chou-fleur, gerbera, hosta, poireau ...).

La multiplication à partir de la croissance de bourgeons axillaires offre les meilleures chances de conserver les caractéristiques de l'espèce ou de la variété. En effet, cette technique ne fait qu'accélérer le fonctionnement normal des méristèmes de bourgeons déjà présents sur la plante. Par contre, on diminue les chances d'une stabilité génétique en provoquant l'apparition de bourgeons nouveaux (la plupart du temps à partir d'un cal, en des endroits inhabituels tels les feuilles, les tiges, les racines).

2.3 Stade 2 : La multiplication des tiges : Durée 4 à 5 semaines.

Cette étape s'effectue au repiquage des plantules obtenues au stade précédent. On veut ici accroître le nombre de plants d'un facteur de 4 à 5 à chaque cycle chez les ligneux, et d'un facteur de 4 à 12 chez les herbacées.

Le milieu nutritif utilisé est souvent identique à celui du premier, bien qu'une différence parfois mineure s'observe dans la balance hormonale (équilibre auxine-cytokinine). Au stade de la multiplication, les cytokinines sont généralement présentes en plus grande concentration dans le milieu que les auxines. Ceci s'explique d'un point de vue physiologique par le fait que les cytokinines s'opposent à la dominance apicale donc stimulent la croissance de nouvelles tiges. Encore une fois, la littérature fournit généralement les informations nécessaires nous permettant de fixer notre choix sur une formulation appropriée.

La vitesse de croissance des plantes *in vitro* se module à celle *in situ*. Si l'espèce mise en culture est à croissance lente, on peut s'attendre à observer une croissance lente dans les tubes.

2.4 Stade 3 : La rhizogénèse (enracinement) : Durée 2 à 4 semaines

Cette étape se caractérise par la naissance de racines sur les tiges feuillées obtenues au stade de la multiplication. Il arrive parfois que des espèces présentent un système racinaire plus ou moins développé au stade de la multiplication. Dans ce cas, il serait avantageux de faire des essais pour le passage immédiat en acclimatation. On économise ainsi temps et argent s'il nous est possible de passer outre cette étape (ex. Bégonia, Saintpaulia, fougère). Toutefois, si ce stade s'avère nécessaire, le milieu de culture varie quelque peu des milieux précédents. Les sels minéraux et les vitamines demeurent généralement les mêmes. Mais dans le cas du rosier par exemple, on suggère de diminuer la concentration des sels minéraux de moitié.

La différence majeure se situe principalement au niveau de l'équilibre hormonal qui se fera cette fois en faveur des auxines. Des tiges très feuillées et bien pourvues de bourgeons s'enracineront assez facilement dans un milieu dépourvu de régulateurs de croissance. Les jeunes feuilles et les bourgeons sont des sites naturels de production d'auxine et à l'image des boutures traditionnelles, ces jeunes plantules sauront s'enraciner d'elles-mêmes. Par contre, certaines espèces exigent l'apport d'auxines afin de stimuler l'initiation de leurs racines. Cet auxine est souvent fourni sous forme d'AIA.

2.5 Stade 4 : L'acclimatation : Durée 3 à 4 semaines

Il s'agit de la dernière étape qui consiste à adapter progressivement les microplantules aux conditions qui prévalent dans la serre ou à l'extérieur. Après avoir éliminé la gélose de la base des plants, ils sont transférés dans un substrat horticole. Les parties aériennes sont ensuite recouvertes de manière à les maintenir dans un environnement qui avoisine les 100 % d'humidité relative. Les stomates de ces jeunes feuilles cultivées *in vitro* demeurent constamment ouverts et laissent donc s'échapper l'eau de transpiration de manière continue. Les risques de dessèchement sont très élevés. Aussi doit-on attendre la croissance de nouvelles feuilles fonctionnelles avant d'enlever progressivement la pellicule de recouvrement.

3. La préparation d'un milieu de culture

Un milieu de culture est constitué principalement d'eau, de sels minéraux (macro-éléments, micro-éléments, fer), d'éléments organiques (vitamines, sucre, parfois des acides aminés, etc) de « phytohormones » ou de régulateurs de croissance. Cette solution aqueuse est souvent solidifiée au moyen d'agar (substance extraite des algues marines que l'on appelle *agar-agar* ou *gélose*). La gélose est facilement dissoute à 100°C, on doit donc atteindre le point d'ébullition afin de l'incorporer au milieu de manière uniforme, c'est pourquoi l'on parle de la « cuisson » des milieux.

Certains composés comme les micro-éléments ou oligo-éléments (B, Mn, Zn, Cu, Ni, Co, Mo, Al, I, Fe), certaines vitamines et régulateurs de croissance sont requis en si petite quantité qu'il est impossible de les peser. On doit donc les concentrer préalablement sous forme de solutions-mères. Par la suite, on pourra puiser à même ces solutions-mères la quantité requise d'agent actif pour chacune des formulations de milieu recommandé. Comme il peut être long et fastidieux de peser les produits nécessaires à chaque fois que l'on fait un milieu, on utilise couramment des solutions où tous les ingrédients sont incorporés.

3.1 Solution-mères de macro et micro-éléments, fer et vitamines pour le milieu MS

Macro-éléments (MS) - (20 X , tableau 1 : Milieu MS)

- ❑ Verser approximativement 600 ml d'eau distillée déionisée (DDH₂O) dans un bécher de 1 litre.
- ❑ Peser et dissoudre chacun des sels indiqués en chauffant légèrement au besoin.
- ❑ Transférer la solution à un flacon volumétrique de 1 litre et compléter à 1 litre avec DDH₂O.
- ❑ Transférer dans un contenant hermétique. Identifier puis ranger au réfrigérateur.
- ❑ Au besoin, pipetter 50 ml de cette solution pour 1 litre de milieu MS.

N.B. : Ne jamais pipetter directement dans le flacon de solution-mère. Verser la quantité approximative dans un bécher, en pipetter la quantité désirée ; le reste du bécher est rejeté dans un contenant à rebut.

Micro-éléments (MS) (100 X, voir tableau 1 : Milieu MS)

- ❑ Verser approximativement 600 ml de DDH₂O dans un bécher de 1 litre.
- ❑ Peser et dissoudre chacun des sels indiqués.
- ❑ Transférer la solution à un flacon volumétrique de 1 litre et compléter à 1 litre avec DDH₂O.
- ❑ Transférer dans un contenant hermétique. Identifier puis ranger au réfrigérateur.

- Au besoin, pipetter 10 ml de cette solution pour 1 litre de milieu MS.

Fer (MS) (100X, voir tableau 1 : Milieu MS)

- Verser approximativement 600 ml de DDH₂O dans un bécher de 1 litre.
- Ajouter quelques gouttes de NaOH (1N) et chauffer jusqu'à ébullition.
- Couper la source de chaleur.
- Ajouter le Na₂EDTA et mélanger jusqu'à dissolution.
- Ajouter lentement le FeSO₄-7 H₂O, et mélanger jusqu'à dissolution.
- Transférer la solution à un flacon volumétrique de 1 litre et compléter à 1 litre avec DDH₂O.
- Ranger dans un contenant ambré (ou recouvert d'un papier d'aluminium), identifier puis conserver à température de la pièce.
- Au besoin, pipetter 10 ml de cette solution-mère de fer pour 1 litre de milieu MS.

Vitamines (MS) (10 X, voir tableau 1 : Milieu MS)

- Verser approximativement 70 ml de DDH₂O dans un bécher de 100 ml.
- Peser et dissoudre chacune des vitamines indiquées.
- Transférer la solution à un flacon volumétrique de 100 ml et compléter à 100 ml avec DDH₂O.
- Ranger au réfrigérateur dans un contenant hermétique et bien identifié.
- Au besoin, pipetter 10 ml de cette solution pour la préparation d'un litre de milieu MS.

NOTE : En raison de leur sensibilité à la chaleur, les vitamines peuvent être ajoutées au reste du milieu MS autoclavé. Dans ce cas, les 10 ml de solution-mère de vitamines seront stérilisés mécaniquement à l'aide de filtres micropores puis ajoutés, en conditions aseptiques, au litre de milieu MS avant gélification.

Conservation : maximum 4 semaines.

Tableau 1 : Milieu MS

Constituant	Solution mère (mg par litre)	Volume à ajouter (ml par litre)	Concentration finale (mg par litre)
Macro-éléments 20X		50 ml	
NH ₄ NO ₃	33 000		1 650
KNO ₃	38 000		1 900
CaCl ₂ - 2 H ₂ O	8 800		440
MgSO ₄ - 7 H ₂ O	7 400		370
KH ₂ PO ₄	3 400		170
Micro-éléments 100X		10 ml	

MnSO ₄ - H ₂ O	2 230	22.3
ZnSO ₄ - 7 H ₂ O	860	8.6
H ₃ BO ₃	620	6.2
KI	83	0.83
Na ₂ MoO ₄ - 2 H ₂ O	25	0.25
CuSO ₄ - 5 H ₂ O	2.5	0.025
CoCl ₂ - 6 H ₂ O	2.5	0.025
Fer 100 X		10 ml
Na ₂ EDTA	3 730	37.3
FeSO ₄ - 7 H ₂ O	2 780	27.8
Acides aminée et vitamines 10 X		10 ml
Glycine	20 mg pour 100 L	2.0
Ac. Nicotinique	5 mg pour 100 L	0.5
Pyridoxine – HCl	5 mg pour 100 L	0.5
Thiamine – HCl	1 mg pour 100 L	0.1
Sucres		
Myo-inositol		100
Sucrose		30 000
Agar		10 000

3.2 Régulateurs de croissance

Les régulateurs de croissance utilisés varieront selon l'essai envisagé. Notons ici que chaque espèce végétale (voire même variété) peut exiger une combinaison particulière de régulateurs de croissance. Ainsi, chez une même espèce ou variété, cette combinaison diffère selon la réponse attendue qu'il s'agisse par exemple de multiplication de tiges, rhizogénèse ou autre. Suivant la littérature et l'essai envisagé, les types et les quantités de régulateurs seront déterminés. Ces composés, contrairement aux éléments nutritifs et aux vitamines, ne sont pas solubles dans l'eau. **Ils doivent donc être préalablement solubilisés dans un solvant approprié.**

Si les quantités requises par litre de milieu à réaliser dépasse 2 mg, on peut simplement peser et dissoudre le régulateur dans le solvant approprié et l'ajouter au reste du milieu.

Si la quantité désirée est inférieure à 2 mg, il est conseillé pour plus de précision de procéder à la fabrication d'une solution-mère.

Ainsi, on peut concentrer 10, 100 ou 1 000 fois le composé requis dans un volume de 100 ml ou 1 000 ml.

Préparation des solutions-mères de régulateurs de croissance :

- Peser le régulateur de croissance désiré et le dissoudre dans quelques gouttes du solvant approprié.

- ❑ *Étendre avec un peu d'eau, vérifier l'état de dissolution et ajouter un peu de solvant au besoin.*
- ❑ *Rincer la nacelle une fois ou deux à l'aide du solvant recommandé.*
- ❑ *Compléter au volume prévu dans un flacon volumétrique avec DDH₂O.*
- ❑ *Transférer dans un flacon hermétique (identifié) et ranger au réfrigérateur*

Conservation : Pour l'AIA, c'est quelques jours et pour les autres 4 semaines au maximum.

Rangement : Réfrigérateur (4 à 5° C) ou congélateur.

