

Culture in vitro

**Ref :
114 004**

Français – p 1

**Milieu pour multiplication Saint
Paulia 1000 mL**

Version : 8011

Pratique de la culture *in vitro* du Saint Paulia : protocole

1 Le flaconnage

Plusieurs types de flaconnages peuvent être utilisés pour les mises en culture. Cependant, nous vous conseillons d'utiliser des flacons avec bouchons à vis en bakélite et équipés d'une rondelle caoutchouc. Ces flacons sont troués en leur centre afin de permettre la circulation d'air entre l'intérieur et l'extérieur du flacon. Cette ouverture est comblée de coton cardé dont le rôle est de filtrer les contaminants de l'air qui pénètre dans le flacon.

Si vous utilisez des flacons de 90 mL, la quantité de gel par flacon sera d'environ 15 à 20 mL. Si vous utilisez des flacons de 125 mL, la quantité de gel sera d'environ 30 à 40 mL.

2 Les milieux

Les milieux de culture sont commercialisés sous forme de poudres déshydratées prêtes à l'emploi et sont proposés selon les quantités suivantes :

- 1000 mL, permettent de préparer 50 flacons de 90 mL (ou 25 flacons de 125 mL)
- 250 mL, permettent de préparer 12 flacons de 90 mL (ou 6 flacons de 125 mL)

Ils sont conditionnés en flacons polypropylène totalement étanches à l'eau et à l'air. Leur durée d'utilisation est d'environ 4 mois, sachant que la date limite est indiquée sur l'étiquette. Conservés au réfrigérateur (ou éventuellement au congélateur), cette durée de conservation est prolongée de 4 autres mois. Les doses doivent être utilisées en une seule fois et ne peuvent pas être fractionnées.

La base du milieu est une base de MURASHIGE et SKOOG (agar-agar et sels minéraux) enrichie de phythormones. La composition des milieux pour multiplication et enracinement diffère principalement sur les concentrations des phythormones et en particulier sur le rapport des concentrations auxines/cytokinines :

- Si ce rapport est inférieur à 1, le mode de développement favorisé sera la multiplication avec formation de nouveaux bourgeons
- Si ce rapport est proche de 1, le mode de développement favorisé sera la callogénèse
- Si ce rapport est supérieur à 1, le mode de développement favorisé sera la rhizogénèse et donc l'enracinement.

Il est important de respecter les temps de stérilisation préconisés ci après : en effet certaines auxines étant d'origine végétale, elles se détruisent progressivement avec les températures élevées.

3 Stérilisation des milieux de culture

La stérilisation des produits qui contiennent de l'eau ne peut être obtenue qu'**en chaleur humide** et sous pression. La simple ébullition ne suffit pas : les spores des bactéries et des moisissures résistent à 100° C.

L'utilisation d'un **autoclave** permet d'obtenir en atmosphère de vapeur d'eau des températures de 120° C sous pression (0,5 à 1 bar). La stérilité est obtenue en maintenant ces conditions pendant 20 minutes. C'est la vapeur d'eau sous pression qui stérilise et l'eau à ébullition. Le flacon contenant le gel nutritif à stériliser est placé dans un panier au dessus de l'eau.

PREPARATION DES MILIEUX DE CULTURE :

- Ouvrir le flacon contenant la poudre déshydratée.
- Verser le contenu du tube dans un récipient de taille suffisante pour obtenir une bonne ébullition (1,5 litre pour une dose de 1200 mL, 1 litre pour une dose pour 400 mL, etc...)
- Faire dissoudre dans un bain-marie bouillant le milieu de culture jusqu'à fusion complète en agitant de temps en temps.
- Répartir dans les flacons (en homogénéisant la solution régulièrement entre les remplissages successifs) à raison de 15 à 40 mL de culture par flacon.
- Stériliser pendant 20 minutes à l'autoclave à 120° C ou 30 min à la marmite à pression (à partir du sifflement de la soupape).
- A la fin de la stérilisation, laisser tomber la pression sans retirer la soupape (ce qui ferait sauter les bouchons).
- Poser les flacons en position inclinée ou verticale selon les milieux à préparer et attendre environ 3 heures afin qu'ils se gélifient (ne pas les toucher pendant qu'ils refroidissent).

4 Préparation du plan de travail

Précautions à prendre pour éviter les contaminations :

- Avant toute manipulation se laver les mains et les avant-bras ;
- Au moment de la manipulation, toutes les précautions sont prises pour ne pas introduire de bactéries ou de moisissures dans le flacon ;
- Le plan de travail sera désinfecté à l'eau de javel ;
- Les manipulations se feront toujours près d'une flamme (bec Bunsen ou lampe à alcool ou bec électrique adapté à la microbiologie) qui crée une atmosphère stérile dans un rayon d'environ 15 cm ;
- Les plantes à cultiver doivent être désinfectées et manipulées avec des instruments stériles ;
- Les flacons doivent être placés le plus près possible de la flamme (ou du courant d'air chaud) et leur encolure doit être passée à la flamme (ou dans le courant d'air très chaud d'un bec électrique) chaque fois qu'ils sont ouverts ou fermés ;
- L'opérateur doit éviter les courants d'air et ne doit pas parler ;

L'utilisation d'une hotte à flux laminaire, non indispensable, facilite ces conditions.

Mise en place du matériel :

- Étendre sur le plan de travail du papier imbibé d'eau de Javel.
- Placer au centre du plan de travail désinfecté le bec Bunsen ou le bec électrique (avec si nécessaire l'accessoire rehausseur adapté pour la microbiologie).
- A proximité du bec chauffant, placer une soucoupe ou une boîte de Pétri stérile.
- Placer un verre ou une éprouvette contenant de