Plusieurs régulateurs de croissance sont dégradés par la lumière en solution aqueuse. Plusieurs sont dégradés par la chaleur, mais certains sont stables à 120°C (ANA, 2-4-D, Kin, BAP, Zéa). La gibbérelline et l'AIA sont trop instables pour être conservés de manière routinière; ne préparer que la quantité requise au moment de l'utilisation.

Tableau 2 :Types de régulateurs de croissance et leur solubilité

Régulateurs		Solvants
1. Auxines	2-4-D	EtOH ou 1N NaOH
	AIA	EtOH ou 1N NaOH
	AIB	EtOH ou 1N NaOH
	ANA	1N NaOH
2. Cytokinines	Adénine	1.0 HCl ou NaOH
	Adénine sulfate	NaOH ou HCl
	BAP	EtOH ou NaOH
	BA	1N NaOH
	2iP	1N NaOH
	Kinéline	1N NaOH
	Thidiazuron	DMSO
3. Gibberellines	Zéatine	1N NaOH
	GA ₃	EtOH

3.3 Volume des solution-mères

Dans la pesée de produits demandant de très faible quantité, on peut parfois contourner le besoin d'une balance de précision à 0.001g en utilisant une balance moins précise par exemple à 0.001g ou 0.01 g. Il s'agit alors de préparer une solution-mère du produit en pesant une plus grande quantité et en opérant des dilutions.

Par exemple vous avez besoin de 0.1 mg

- Solution-mère no.1

- Peser 1 gramme du produit (c'est-à-dire 1 000 mg);

- Dissoudre avec le solvant approprié et compléter le volume à 100 ml avec de l'eau distillée;
- Résultat : 1 000 mg / 100 ml donc chaque ml de cette solution contient 10 mg du produit.

- Solution-mère no.2

- Prendre ensuite 1 ml de cette solution no.1 (10 mg) dans 99 ml d'eau distillée;
- Résultat : 10 mg / 100 ml donc chaque ml de cette solution contient 0.1 mg du produit;
- Il suffit d'ajouter 1 ml de cette dernière solution-mère no.2 afin d'obtenir le 0.1 mg du produit désiré.

Lorsque vous désirez connaître la quantité de solution-mère à ajouter à un milieu de culture afin d'obtenir un nombre de milligrammes spécifique, vous devez simplement utiliser la règle du produit croisé (règle de trois). Les deux problèmes suivants vous proposent deux façons différentes de solutionner cette difficulté.

Problème 1 :

Vous voulez utiliser un total de 3 270 mg de sels pour fabriquer un litre de solution-mère d'oligo-éléments MS. Pour une recette particulière, vous devez incorporer 32,7 mg (oligo-éléments MS) au litre de milieu en préparation. Quelle volume de solution-mère devez-vous utiliser ?

Solution :

$$\begin{array}{rcl}
 3\,270 \text{ mg} & = & 32,7 \text{ mg} \text{ (produit croisé)} \\
 1\,000 \text{ ml} & & ? \text{ ml} \\
 \\
 1\,000 \text{ ml} \times 32,7 \text{ mg} & = & 3\,270 \text{ mg} \times ? \\
 32\,700 & = & 3\,270 \times ? \\
 \\
 \frac{32\,700}{3\,270} & = & ?
 \end{array}$$

Réponse : 10 ml

Problème 2 :

Vous avez une solution-mère d'auxine dont la concentration est de 1 mg / 100 ml, combien de millilitres de cette solution devez-vous utiliser, si la recette indique 0,1 mg / l d'auxine ?

Solution :

Il faut d'abord exprimer les concentrations en pourcentage. Ensuite, complétez l'équation suivante à l'aide des données qui vous sont fournies dans l'énoncé du problème:

$$\begin{array}{rcl}
 \frac{\text{Volume utilisé sol.-mère}}{\text{Vol. sol. Prescrite}} & = & \frac{\text{Concentration prescrite (\%)}}{\text{Concentration sol.-mère}} \\
 \frac{?}{?} & = & \frac{0.01 \%}{?}
 \end{array}$$

$$\begin{array}{rclcl}
 1\ 000\ \text{ml} & & & & 1.00\ \% \\
 \\
 1\ 000\ \text{ml} & \times & 0.01\ \% & = & 1,00\% \times \ ? \\
 \\
 \frac{1\ 000\ \text{ml}}{1,00\ \%} & \times & 0,01\ \% & = & 10\ \text{ml}
 \end{array}$$

Réponse :10ml

3.4 Préparation du milieu MS pour un volume de 1 000 ml

- Verser approximativement les deux tiers de la quantité d'eau requise (soit environ 600 ml) dans un bécher de 2 litres. L'eau utilisée doit avoir été déminéralisée et distillée (DDH₂O). Agiter.
- Un à la fois, les composés (mis à part le sucre et l'agar) sont ajoutés à l'eau dans l'ordre prévu sur la feuille descriptive (macro-micro-fer-vitamines-régulateurs). NE PAS CHAUFFER.
- Pour de meilleurs résultats, on attend la dissolution complète avant l'ajout du composé suivant.
- Dans le cas d'une solution-mère, ne jamais pipetter dans le contenant
- Dans le cas de composés solides (2 mg et plus) , dissoudre dans le solvant approprié et rincer les nacelles à l'eau afin de recueillir toutes traces de composés.
- Ajuster le pH du milieu avec du NaOH ou du HCl tout en agitant la solution.
- Si désiré, le milieu peut alors être entreposé au réfrigérateur pour une journée.
- Compléter le volume de la solution à 1 000 ml à l'aide d'un ballon volumétrique. La solution doit être à la température de la pièce.
- Verser à nouveau le milieu dans le bécher de 2 litres recouvert d'un papier d'aluminium.
- Le déposer sur une plaque chauffante : CHAUFFER ET AGITER.
- Ajouter graduellement le sucrose, attendre qu'il soit complètement dissout.
- Ajouter graduellement l'agar en neige fine en prenant soin de ne pas saupoudrer les parois internes du bécher. Continuer de chauffer la solution jusqu'à ébullition et dissolution de toutes les particules d'agar. L'agar est complètement dissout lorsque la solution redevient claire.
- Transférer le milieu chaud dans les contenants appropriés et identifier.
- Stériliser les contenants à l'autoclave (121°C ; 15 à 20 minutes selon le volume des contenants).
- Garder le milieu au réfrigérateur jusqu'à son utilisation.

3.5 Préparation du milieu MS pour un volume de 500 ml

- Verser approximativement les deux tiers de la quantité d'eau requise (soit environ 300 ml) dans un bécher de 1 litres. L'eau utilisée doit avoir été déminéralisée et distillée (DDH₂O). Agiter.

- ❑ Un à la fois, les composés (mis à part le sucre et l'agar) sont ajoutés à l'eau dans l'ordre prévu sur la feuille descriptive (macro-micro-fer-vitamines-régulateurs). NE PAS CHAUFFER.
- ❑ Pour de meilleurs résultats, on attend la dissolution complète avant l'ajout du composé suivant.
- ❑ Dans le cas d'une solution mère, ne jamais prélever directement du contenant
- ❑ Dans le cas de composés solides (2 mg et plus) , dissoudre dans le solvant approprié et rincer les nacelles à l'eau afin de recueillir toutes traces de composés.
- ❑ Ajuster le pH du milieu avec du NaOH ou du HCl tout en agitant la solution.
- ❑ Si désiré, le milieu peut alors être entreposé au réfrigérateur pour une journée.
- ❑ Compléter le volume de la solution à 500 ml à l'aide d'un ballon volumétrique. La solution doit être à la température de la pièce.
- ❑ Verser à nouveau le milieu dans le bécher de 1 litre recouvert d'un papier d'aluminium.
- ❑ Le déposer sur une plaque chauffante : CHAUFFER ET AGITER.
- ❑ Ajouter graduellement le sucrose, attendre qu'il soit complètement dissout.
- ❑ Ajouter graduellement l'agar en neige fine en prenant soin de ne pas saupoudrer les parois internes du bécher. Continuer de chauffer la solution jusqu'à ébullition et dissolution de toutes les particules d'agar. L'agar est complètement dissout lorsque la solution redevient claire.
- ❑ Transférer le milieu chaud dans les contenants appropriés et identifier.
- ❑ Stériliser les contenants à l'autoclave (121°C ; 15 à 20 minutes selon le volume des contenants).
- ❑ Garder le milieu au réfrigérateur jusqu'à son utilisation.

3.6 Préparation du milieu MS avec sachet commercial

Plusieurs compagnies offrent des poudres prêtes à utiliser vendues en sachet pour la réalisation de milieu. Il faut toutefois apporter une attention particulière au contenu de ces poudres qui sont généralement décrites à l'aide d'un tableau. En effet, les sachets identifiés « MS medium » ne contiennent pas les mêmes produits qu'un milieu « MS salts » par exemple disponibles chez Sigma. Dans ce cas particulier, le sachet « MS salts » contient tous les sels minéraux (macro et micro-éléments) prescrits par Murashige et Skoog tandis que le sachet « MS medium » contient en plus de ces sels minéraux, les vitamines décrites par ces auteurs. Certains sachets comptent, en plus des sels minéraux et des vitamines, les régulateurs de croissance indispensables à la croissance et au développement des plantes propres à chacun des stades : initiation d'une culture, multiplication et rhizogénèse.

Ces poudres pré-mélangées présentent de nombreux avantages et sont généralement fiables à utiliser. Les différents fournisseurs de produits et équipements nécessaires à la culture *in vitro*, offrent une gamme de plus en plus variée de ce type de produits dont voici quelques exemples :

- Murashige et Skoog (MS) basal salts :

Il s'agit d'un produit intéressant puisque ce milieu est très largement utilisé et convient à de très nombreuses cultures. Il permet l'ajout des produits organiques (vitamines et régulateurs) spécifiques à la culture convoitée.

- Murashige et Skoog (MS) medium :
Dans le cas où la plante cultivée demande des vitamines de types MS, ce sachet nous évite la préparation de solutions-mères de vitamines donc une économie de temps.
- Anderson :
Ce type de milieu s'avère intéressant dans le cas de cultures de plantes acidophylles. Les sachets contenant uniquement des sels sont disponibles. Aussi trouve-t-on sur le marché des milieux pré-mélangés pour la culture du Rhododendron (stades I, II, et III).
- Vacin et Went medium :
Ce mélange de sels minéraux est très utilisé dans la culture d'orchidée, particulièrement pour le *Cybidium*.
- Knudson medium :
Utilisé pour la germination des orchidées *in vitro*
- WMP medium :
Ce milieu « Woody plant medium » (WPM) est plus fréquemment employé dans la culture des plantes ligneuses mais aussi à l'occasion dans la culture des plantes vivaces.
- White medium
Milieu de culture à faible concentration en sels minéraux.

Plusieurs milieux sont maintenant vendus pour la réalisation de cultures spécifiques :

- *Saintpaulia ionantha*;
- Fougère;
- Rhododendron;
- *Drosera*;
- *Kalanchoe*;
- *Gerbera*;
- *Begonia*;
- *Cattleya*;
- *Poinsettia*;
- *Lys*;
- *etc.*

Préparation d'un litre de milieu nutritif (sachet commercial)

- Verser 800 ml d'eau distillée dans un contenant de 2 litres.
- Ajouter tout le contenu du sachet contenant le milieu pré-préparé en remuant constamment.
- Rincer l'intérieur du sachet à l'aide de quelques ml d'eau distillée contenue dans un flacon laveur afin d'en récupérer toute la poudre.

- ❑ Mesurer le pH de la solution et au besoin l'ajuster à la valeur désirée. Si le pH est trop acide (bas), l'ajuster à l'aide d'une solution de NaOH 1N; si il est trop alcalin (haut), utiliser du HCl 1N. S'assurer de la bonne dispersion de l'acide ou de la base avant de tester à nouveau.
- ❑ Ajuster le volume à 1 litre à l'aide d'un ballon jaugé.
- ❑ Chauffer la solution dans le contenant de départ (2 litres) et ajouter le sucre graduellement en remuant constamment.
- ❑ Une fois le sucre dissout, ajouter en neige fine la gélose toujours en remuant et chauffer jusqu'au point d'ébullition. La gélose sera complètement dissoute lorsque le milieu sera redevenu clair.
- ❑ Partager le milieu de culture de façon à obtenir 40 tubes à culture contenant chacun environ 12 à 14 ml.
- ❑ Stériliser les tubes (ou autres contenants) à l'autoclave (ou autocuiseur) durant 15 minutes à 15 lb de pression (121°C)
- ❑ Laisser refroidir à la température de la pièce. Les milieux de culture peuvent être refroidi en pente de 45° s'ils sont simplement maintenus dans cette position lors du refroidissement.
- ❑ Les milieux doivent être conservés au réfrigérateur s'ils ne sont pas utilisés dans la semaine suivante.
- ❑ Dans tous les cas, pour de meilleurs résultats, ils devraient être utilisés dans les deux semaines suivant leur fabrication.

3.7 La stérilisation

Le maintien des cultures en conditions aseptiques sous entend la stérilisation des milieux de culture, d'instruments de manipulation et de dissection, d'eau de rinçage, etc. L'acquisition d'un équipement permettant la stérilisation est donc indispensable au laboratoire de micropropagation. L'équipement de stérilisation par excellence est sans conteste l'autoclave. Cependant, compte tenu de son coût d'achat (jusqu'à \$5 000), il convenait ici de trouver un équipement de remplacement efficace à moindre coût. Trois modes de stérilisation ont donc été testés afin de répondre à notre besoin et les résultats sont détaillés au chapitre 4 :

- Utilisation d'un bain d'eau bouillante dans lequel les tubes (ou autres contenants) sont plongés pendant 30 minutes;
- Utilisation d'un micro-ondes d'une puissance de 700W dans lequel les tubes (10 à la fois) sont chauffés pendant 10 minutes;
- Utilisation d'une cocotte minute (autocuiseur; autoclave à conserve) pendant 15 minutes à 15 lb de pression.

Pour des raisons techniques et pratiques, nous avons retenu l'utilisation de l'autocuiseur domestique. Son coût est d'environ 130\$. Il permet la stérilisation de près d'un litre de milieu à la fois et il s'utilise sur une cuisinière conventionnelle. De plus, il nous assure l'atteinte d'une température de 121°C. L'eau bout à 100 °C sauf dans les régions montagneuses, et ceci est normalement suffisant pour détruire la plupart des moisissures

et les levures. Toutefois, une température de 115 °C (240°F) est nécessaire pour détruire les bactéries nuisibles. Durant la stérilisation sous pression, une portion de l'eau dans l'autoclave ou l'autocuiseur est changée en vapeur et quand l'air est complètement sorti par le tuyau d'échappement, on place le régulateur de pression. La vapeur qui se dilate créera de la pression. Quand la pression augmente dans l'autoclave, la température augmente aussi. Ainsi un régulateur assurant 5 lb de pression permettra à la température d'atteindre 110°C, à 10 lb de pression la température s'élèvera à 115°C et à 15 lb de pression la température atteinte sera d'environ 121°C. La technique de culture *in vitro* exige des températures de stérilisation de 121 °C. Seule une température aussi élevée permettra la destruction de bactéries résistantes. Une seule bactérie présente dans un tube à culture donnera naissance en moins d'une ou deux semaines à une colonie de bactéries visible à l'oeil nu. La qualité nutritive des milieux de culture permet un essor rapide de la croissance des micro-organismes qui entre en compétition avec la croissance des végétaux. Il est donc impératif d'éliminer par stérilisation des milieux tous les micro-organismes.

Le temps de stérilisation est également important. Il convient généralement d'observer un temps de stérilisation de 15 à 20 minutes à 15 lb de pression afin de s'assurer de la destruction des bactéries endosporeuses les plus résistantes à la chaleur. Si toutefois le volume de milieux ou d'eau à stériliser est plus important, par exemple 250 ml par contenant, il est alors recommandé d'augmenter le temps de stérilisation à 30 minutes après la mise sous pression de l'autocuiseur.

3.7.1 Stérilisation à l'autocuiseur

Important: Le protocole suivant a pour but de vous informer des principales étapes à suivre lors de la stérilisation à l'autocuiseur. Il ne doit en aucun cas remplacer le suivi des instructions d'utilisation du fabricant de votre autocuiseur.

- S'assurer que l'autocuiseur est bien propre et en bonne condition (joint d'étanchéité, valve...);
- S'assurer que les tubes ou les contenants ne sont pas craqués ou ébréchés et que les bouchons sont en bonne condition;
- S'assurer que les contenants ne contiennent pas plus de la moitié de leur volume. Les tubes contiennent généralement entre 12 et 14 ml de milieux;
- Ajuster les couvercles suivant les instructions du fabricant. On dévisse d'au moins ¼ tour les couvercles sur les pots Mason;
- Verser 3.5 L d'eau bouillante (ou l'équivalent de 1 1/2 pouce) dans l'autocuiseur avec le support en place. Placer l'autoclave sur un feu bas;
- Placer chaque contenant debout sur le support dans l'autocuiseur. Les tubes peuvent être maintenus debout en les attachant par lots de 5 ou insérés debout dans des pots vides. Toujours utiliser le support pour la stérilisation. Les bocaux ou les tubes peuvent se briser s'ils sont en contact direct avec le fond de l'autoclave;
- Disposer sur un des contenants un ruban révélateur de stérilisation celui-ci permettra de confirmer si les conditions de stérilisation ont été atteintes (121°C durant 15 minutes);

- S'assurer que le tuyau d'échappement est ouvert avant de mettre le couvercle sur l'autocuiseur;
- Placer le couvercle sur l'autoclave et le fermer solidement. Les poignées du couvercle doivent être au centre des poignées de la marmite. NE PAS laisser monter la pression dans l'autoclave avant d'avoir fermé le couvercle solidement en place;
- Pour faire évacué l'air de l'autoclave et des contenants, mettre l'autoclave sur un feu assez haut pour que la vapeur jaillisse librement par le tuyau d'échappement. Réduire la chaleur pour maintenir un jaillissement de vapeur modéré. Laisser la vapeur sortir durant 7 à 10 minutes;
- Déposer le régulateur de pression (15 lb) sur le tuyau d'échappement;
- Si votre autoclave est muni d'une valve de sécurité automatique, elle devrait se soulever pour sceller la marmite. (Voir instruction du fabricant);
- Faire chauffer l'autoclave jusqu'à ce que le régulateur de pression commence à remuer gentiment . Ajuster la chaleur afin d'obtenir un rythme lent et régulier. Un feu relativement élevé est nécessaire pour la plupart des cuisinières. NE PAS toucher et NE PAS enlever le régulateur de pression durant la période de stérilisation;
- A la fin de la durée de stérilisation, arrêter la chaleur et laisser la pression tomber par elle même afin qu'il n'y est pas de débordement. La pression est tombée lorsque le plongeur de la valve de sécurité est descendu et qu'il n'y a plus de vapeur qui s'échappe lorsque le régulateur est penché;
- Enlever le régulateur de pression du tuyau d'échappement;
- Laisser l'autoclave refroidir 1 à 2 minutes et lever le couvercle de l'autoclave de façon à ce que la vapeur soit éloignée de vous;
- Sortir le matériel de l'autoclave et ajuster les couvercles si nécessaire.

3.8 Matériel et équipement requis

- ❑ **Plaque chauffante pourvue d'un agitateur** (une cuisinière électrique ou au gaz ainsi qu'un fouet tel qu'utilisé en cuisine);
- ❑ **Bécher de 2 litres** (chaudron 2 L en verre ou en stainless steel);
- ❑ **Flacon laveur** (distributeur à condiments (moutarde...) en plastique dont on perce le bec d'un trou fin fait à l'aiguille);
- ❑ **Dispensette** (récipient avec bec verseur pouvant contenir 1 litre de milieu chaud ou bouteille d'un litre avec goulot pouvant recevoir une pompe en plastique souvent retrouvée sur les format géant de shampoing);
- ❑ **Gants isolants** (mitaines ou autres pour la cuisine permettant de tenir des contenants chauds);
- ❑ **80 tubes de culture (25 X 150 mm) pour 1 litre de milieu ou 40 tubes pour 1/2 litre dans un ratelier** (des pots Mason, des petits pots de verre pour la nourriture de bébé, pot de plastiques autoclavables portant la mention pp);
- ❑ **pH mètre** (un pH mètre portatif peut-être utilisé mais toutefois beaucoup moins fiable);
- ❑ **NaOH 1N et HCl 1N (pour ajuster le pH du milieu);**
- ❑ **Autoclave** (un autocuiseur domestique d'une capacité de 20 litres ou plus);

- ❑ **Balance analytique d'une précision au 10 millième de gramme 0.0001;**
- ❑ **Balance digitale d'une précision au 0.10 gramme;**
- ❑ **Spatule (pour peser les poudres et les sels);**
- ❑ **Nacelles (petits contenants légers en plastique pour contenir les produits à peser);**
- ❑ **Eau déionisée (eau distillée disponible en pharmacie);**
- ❑ **Flacon volumétrique (1 000 ml et/ou 500 ml);**
- ❑ **Contenants hermétiques ambrés pour la conservation des solutions-mères;**
- ❑ **Pipettes (1, 5, et 10 ml);**
- ❑ **Ruban à étiqueter et crayon à encre permanente;**
- ❑ **Ruban révélateur de stérilisation.**

4. Les constituants des milieux nutritifs

4.1 Les sels minéraux

Les besoins nutritifs des plantes en culture *in vitro* concernent d'abord les sels minéraux. Le praticien doit avant toute chose recréer pour la plante un milieu de vie comparable au sol dont elle sera maintenant dépourvue. Tous les éléments essentiels à sa croissance doivent donc être incorporés au milieu sans quoi une carence minérale peut survenir. De plus, le choix des différents sels devra respecter un équilibre ionique afin de favoriser une croissance harmonieuse sans créer d'inhibition. Les besoins des cultures de tissus en éléments minéraux ont été étudiés par différents auteurs et le fruit de leurs recherches a donné lieu à différentes compositions minérales toujours utilisées aujourd'hui. Ces formulations portent souvent le nom de leurs auteurs tels que GAMBORG (Canada), GAUTHERET (France), HELLER (France), MURASHIGE et SKOOG (Etats-Unis), WHITE (Etats-Unis), MOREL (France), etc. La composition du milieu de culture Murashige et Skoog est sans doute la plus utilisée car elle convient à un très grand nombre de plantes de familles botaniques différentes. Ce milieu est très riche en sels minéraux et il convient souvent de le diluer de moitié ou plus afin d'éviter des effets osmotiques inhibiteurs, particulièrement chez les espèces à croissance très lente.

4.2 Les vitamines

Les vitamines sont des substances organiques reconnues pour stimuler la croissance. Elles sont particulièrement utiles en micropropagation lorsqu'un fragment seulement de la plante est utilisé pour générer la culture de plantes entières. On comprendra que dans ces circonstances, la synthèse endogène (par le tissu végétal lui-même) de vitamines risque d'être insuffisante et que le milieu devra y suppléer en conséquence.

Les vitamines les plus fréquemment utilisées sont la thiamine HCL, la pyridoxine, la biotine, le pantothénate de calcium et le myo-inositol (le myo-inositol est parfois considéré comme un sucre). Les concentrations sont souvent faibles et il sera alors nécessaire de fabriquer des solutions-mères. La conservation de ces solutions-mères pourra se faire au congélateur en contenant de plastique ou distribuées dans des cubes à glaçon par petits volumes (exemple 10 ml), puis démoulés une fois gelés et rangés dans des sacs à congélation. Une fois la solution sortie et décongelée, elle devra être utilisée dans les 2 à 4 semaines qui suivent.

4.3 Les régulateurs de croissance

On les appelle aussi « phytohormones » ou « hormones végétales », mais considérant qu'il s'agit variablement de produits de synthèse ou de produits synthétiques, il est préférable d'utiliser le terme régulateurs de croissance. Ces substances sont utilisées à des doses très faibles (0.01mg/l à 10 mg/l) et nécessitent le plus souvent d'être pesées sur une balance de précision à 0.0001g. Il est toutefois possible de fabriquer des solutions-mères à partir de masses s'élevant à 100 mg et d'opérer par la suite une série de dilutions. Les trois principaux groupes de régulateurs de croissance d'usage fréquent sont les AUXINES, les CYTOKININES et les GIBBERELLINES. Le choix du ou des régulateurs utilisés ainsi que

leur quantité est généralement guidé par la littérature. Si l'espèce végétale convoitée ne figurent pas parmi vos lectures et qu'aucun milieu de culture ne semble disponible à titre de référence, une première expérience pourrait être tentée en utilisant un milieu de culture réputé convenable pour une espèce voisine ou pour une plante d'un même genre ou même d'une même famille botanique.

4.3.1 Les auxines

Rôles *in vitro* :

- Favorise la croissance de cals, les divisions cellulaires, l'allongement cellulaire
- Favorise le développement de bourgeons adventifs
- Favorise l'enracinement.

- **Acide indole-3-acétique (A.I.A.) :**
 - Substance naturelle pouvant être obtenue par synthèse chimique;
 - Auxine relativement faible;
 - Se dégrade rapidement à la lumière (oxydation);
 - Conservée préférentiellement dans un contenant ambré (obscurité) au réfrigérateur (4 -5 °C). Se conserve 7 jours dans ces conditions;
 - Soluble dans l'éthanol ou le méthanol (96°).

- **Acide naphthalène acétique (ANA) :**
 - Substance de synthèse stable en solution et à la chaleur (autoclave);
 - Auxine forte et très stable;
 - Souvent utilisée pour favoriser la rhizogénèse (initiation des racines);
 - Conservée au réfrigérateur ou au congélateur;
 - Soluble dans l'éthanol ou le méthanol (96°).

- **Acide indole-butyrique (A.I.B.) :**
 - Substance de synthèse relativement stable;
 - Auxine relativement faible;
 - Soluble dans l'éthanol ou le méthanol (96°).

- **Acide 2,4 dichlorophénoxyacétique (2,4-D) :**
 - Substance de synthèse stable à la chaleur (autoclave);
 - Largement utilisée comme herbicide;
 - Auxine très forte et dont le niveau toxique est atteint très rapidement;
 - Utilisée pour la production de cals surtout;
 - Peu soluble dans l'eau. Dissoudre dans l'éthanol. Chauffer légèrement. Diluer progressivement avec de l'eau;
 - Conservée à l'obscurité au réfrigérateur ou au congélateur.

4.3.2 Les cytokinines

Rôles *in vitro* :

- Stimule les divisions cellulaires;
- Régularise la morphogénèse (acquisition de la forme);
- Stimule la croissance des bourgeons axillaires;
- Contribue au renouvellement de la chlorophylle.

Toutes les cytokinines sont peu solubles dans l'eau et doivent être préalablement dissoutes dans quelques gouttes de NaOH 1N ou de HCl 1N. Elles sont dégradées par la lumière et doivent être conservées au réfrigérateur à l'obscurité. Elles sont stables en solutions aqueuses et à la chaleur (autoclave).

- **Zéatine** :
 - Substance naturelle.
- **Isopenthényladéline (2-i-P)** :
 - Substance naturelle;
 - Cytokinine relativement faible.
- **Kinétine** :
 - Substance de synthèse.
- **6-benzylaminopurine (BAP) et benzyladénine (BA)** :
 - Substance de synthèse;
 - Largement utilisé en raison de sa grande activité et de son faible coût.

4.3.3 Les gibberellines

Rôles *in vitro* :

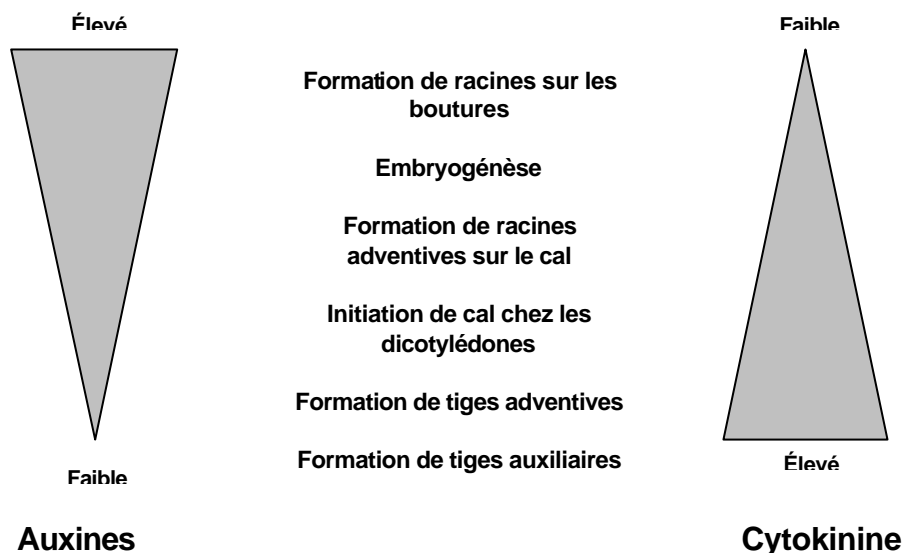
- Favorise le grandissement cellulaire;
- Favorise l'allongement des entre-nœuds;
- Lève la dormance des graines.

Seul l'**acide gibberellique A 3** (Ga3) est utilisé.

- Vérifier sa concentration sur l'étiquette;
- Substance de synthèse peu stable en solution aqueuse;
- Devrait être préparée juste au moment de l'utilisation;
- Pourrait être conservée dans l'alcool (éthanol ou méthanol 96°) au réfrigérateur.

4.3.4 Balance hormonale vs réponse physiologique

Ce schéma¹ représente les niveaux relatifs d'une auxine et d'une cytokinine nécessaires afin d'obtenir différentes réponses morphogéniques.



4.3.5 Nomenclature

Les tableaux suivants dressent la liste des abréviations courantes.

Régulateur de croissance	Poids moléculaire (g)	
AIA (IAA en anglais)	175.2	Acide indole-3-acétique
AIB (IBA en anglais)	203.2	Acide indole-3-butyrique
ANA (NAA en anglais)	186.2	Acide naphthalène acétique
2,4-D	221.04	Acide 2,4-dichlorophénoxyacétique
2,4,5-T	255.5	Acide 2,4,5-trichlorophénoxyacétique
CPA		Acide 4-chlorophénoxyacétique
PIC	241.5	Picloram (acide amino-3,5,6-trichloropicolinique)
NOA	202.20	Acide 2-naphthoxyacétique
BTO A		Acide 2-benzothiazoléacétique
BA ou 6-BA	BA (225.3)	6-benzylaminopurine
ZEA	219.2	Zéatine
GA	346.37	Acide gibberellique
ABA	264.31	Acide Abscissique

¹ Source : Georges E.F. et P.D. Sherrington, « Plant propagation by tissue culture », Handbook and directories of commercial laboratories, Exegetics Ltd, 1984 p. 307.

KIN	215.2	Kinétine
2 iP	203.2	2- iopenthényladénine

Additifs

CH	Hydrolysate de caséine
CW	Coconut water
EDTA	Acide éthylènedinitrilo-tétraacétique
ADE ou Ad	Adénine

Formulations

MS	Murashige et Skoog (1962)
B5	Gamborg et al. (1968)
ER	Eriksson (1965)
WH	White (1963)

4.4 Les sucres

Les tissus végétaux en culture *in vitro* sont très peu performants au niveau photosynthétique. Ils produisent de la chlorophylle comme des tissus normaux, mais leur faible capacité à produire des sucres par photosynthèse est sans doute due à la faible concentration en gaz carbonique (CO₂) des contenants. Ainsi doit-on ajouter au milieu de culture des glucides sous forme de saccharose (sucrose) afin que la plante les utilise comme source d'énergie à défaut d'en produire elle-même. En général, la concentration prescrite est de 30 g au litre. Le passage à l'autoclave provoque une altération des sucres par hydrolyse (glucose-fructose) mais cette modification ne semble pas nuire à la croissance.

4.5 Les géloses

La gélose (ou agar) ajoutée au milieu nutritif permet l'obtention d'un milieu semi-solide ou solide dans lequel les explants peuvent être repiqués et supportés. En l'absence de gélose, les milieux liquides doivent être agités (sur de plaque rotative à raison d'une ou deux tours minute) afin de permettre l'incorporation de l'oxygène nécessaire à leur survie, on évite ainsi leur asphyxie. La gélose a l'avantage de retenir très peu les ions mais en contrepartie il fournit un milieu de vie pauvre en oxygène lorsqu'elle est utilisée à forte concentration. Une variation de la concentration en gélose (entre 6 et 10 g/litre), a aussi pour effet de modifier l'équilibre osmotique du milieu créant parfois des problèmes de vitrification. La qualité d'un milieu gélosé est donc dépendante d'une part de sa fermeté, indispensable au support des plantes, et d'autre part de sa souplesse, qui facilite la diffusion des éléments nutritifs. La concentration utilisée varie selon le niveau de pureté de la gélose et l'objectif de la culture.

4.5.1 Agar-agar

Il s'agit d'une substance naturelle extraite de différentes espèces d'algues marines. On la classe parmi les sucres parce qu'elle est identifiée comme un polysaccharide (donc un glucide). Elle se dissout dans l'eau entre 90 et 100°C. En refroidissant, elle demeure à l'état liquide jusque vers 55°C et elle se solidifie en un gel relativement clair au environ de 40°C. Le milieu gélosé ne peut être porté à ébullition une seconde fois car cette sur-cuisson entraînerait une dégradation de l'agar qui perdrait alors ses propriétés. De plus, la solidification du milieu gélosé peut être compromise si le pH de la solution a été ajusté sous les 4.8. En effet, il semble qu'à des pH aussi bas (plantes acidophiles), l'agar perd de ses propriétés au moment de l'autoclavage.

À la sortie de l'autoclave, la gélification se fait normalement en 2 à 3 heures, selon le volume de milieu par contenant. L'agar vendu commercialement contient malgré tout des impuretés (des ions sulfates, calcium, magnésium, fer, etc.). C'est pourquoi son prix varie en fonction de la purification du produit. La mention « purifié » est d'une qualité suffisante à l'exercice de cette technique.

4.5.2 Gels synthétiques (Substituts d'agar)

Il existe présentement sur le marché, de nouveaux produits permettant de solidifier les milieux de culture. Par exemple, le Gelrite ou Phytigel dont plusieurs auteurs font mention est dérivé d'une bactérie (*Pseudomonas sp*). Il s'agit d'un sucre complexe hautement raffiné. Leur utilisation est intéressante. Elle permet de réaliser un milieu d'une clarté cristalline, et des quantités avoisinant 2 g/litre permettent d'obtenir une gélification équivalente à l'agar traditionnel à 7 g/litre. Son prix de revient est le double de celui de l'agar mais compte tenu qu'on en utilise seulement le tiers de la quantité de l'agar conventionnel, son utilisation demeure intéressante.

On doit toutefois prendre note que la clarté du milieu réalisé avec ces gels synthétiques peu faussement laisser croire à une contamination bactérienne autour de l'explant. En effet, les exsudats produits en cours de culture seront maintenant plus visibles et ne devront pas être confondus à une quelconque colonie bactérienne. Nos essais nous ont fait préférer le Phytigel pour sa facilité de dissolution, son prix et le résultat de culture en tout point comparable à l'utilisation de l'agar conventionnel. Lors de nos essais, nous avons incorporé 2 g de Phytigel par litre de milieu de culture. D'autres auteurs, comme Lydianne Kyte, suggèrent de recourir à l'usage de l'agar et des gels synthétiques combinés. En effet, Mme L. Kyte propose l'utilisation de 3 parties de Gelrite pour 1 partie d'agar. Pour satisfaire cette demande des utilisateurs, la compagnie Sigma offre un nouveau produit, l'« Agar-gel ». Il s'agit d'une combinaison des deux produits : agar et gel synthétique.

4.6 Charbon activé

Le charbon activé est fréquemment utilisé au stade de l'enracinement (stade III). Plusieurs praticiens utilisent ce produit tout au cours des stades I, II et III. Le charbon activé est une substance adsorbante qui permet la neutralisation de produits toxiques exsudés dans le milieu par la plante. Il peut s'agir plus couramment de substances phénoliques naturellement produites lors de la taille ou la découpe de certaines plantes, comme les ligneuses par exemple. En contexte normal, ces substances sont lentement lessivées des plaies par les pluies ou autrement. Ces substances phénoliques apparaissent après oxydation de précurseurs présents au site de la plaie et joue le rôle d'antiseptique (toxique pour les micro-organismes). Il s'agit en quelque sorte d'une défense naturelle des plantes. Cependant, en culture *in vitro* ces plantes émettent ces substances toxiques dans un milieu fermé. On remarque la présence de ces phénols à la base des plantules où elles s'accumulent dans la gélose formant une zone nébuleuse noirâtre. Selon certaines expériences, le charbon activé a été tout désigné pour neutraliser l'effet inhibiteur et toxique de ces substances phénoliques dans le milieu en cours de culture.

Entre autre application, le charbon activé serait bénéfique lors de l'enracinement. À cette étape, la réalisation d'un milieu opaque et sombre grâce à l'ajout du charbon activé aurait pour effet d'imiter ces conditions présentes dans le sol où évoluent normalement les racines.

L'essai conduit dans le cadre de ce projet concerne le stade d'initiation (stade I) de la culture du *Bégonia*. Le *Bégonia* étant fréquemment cultivé sur milieu additionné de charbon activé, nous avons voulu savoir s'il était avantageux d'en incorporer de manière routinière. Les essais ont démontré que le plus grand nombre de bourgeons adventifs a été produit sur les milieux témoins dépourvus de charbon activé. Les concentrations de charbon activé utilisées pour ces essais étaient de 0.1, 0.2, 0.4 0.6 et 0.8 g par litre de milieu. Cette réponse des explants de *Bégonia* s'explique peut être par le fait que dans son pouvoir d'adsorption, le charbon activé adsorbe aussi d'autres substances telles que les auxines, certaines vitamines et des cytokinines.

Si toutefois les émissions de substances phénoliques compromettent toute croissance de votre culture ou même la mort des explants, il serait intéressant de faire l'essai du charbon activé ou de pré-tremper les explants dans des solutions anti-oxydantes comme une solution de vitamine C (acide ascorbique) préalablement stérilisées à l'autoclave ou ultrafiltrée (voir la procédure plus loin dans le texte).

4.7 Les composés organiques divers

Nous présentons ici des additifs de différentes sources comme les acides aminés, les extraits de protéines, les acides organiques, les produits stimulants de composition mal définie ainsi que les produits antiseptiques ou antibiotiques.

Les **acides aminés** (constituants des protéines) et les **extraits de protéines** (exemple l'hydrolysate de caséine) sont occasionnellement ajoutés au milieu de culture dans le but de favoriser l'organogénèse, c'est-à-dire la formation de nouveaux organes (bourgeons, racines...). L'acide aminé le plus couramment utilisé est la Glycine ($C_2H_5O_2$) notamment retrouvée dans les composants organiques du milieu MS. Les **acides organiques** comme le citrate et le malate sont parfois ajoutés au milieu de culture.

D'autres produits (à composition mal définie) reconnus pour stimuler la croissance sont parfois utilisés comme par exemple, des **extraits de levure** (0,5 à 1g/litre) qui sont une riche source de vitamines du complexe B; le **lait de coco** (5 à 15 %) retenue pour sa teneur en hormones naturelles (auxines, cytokinines) et en vitamines; la peptone une riche source de protéines. On peut se procurer de **l'eau de coco** chez les fournisseurs de produits de laboratoires comme Sigma. Selon les auteurs du livre « La culture *in vitro* et ses applications horticoles », on peut préparer du lait de coco en l'extrayant directement de la noix que l'on achète à l'épicerie. On extrait l'albumen, liquide de la noix, que l'on autoclave immédiatement et que l'on conserve au congélateur.

4.8 Les produits antibiotiques ou antiseptiques

Les produits antibiotiques ajoutés au milieu comme la tétracycline, streptomycine, polymyxine-B, etc. sont souvent utilisés en combinaison afin de lutter contre des bactéries endogènes des plantes. Il arrive occasionnellement que certaines plantes (les plantes ligneuses plus spécialement) contiennent des bactéries qui s'échappent dans le milieu nutritif, et se développent en colonies suffisamment importantes pour compromettre la

culture. Les produits antibiotiques ajoutés au milieu comme la tétracycline, streptomycine, polymyxine-B, etc. sont souvent utilisés en combinaison afin de lutter contre ces bactéries endogènes des plantes (à l'intérieur de la plante). Mais ces produits antibiotiques sont coûteux et sont souvent contournés par les bactéries qui leur deviennent résistantes.

Des recherches sur Internet ont permis trouver d'autres moyens de lutte contre ces bactéries endogènes. Nous avons fait l'essai d'hypochlorite de sodium (5.25%) directement ajouté au milieu de culture avant l'autoclavage à raison de 2 ml/ litre de milieu. Il s'agissait de la culture du lilas. Les 40 tubes à culture contenant du Javel sont demeurés sans contamination tandis que des 40 tubes sans Javel, 5 ont été contaminés par des bactéries ou des moisissures. Bien qu'il ne s'agisse que d'un seul essai, le Javel semble démontrer une certaine capacité à contrôler le développement des micro-organismes. Pourrait-il être efficace contre les bactéries endogènes proprement dites ? D'autres essais devront en faire la démonstration.

Un autre produit, le **PPM (Preservative Plant Mixture)** vient de faire son apparition aux États-Unis. Il est vendu par la compagnie Plant Cell Technology, Inc. de Washington D.C.. Ce produit est vendu comme un préservatif/biocide stable à la chaleur (pouvant donc être autoclavé). Les fabricants précisent qu'il ne s'agit pas d'un antibiotique mais qu'il prévient la germination des spores de bactéries et de champignons et qu'il tue les cellules bactériennes et mycéliennes. Il est spécialement conçu pour enrayer les contaminations provenant de l'air ambiant, de l'eau, des contacts humains et même, à forte concentration il peut enrayer les contaminations endogènes. Le produit est, dit-on, spécialement conçu pour la culture *in vitro* de tissus végétaux et n'est pas phytotoxique.

Les doses proposées sont de 1 à 2 ml par litre de milieu pour une utilisation routinière; et de 5 à 20 ml pour l'élimination des bactéries endogènes. Son prix est de \$1.00 / ml. Nous avons fait l'essai du produit à raison de 12 ml / litre pour la culture du lilas qui présentait une contamination endogène. Tous les explants ayant été cultivés dans le milieu de culture contenant du PPM ont en effet été exempts de contamination bactérienne ou fongique, tandis que tous les autres explants ont été contaminés. Les explants traités n'ont pas montré de signe de toxicité. Nous avons donc tenté un autre essai cette fois avec une culture de Saintpaulia en stade de multiplication. Le milieu a été additionné de 10 et 16 ml / litre de PPM et un lot témoin sans PPM. Le transfert des plants a été réalisé par des gens non initiés à la technique et dans un laboratoire de classe sans utilisation de la hotte à flux laminaire. Voilà pourquoi nous avons augmenté les doses de PPM. Les milieux enrichis de 10 et de 16 ml de PPM ont été exempts de toute contamination à l'exception des spores de champignon qui ont germé à la surface des explants. Mais la surface de la gélose n'a permis aucun développement. Cependant tous les explants sans exception ont montré une forte toxicité à de telles doses. Les tissus ont nécrosé (du moins la partie au contact de l'agar) en 24 à 48 heures. Les milieux sans PPM ont été contaminés dans une proportion de 70 % mais leurs explants se sont développés normalement. Des doses aussi fortes pour les espèces herbacées comme le Saintpaulia seraient peut-être à proscrire. Mais à la lumière de ces résultats, ce nouveau produit se montre très efficace pour lutter contre les contaminations mais à quelle dose, avec quelle culture, de manière routinière, au stade de l'établissement de la culture seulement?

5. Les contenants

Une variété de contenants peuvent être utilisés pour réaliser la culture *in vitro*. Le choix du type de contenant dépend de plusieurs facteurs :

- Il doit être autoclavable;
- Il doit laisser passer la lumière;
- Il doit s'ajuster à la taille et au nombre d'explants;
- Son obturation doit assurer l'asepsie;
- Il doit se nettoyer et se manipuler facilement;
- Si possible, il doit être réutilisable;
- Il doit être peu coûteux.

De manière générale les tubes à culture (25mm x 150mm) sont largement utilisés au stade de l'initiation d'une culture aseptique (stade I). Les désinfection de surface des végétaux avant leur première introduction *in vitro* est souvent difficile à réussir. Aussi, ont-ils avantage à être mis en culture individuellement pour ne pas faire chuter le taux de réussite par une contamination secondaire, car un explant contaminé nous forcerait à jeter tous les autres du même récipient. Une fois l'asepsie réussie, les explants peuvent être transférer dans des récipients plus grands.

5.1 Pots de bébé

Lors de nos essais nous avons expérimenté l'utilisation de pots de verre (nourriture pour bébé) avec couvercles Nalgène résistants à l'autoclave spécialement conçus pour ce type de pots. Nos résultats sont mitigés. L'ouverture des pots n'apparaît pas toujours uniforme, il faut donc trier les couvercles afin de trouver un ajustement convenable. On note de 10 à 20 % plus de contaminations si l'on compare à l'usage de tubes ou de contenants GA7 et la manipulation est plus laborieuse pour la stérilisation (les pots sont manipulés individuellement). Chaque pot peut abriter de 3 à 4 plantes selon l'espèce. Ce choix s'avère cependant intéressant pour le travail à petite échelle puisqu'ils sont peu coûteux et assez faciles à trouver.

5.2 Pots à conserve (Mason)

Dans la catégorie pot de verre, notons aussi l'usage fréquent de pots à conserve (Mason). On trouve chez Sigma des couvercles résistants à l'autoclave qui se visse sur l'embouchure. Ils répondent bien à l'ensemble des critères de sélection mais sont cependant volumineux à manipuler sous la hotte compte tenu qu'il est périlleux de les empiler. Ils peuvent accueillir jusqu'à 12 ou 15 explants. La gélose est généralement solidifiée dans le pot lorsqu'il repose sur le côté en ayant soin que celle-ci n'atteigne pas le goulot. Dans ce cas, les risques de contamination sont élevés lors du repiquage. L'avantage de ces pots est sans doute leur faible coût.

5.3 Pots de boucher

Une autre alternative intéressante serait l'achat de pots de plastique translucides autoclavables (pots de boucher dans lesquels on retrouve les cretons, le vrac ..).

Selon Bhojwani et Razdan², certains contenants en plastique peuvent en effet être stérilisés par la chaleur. Ils font mention des matières suivantes :

- Polypropylène;
- Polyméthylpentène;
- Polyallomère;
- Tefzel ETFE;
- Teflon FEP;
- Produits de marque « Nalgene » et « Thermolyne apparatus ».

Tous ces produits plastiques résistent à des autoclavages répétés mais seuls les produits faits de Teflon FEP résistent à la chaleur sèche. Les auteurs précisent en outre que les contenants faits de polycarbonate perdent peu à peu leurs propriétés élastiques et que par conséquent, les cycles d'autoclavage doivent être limités à une durée de 20 minutes. On retrouve sous les pots et les couvercles un code de 2 à 4 lettres moulées. Elles correspondent au type de plastique composant le contenant. Le tableau suivant liste les caractéristiques propres à quelques-uns de ces plastiques. Rappelons ici que la température de l'autoclave doit atteindre 121°C afin d'assurer l'asepsie.

Table 3 : Caractéristiques des plastiques

Code Plastique	Nom des résines Plastique	Température max. d'utilisation (°C)	Transparence	Autoclave	Stérilisation Chaleur sèche
LDPE	Low density Polyethylene	80	Translucide	Non	Non
HDPE	Hight density Polyethylene	120	Translucide	Non	Non
PP	Polypropylene	135	Translucide	Oui	Non
PMP	Polymethylpentene (« TPX »)	175	Clair	Oui	Non
FEP	Teflon FEP Fluorinated ethylene propylene	205	Translucide	Oui	Oui
ETFE	Tefzel ETFE Ethylene-tetrafluoroethylene	150	Translucide	Oui	Oui
PSF	Polysulfone	165	Clair	Oui	Non
PA	Polyallomer	130	Translucide	Oui	Non
PVC	Polyvinyl chloride		Clair	Non	Non

² Bhojwani S .S., et Razdan M.K., « Plant tissue culture :theory and practice », Elsevier, New-York, 1983, 502 pp.

Nos essais de pots de plastique ont été effectués avec des contenants codés « PP ». Nous les avons utilisés pour la stérilisation d'eau de rinçage pour des volumes de 250 ml. De tels volumes nécessitent une durée de stérilisation plus longue, soit 30 minutes. Tel que décrit par Bhojwani et Razdan pour les contenants de polycarbonate, une telle durée de stérilisation a entraîné la déformation des pots. Nous suggérons donc, pour de meilleurs résultats d'utiliser des pots de verre (de type Mason) pour stériliser des volumes de 150 ml et plus par contenant.

Toutefois, ce type de contenant (pot de boucher) étant facilement accessible et très peu coûteux, il demeure très avantageux pour la culture *in vitro* à l'échelle commerciale. D'autant plus que les volumes de milieux nutritifs par contenant ne dépassent guère 100 ml, et peuvent donc être adéquatement stérilisés à 121°C pour une durée de 20 minutes.

Règle générale, les dimensions des récipients seront choisies en fonction du nombre et de la taille des explants. Un méristème d'un millimètre de diamètre pourrait rapidement se dessécher dans un contenant trop grand. Idéalement les méristèmes sont disposés dans de petits tubes (4 ml de milieu) dits à hémolyse. Suite à leur croissance, on pourra transférer les nouvelles plantules dans des tubes plus grands (25 X 150 mm) ou dans des contenants de plus grande capacité (jusqu'à 20 plantules par pot). Le plus souvent les tubes à culture sont fermés au moyen de bouchons en matière plastique résistant à l'autoclave qui permettent cependant un minimum d'échanges gazeux avec l'air ambiant. Des fermetures trop étanches sont parfois à l'origine de troubles de culture, par exemple si l'espèce en croissance est réputée dégager naturellement un fort taux d'éthylène. En effet, l'éthylène est une substance naturelle à caractère hormonal, inhibiteur de la croissance.

6. Préparation des solutions stérilisantes

Afin d'obtenir une culture aseptique, les tissus végétaux à mettre en culture doivent être « stérilisés » en surface, c'est-à-dire débarrassés des bactéries ou spores de champignon (moisissures) qui adhèrent à leur surface. Il s'agit de la partie la plus difficile de l'établissement d'une culture *in vitro*. Le défi est de désinfecter le végétal sans compromettre sa survie.

Il faut d'abord savoir que :

- Le degré d'infection des tissus en surface est très variable;
- Les parties aériennes sont généralement les moins infectées;
- Il est préférable d'utiliser les nouvelles pousses car elles sont relativement plus propres que les plus âgées;
- Les plantes provenant de la serre sont souvent plus propres que celles qui viennent du champ;
- Plus l'explant est petit, plus les chances de contamination sont faibles; mais plus l'explant est gros, plus les chances de reprise sont grandes;

- La concentration la plus faible de solution de javel qui assure l'asepsie, devrait être celle qu'on utilise, puisque le matériel végétal peut être brûlé si la concentration est trop forte.

La littérature fournit souvent les concentrations adéquates à utiliser mais ce n'est pas le cas, seule l'expérimentation à différentes concentrations vous procurera l'information. Les explants sont le plus souvent désinfectés par immersion dans une solution de javel commercial (hypochlorite de sodium Na OCl) dont la teneur varie selon la marque de commerce entre 4 et 6 %. La concentration finale de la solution de javel se situe généralement à 0.5%.

D'autres produits peuvent être utilisés :

- Alcool éthylique ou isopropylique 70 % (trempage 20 secondes, utilisé comme agent mouillant)
- Hypochlorite de calcium 0.8 % (produit très intéressant car il pénètre très peu les tissus mais difficile à trouver et long à préparer)
- Chlorure mercurique $HgCl_2$ 0.01 % (poison violent !) (doit être utilisé sous une hotte chimique, très difficile à éliminer de la surface des végétaux) À déconseiller,

6.1 Préparation d'une solution de javel

Le javel se trouve facilement en contenant de plastique dans les épicerie. On trouve sur l'étiquette la concentration d'hypochlorite de sodium, laquelle peut varier d'une marque de commerce à l'autre. Plus couramment il s'agit de 5.25 % d'hypochlorite de sodium. Pour préparer la solution désinfectante à environ 0.5 % , c'est-à-dire une partie de javel pour 9 parties d'eau préparée comme suit :

Pour fabriquer 1 litre de solution :

- Mesurer 100 ml de javel à l'aide d'un cylindre gradué (ou d'une tasse à mesurer)
- Ajouter 900 ml d'eau afin de compléter le volume à 1 000 ml.(l'eau du robinet peut faire l'affaire)
- Bien mélanger (les deux liquides n'ont pas la même densité)
- Préparer cette solution juste au moment de l'utiliser puisqu'elle perd rapidement de l'efficacité.

6.2 Préparation de l'alcool 70 %

L'alcool recommandé est l'alcool éthylique (éthanol) ou l'isopropanol. On ne doit jamais utiliser l'alcool méthylique (méthanol) pour stériliser ou flamber. Le méthanol peut être utilisé dans les dissolution de régulateur de croissance seulement.

L'alcool éthylique est généralement vendu à une concentration de 96%. Ses propriétés antiseptiques sont optimales à une concentration de 65 à 70% soit une dilution de 7 parties

d'alcool dans trois parties d'eau. Donc pour fabriquer 1 litre d'une solution d'alcool 70 % , on mélange 700 ml d'alcool 96% à 300 ml d'eau (distillée ou non). En pharmacie, on peut aussi trouver de l'alcool à friction qui est l'isopropanol à 70% mais qui est moins recommandable que l'alcool éthylique.

6.3 Préparation d'une solution anti-oxydante

- Dissoudre 100 mg d'acide ascorbique et 150 mg d'acide citrique dans 1 litre d'eau.
- Stériliser la solution avant son utilisation sous la hotte. La stérilisation se fait par ultrafiltration dans la plupart des cas.
- Sous la hotte, avant de découper les explants, tremper les végétaux dans la solution antioxydante afin d'éviter le noircissement des tissus.

7. Stérilisation de la hotte

La hotte à flux laminaire doit être préparée de préférence 30 minutes avant son utilisation.

- Vaporisation à l'alcool 70% de l'intérieur des parois verticales (à l'exclusion du filtre) et la surface de travail;
- Mettre le moteur en marche;
- Vaporiser à l'alcool 70° tous le matériel et les instruments nécessaires tels que :
 - Scopule métallique (servira de support);
 - 2 scalpels;
 - 2 pinces à long manche (12 pouces);
 - brûleur à alcool;
 - alcool à flamber (environ 125 ml dans un contenant de verre à base stable);
 - pièce de tissu coton fromage (imbibée d'alcool servira au nettoyage de la surface de travail);
 - pétris ou surface de travail stérile;
 - binoculaire (25X) et instruments de dissection si nécessaire;
 - eaux stériles (3) s'il y a lieu.

8. Manipulations des végétaux sous la hotte

8.1 Matériel requis

- Matériel végétal;
- Récipient contenant 100 ml d'alcool éthylique 70°;
- Pince longue;
- Chronomètre;

- Récipient contenant environ 200 ml d'une solution d'hypochlorite de sodium (Javel) à 0.5%;
- Plaque avec agitation (ou agitation manuelle);
- Tween-20 ou savon liquide (quelques gouttes);
- 3 récipients d'eau stérile (contenant environ 300 ml chacun);
- Pétris stériles (ou papier ciré brun découpé en carré de 20 cm de côté enveloppés dans du papier d'aluminium et stérilisés par paquet de 3 à 5 unités);
- Vaporisateur contenant alcool 70 %;
- Ouate hydrophile ou coton fromage;
- Récipient de verre contenant environ 125 ml d'alcool 96° (pour flamber les instruments);
- Lampe à alcool;
- Instruments : 2 pinces longues; 2 scalpels; 1 scopule.

8.2 Stérilisation des végétaux

Avant de commencer à travailler...

Se laver les mains au savon antiseptique puis remonter les manches de la blouse jusqu'au dessus des coudes; on porte un sarrau.

- Préparer les explants tel que décrit dans la littérature;
- S'il s'agit d'une espèce pubescente : tremper les explants dans l'éthanol 70 % pendant 20 secondes (l'alcool agira ici comme agent mouillant);
- De l'alcool, transférer directement les explants dans une solution d'hypochlorite de sodium à 0.5% à laquelle on a ajouté quelques gouttes de Tween-20 ou de savon. Les explants devront rester dans cette solution (en agitation ou en rotation) pendant 5, 10 , 12 ou 15 minutes selon les recommandations.

Pendant l'attente

On maintient les cheveux longs attachés et on enlève montre et bracelet. Au moment de travailler sous la hotte, on porte des gants de plastique que l'on vaporisera fréquemment à l'alcool 70% et systématiquement après avoir été en contact avec du matériel non stérile (cheveux, vêtements, verrerie...). On stérilise tous les instruments par trempage dans l'alcool 96% puis passage à la flamme. Les instruments ainsi stérilisés repose sur une scopule (support métallique) qui a préalablement été flambée à ses deux extrémités. Les instruments sont toujours doublés pour permettre le refroidissement de l'un tandis que l'autre est en usage. Un instrument chaud peut endommager les tissus vivants. **On ne trempe jamais un instrument chaud dans l'alcool, celui-ci pourrait prendre en feu.**

Manipulations de l'explant...

- Le récipient contenant les explants est ensuite amené sous la hotte après avoir été vaporisé à l'alcool 70%.

- En évitant toute contamination, les explants sont transférés dans un premier pot d'eau stérile pour une durée de 5 minutes; puis dans un deuxième et un troisième pot d'eau stérile pour une durée de 5 minutes chacun.
- Les transferts s'effectuent à l'aide d'une pince longue tenue entre le pouce, l'index et le majeur. Les pots sont placés en diagonale l'un par rapport à l'autre, et le transfert s'effectue du premier (que l'on maintient à angle) au deuxième pot, sans que la main ne passe au-dessus de l'ouverture des pots.
- Après le troisième et dernier rinçage en eau stérile, les explants sont transférés un à la fois sur une surface de travail stérile (pétri ou autre), découpé de la façon décrite (apex de tige, noeud,...)
- Transfert de l'explant sur la gélose :
 - La pince longue tenue entre le pouce, l'index et le majeur, permet au petit doigt de cette même main de prendre le bouchon du tube de façon à ne pas le déposer sur la table, ce qui risque de l'infecter.
 - De l'autre main, on chauffe le col du tube à inoculer
 - À l'aide de la pince, on dépose l'explant sur le milieu en prenant le minimum de temps; la rapidité est une des conditions de la réussite des cultures
 - Tout explant qui sera tombé sur la table, ou qui aura touché autre chose que le papier ou le pétri stérile, sera éliminé
 - Si l'on devait poser un bouchon sur la table, il devrait être déposé à l'envers
 - Avant de remettre le bouchon, on flambe à nouveau l'ouverture du tube (on ne flambe pas l'embouchure des pots seulement des tubes)
- On veillera à changer la surface de travail stérile (pétri ou autre) tous les 3 ou 4 explants environ et à stériliser les instruments encore plus fréquemment.
- Une fois le travail terminé, on identifie la culture, on inscrit la date de l'inoculation et on place les explants en chambre de culture.

8.3 Conditions et difficultés de l'asepsie

La technique de culture *in vitro* exige beaucoup de soin pour le maintien des cultures en condition d'asepsie. Pour quiconque entreprend ses premières expérimentations, plusieurs gestes et précautions semblent superflus. Mais il faut toujours se rappeler que les micro-organismes sont partout (spores de champignon, bactéries). Il ne suffit pas d'instruments ou d'une surface de travail propres, mais bien stériles sans quoi un seul micro-organisme en contact avec la gélose finira par envahir le milieu entraînant la mort du plant. Ainsi, il vaut mieux au début respecter le maximum de règles, quitte à les simplifier par la suite selon son expérience personnelle.

Quelques règles utiles :

- Les pots Mason contenant de l'eau stérile peuvent être conservés plusieurs mois s'ils sont fermés par des couvercles à filet (vissant)
- Si l'eau stérilisée dans des pots de plastique résistants à l'autoclave ne devrait pas être conservée plus de quelques jours

- Les papiers de boucher (cirés d'un seul côté) et découpés en carré en guise de surface de travail seront stérilisés à l'avance à la condition d'être généreusement emballés dans le papier d'aluminium
- Tout matériel introduit sous la hotte devrait être vaporisé à l'alcool 70% (si possible plus de 15 minutes avant le début du travail)
- Les vêtements ne devraient pas pendre au-dessus de la surface de travail dans la hotte : les fibres textiles transportent de nombreux germes
- On évite les grands gestes et l'entrée du corps dans l'enceinte de la hotte : risques élevés de transporter des germes
- On vaporise nos gants chaque fois que l'on désire réintégrer notre place sous la hotte
- On nettoie régulièrement la table de travail à l'alcool 70% à l'aide du chiffon coton fromage en commençant par le fond de la hotte et en finissant vers soi.
- On ne vaporise pas dans la hotte si le brûleur est allumé. **DANGER**
- On prend l'habitude dès le début de déplacer les mains parallèlement l'une par rapport à l'autre afin d'éviter le passage au-dessus des instruments stériles, de la surface de travail dans laquelle on découpe les végétaux, ou les embouchures des pots d'eau stérile : bien que les gants soient vaporisés à l'alcool ceci ne garanti aucunement leur stérilisation. La peau morte est aussi porteuse de germes ne l'oublions pas !
- Changer fréquemment la surface de travail (tous les 3 ou 4 explants) contribue aussi au succès de la technique, particulièrement pour les débutants.

8.4 Les infections et quelques unes de leurs causes³ :

Lorsque l'on a des cultures infectées, cela peut provenir de différentes causes. Dès l'apparition des symptômes, on regarde d'abord s'il s'agit d'un champignon (moisissure) ou d'une bactérie. S'il s'agit d'un champignon, on voit un développement mycélien qui a une texture feutrée, souvent blanche ou grisâtre. Si le feutrage est vert, il s'agit sans doute du *Penicillium*. Si le feutrage présente des petits grains noirs (fructifications), il peut s'agir du *Rhizopus nigricans* qui se multiplie très vite et qu'il faut détruire à l'autoclave sans tarder.

S'il s'agit d'une bactérie, on voit alors un voile d'aspect laiteux, développé à l'intérieur du milieu et à la surface. Ce voile est quelquefois coloré (rose, jaune, orangé ...). On regardera ensuite si l'infection part de la zone de contact entre les tissus et le milieu, et si oui, ce sont les tissus eux-mêmes qui sont la source de l'infection. Si l'infection part d'un point quelconque du milieu, la source de l'infection peut être soit l'air, soit une mauvaise stérilisation du milieu, soit une infection de l'air ambiant par l'intermédiaire de l'eau de condensation au niveau du couvercle. Dans certains cas, rares heureusement, des spores de certaines bactéries peuvent résister à l'autoclave; il faudra alors stériliser la verrerie à l'eau de Javel. Lorsque l'on voit un développement de mycélium de *Penicillium*, cela provient de l'air et indique une mauvaise manipulation. Les exemples de mauvaises

³ Auger et al. « La culture *in vitro* et ses applications horticoles », technique et documentation-Lavoisier, 1989, Paris p.61.

manipulations sont nombreux : bavardage pendant le travail sous la hotte à flux laminaire, contact des tissus végétaux avec des doigts, mauvaise stérilisation des instruments qui portent alors les micro-organismes de l'explant infecté sur les autres.

En cours de culture, on peut ne voir apparaître aucune trace de voile bactérien, alors que les bactéries sont présentes dans les tissus. Dans ce cas, le milieu de culture utilisé ne permet pas le développement de la bactérie; toutefois, on peut permettre son expression en ajoutant de la peptone à 2 g/L dans le milieu (la peptone est un constituant classique des milieux de culture des bactéries). On fera ensuite le tri en éliminant les tubes infectés, et on obtiendra ainsi une collection de tissus indemnes de bactéries.

9. Inventaire global du matériel et des équipements

L'inventaire de la verrerie, du petit matériel et des plus gros équipements peut varier d'un laboratoire à l'autre suivant sa capacité d'achat, le nombre d'utilisateurs ainsi que l'importance que prend la micropropagation dans l'entreprise.

Le développement du laboratoire peut s'effectuer par étapes. Des achats minimum sont prévus au début, les premières expérimentations sont faites avec une ou deux espèces végétales tout au plus. Bien que la culture des espèces choisies déjà expérimentées ailleurs, comme toute technique, elle devra être éprouvée sur place, dans l'entreprise, avec les équipements choisis dans l'environnement (chambre à culture) prévu. La mise au point du nouveau laboratoire demande quelques mois d'utilisation.

Le tableau qui suit présente une gamme de matériel, produits et équipements parmi lesquels on choisi ce qui se prête le mieux à notre entreprise.

Table 4 : Liste de matériel et d'équipements

Matériel divers	Format	Quantité	Fournisseur	No.Catalogue	Prix 1999	Utilisation
Tubes à culture	25X150mm	500	Sigma	C 5916	80/caisse \$ 77.20	Culture stade I
Bouchons pour tubes 25X150mm		500	Sigma	C 1934	500/caisse	Obturation des tubes
Pipette	5 ml	1				
Pipette	10 ml	1				
Ballon volumétrique	50 ml	1	Fisher	10-198-52A Plastic/autoclave	\$17.97	Jauger les liquides (sol-mères; milieux...)
Ballon volumétrique	100 ml	1	Fisher	10-198-52C Plastic/autoclave	\$19.33	Jauger les liquides
Ballon volumétrique	500 ml	1	Fisher	10-198-52F	\$28.84	Jauger les liquides
Ballon volumétrique	1 000 ml	1	Fisher	10-198-52G	\$37.00	Jauger les liquides
Distributeur pour pipette	Jusqu'à 10ml	1	Sigma	P 7924	\$22.00	Pipetter les liquides
Bécher	1 litre	1	Fisher	02-540-P	\$6.88	Cuisson des milieux sur plaque
Bécher 2 litres	2 litres	1	Fisher	02-540-R	\$13.61	Cuisson des milieux sur plaque
Pots Mason			Quincaillerie			Contenants à culture ou eau stérile
Couvercles NALGENE Pour pots Mason		12	Fisher	02-923-14H	\$18.72	Obturer les pots Mason pour culture ou eau stérile
Flacon laveur	250 ml	1	Fisher	03-409-10D	\$3.15	Rincer les nacelles à l'eau distillée
Ruban stérilisation	Rouleau	1	Labcor	P 08277-62	\$4.40	Révéléteur de stérilisation
Lampe à alcool		1	Fisher	04-245-AA	\$7.95	Stérilisation des instruments sous la hotte
Gants jetables latex	S-M-G	100/bte	V.W.R.Canlab	32900-000	\$8.50	Travail sous la hotte
Masque			quincaillerie	50/bte	\$30.00	Travail sous la hotte
Pincés longues 12 po.	12 po.	2	Sigma	F-4642	\$62.40	Manipulation des explants
Manche scalpel						Manipulation des explants
Lames pour scalpel						Manipulation des explants
Pincés courtes		2	Sigma	F-3767	\$89.40	Dissection des explants
Baby jars		100	Sigma	V-8630	\$46.20	Pots à culture
BBjars couvercles MAGENTA		100	Sigma	V-8648	\$49.30	Obturation pour pots bébé
Ratelier métal (48 tubes)	48 tubes	1	Carolina	D8-19-9337	\$23.17 US	Support à tubes
Tige d'agitation aimantée	12 po.	1	Sigma	Z10-569-4	\$11.10	Rapporteur à barre aimantée
Barre aimantée		6 (set)	Sigma	Z11-534-7	\$30.20	Agitation sur plaque
Nacelles	petites	500	Sigma	W2751	\$34.90	Contenants pour pesées

Nacelles	<i>grandes</i>	500	<i>Sigma</i>	<i>W2876</i>	\$58.90	<i>Contenants pour pesées</i>
Cylindre gradué	1000 ml	1	<i>Carolina</i>	<i>D8-72-1606</i>	\$8.50	<i>Mesurer les liquides (Javel, alcool)</i>
Gants isolants						<i>Manipulation des liquides chauds</i>
GA7		25	<i>Sigma</i>	<i>V-8505</i>	\$81.60	<i>Contenants à culture</i>
GA4		25	<i>Sigma</i>	<i>V-8380</i>	\$77.00	<i>Contenant à culture</i>
Couvercles GA7 ou GA4		25	<i>Sigma</i>	<i>C-0542</i>	\$32.50	<i>Obturation des GA7 ou GA4</i>
Ratelier MAGENTA	1/36 tubes	1	<i>Sigma</i>	<i>T-8654</i>	\$6.50	<i>Support à tubes</i>
Pulvérisateur plastique	1 litre	1	<i>quincaillerie</i>		\$2.50	<i>Vaporisation à l'alcool</i>
PH mètre (style crayon)			<i>Carolina</i>	<i>D8-19-9410</i>	\$68.23 US	<i>Ajustement du pH du milieu</i>
PH mètre Autocuisseur			<i>Hanna Canadian Tire</i>	<i>8417 MIRRO</i>	\$130.00	<i>Ajustement du pH du milieu Stérilisation</i>
Dispensette Brinkman	2 à 10 ml	1	<i>Fisher</i>	<i>13-688-83</i>	\$309.00	<i>Distribution des milieux</i>
Bacti-cinerator			<i>Sigma</i>	<i>S-3398</i>	\$355.00	<i>Stérilisation des instruments</i>
Plaque chauffante & agitation	10 X 10		<i>Cole-Parmer</i>	<i>P-84303</i>	\$410.00	<i>Cuisson des milieux</i>
Hotte à flux laminaire commerciale	<i>Individuelle</i>					<i>Travail en asepsie</i>
Hotte à flux laminaire économique du CIDES			<i>CIDES</i>		\$1 700.00	<i>Travail en asepsie</i>
Autoclave conventionnel			<i>Cole-Parmer</i>			<i>Stérilisation</i>
Produits chimiques	Format	Quantité	Fournisseur	No. Catalogue	Prix 1999	Utilisation
Ac. Indole acétique (A.I.A.)		5 g	<i>Sigma</i>	<i>I-2886</i>	\$15.80	<i>Régulateur</i>
Ac. Indole butyrique (A.I.B.)		1 g	<i>Sigma</i>	<i>I-5386</i>	\$10.00	<i>Régulateur</i>
Ac Naphtalene acétique (A.N.A.)		25 g	<i>Sigma</i>	<i>N-0640</i>	\$14.70	<i>Régulateur</i>
Ac. Nicotinique		25 g	<i>Sigma</i>	<i>N-0765</i>	\$7.70	<i>Vitamine</i>
Adénine sulfate		5 g	<i>Aldrich</i>	<i>14,581-5</i>	\$24.80	<i>Facteur de croissance</i>
Biotine		100 mg	<i>Sigma</i>	<i>B-3399</i>	\$17.50	<i>Vitamine</i>
Benzylaminopurine (BAP)		1 g	<i>Sigma</i>	<i>B-9395</i>	\$16.00	<i>Régulateur</i>
Chlorure de calcium (CaCl ₂ ·2H ₂ O)		500 g	<i>Sigma</i>	<i>C-2536</i>	\$34.30	<i>Sel</i>
Chlorure de cobalt (CoCl ₂ ·6H ₂ O)		25 g	<i>Sigma</i>	<i>C-2911</i>	\$20.40	<i>Sel</i>
2iP		100 mg	<i>Sigma</i>	<i>D-7674</i>	\$15.10	<i>Régulateur</i>
Na ₂ EDTA·2H ₂ O		100 g	<i>Sigma</i>	<i>E-6635</i>	\$24.60	<i>Chélatl</i>
Glycine		100 g	<i>Sigma</i>	<i>G-6143</i>	\$18.80	<i>Acide aminé</i>
Inositol		100 g	<i>Sigma</i>	<i>I-3011</i>	\$40.40	<i>Vitamine / sucre</i>
Iodure de potassium (KI)		100 g	<i>Sigma</i>	<i>P-8166</i>	\$34.10	<i>Sel</i>
Kinéline (Kin)		100 mg	<i>Sigma</i>	<i>K-0753</i>	\$1121.00	<i>Régulateur</i>

Molybdate de sodium $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$		100 g	Sigma	M-1651	\$33.80	Sel
Nitrate d'ammonium NH_4NO_3		500 g	Sigma	A-3795	\$30.20	Sel
Nitrate de potassium KNO_3		500 g	Sigma	P-8291	\$38.00	Sel
Panthoténate de calcium		5 g	Sigma	P-6045	\$11.40	Vitamine
Phosphate de potassium KH_2PO_4		100 g	Sigma	P-8416	\$17.70	Sel
Phosphate de sodium NaH_2PO_4		100 g	Sigma	S-5515	\$17.70	Sel
Pyridoxine HCl		25 g	Sigma	P-8666	\$27.00	Vitamine
Sulfate de cuivre $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$		250 g	Sigma	C-3036	\$22.00	Sel
Sulfate de fer $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$		50 g	Sigma	F-8263	\$7.20	Sel
Sulfate de magnésium $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$		500 g	Sigma	M-7774	\$31.10	Sel
Sulfate de zinc $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$		100 g	Sigma	Z-1001	\$21.00	Sel
Acide borique H_3BO_3		100 g	Sigma	B-9645	\$14.90	Sel
Acide folique		1 g	Sigma	F-8890	\$11.60	Vitamine
Ac. Gibberellique		500 mg	Sigma	G-7645	\$21.90	Régulateur
Sucrose		1 kg	Sigma	S-5391	\$17.80	Sucre
Agar		500 g	Sigma	A-1296	\$93.50	Gélose
Gelrite		250 g	Sigma	G-1910	\$52.80	Gélose
Phytigel		250 g	Sigma	P-8169	\$50.80	Gélose
MS salts	sachet	1 L	Sigma	M-5524	\$2.00	Milieu de culture
MS medium	sachet	1 L	Sigma	M-5519	\$2.70	Milieu de culture
Anderson	sachet	1 L	Sigma	A-2670	\$2.70	Milieu de culture
PH mètre (style crayon)			Carolina	D8-19-9410	\$68.23 US	Ajustement du pH du milieu
PH mètre			Hanna	8417		Ajustement du pH du milieu
Autocuiseur			Canadian Tire	MIRRO	\$130.00	Stérilisation
Dispensette Brinkman	2 à 10 ml	1	Fisher	13-688-83	\$309.00	Distribution des milieux
Bacti-cinerator			Sigma	S-3398	\$355.00	Stérilisation des instruments
Plaque chauffante & agitation	10 X 10		Cole-Parmer	P-84303	\$410.00	Cuisson des milieux
Hotte à flux laminaire commerciale	Individuelle					Travail en asepsie
Hotte à flux laminaire économique du CIDES			CIDES		\$1 700.00	Travail en asepsie
Autoclave conventionnel			Cole-Parmer			Stérilisation

10. Glossaire des termes

- **Adénine** : Composé azoté constituant des acides nucléiques et utilisé sous forme de sulfate dans les milieux de culture.
- **Adventif** : Adjectif utilisé pour décrire les racines, tiges ou autres organes qui se développent à des endroits inusités sur la plante, par exemple, des tiges se développant sur des racines, des feuilles ou des cals ou un embryon se développant à partir d'une cellule autre qu'un zygote.
- **Apex de tige** : Méristème apical en plus des primordium foliaires sous-jacents.
- **Apical, ale** : Qui se porte au sommet, à l'apex, à l'extrémité.
- **Aseptique** : Adjectif signifiant exempt de microorganismes.
- **Autoclave** : Appareil permettant de faire la stérilisation avec de la vapeur sous pression.
- **Axillaire** : Placé à l'aisselle d'une feuille, d'un rameau, par exemple, d'un bourgeon.
- **Cal, callus** : Tissu issu de la prolifération désorganisée de cellules *in vivo* ou *in vitro*.
- **Chimères** : Plantes dont les tissus n'ont pas tous la même composition génétique.
- **Clones** : Plants produits de façon asexuée à partir d'un seul plant.
- **Déionisée** : Dépourvue d'ions.
- **Dominance apicale** : Phénomène par lequel la croissance des bourgeons axillaires est inhibée en présence d'un bourgeon apical sur le rameau.
- **EDTA** : Agent chélateur, l'acide éthylènediamine tétraacétique. Préviens la précipitation.
- **Exciser** : Enlever en coupant.
- **Explant ou Explantat** : Partie de la plante-mère utilisée pour initier une culture.
- **Hormones** : Composé organique (naturel) qui à faible concentration commande une réponse physiologique chez la plante. Ex. Auxines, cytokinines, gibberellines.
- **Hybride** : Plante issue d'un croisement entre deux cultivars différents habituellement par reproduction sexuée.
- **Indexage** : Méthode par laquelle on peut tester des plantes en regard de pathogènes ou de contaminants.

- **Inositol** : (C₆H₆ (OH)₆) : Vitamine du complexe B.
- **In vitro** : Littéralement « en verre ». Maintenant utilisé pour culture de tissu ou micropropagation.
- **In vivo** : Littéralement : « en vie ». Utilisé dans le cas de processus qui se produisent dans un être vivant, donc qui se produisent naturellement.
- **Juvenilité** : Phase de la croissance d'une plante à graines caractérisée par l'immaturité et l'inaptitude à fleurir.
- **Méristème** : Groupe de cellules indifférenciées se divisant activement et donnant lieu aux différents systèmes (tige, racine, feuille, fleur). Les principaux sont : méristèmes apicaux (extrémité des tiges et des racines), Méristèmes intercalaires (région des nœuds, base des feuilles), Méristèmes latéraux (cambiums)

- **Méristème Apical** : Réfère seulement au dôme méristématique situé au-delà des primordium foliaires.
- **Phénols** : Composés organiques qui sont souvent des produits secondaires du métabolisme et qui sont parfois toxiques (exsudats phénoliques)
- **Polysaccharides Polyoside** : Groupe d'hydrates de carbone composé de plusieurs unités de sucres différents.
- **Primordium** : Organe végétal dans son tout premier stade de différenciation (singulier : primordia).
- **Produits Secondaires** : Produits du métabolisme végétal qui ne sont pas reliés directement à la croissance ou à la reproduction, tels les saveurs, les colorations, les pesticides, etc.
- **Prolifération** : Multiplication rapide.
- **Protoplaste** : Une cellule dépourvue de sa paroi cellulaire mais entourée d'une membrane.
- **Régulateur de Croissance** : Composé organique qui influence la croissance et la multiplication, telles les cytokinines et les auxines. Il est d'origine naturelle ou synthétique.
- **Totipotence** : Cellule indifférenciée capable de se développer en plante entière.
- **Végétatif** : Somatique, non-sexuel.
- **Vitrification** : Phénomène indésirable qui apparaît parfois en cours de culture donnant aux tissus une apparence succulente, cassante, gorgée d'eau ou vitreuse.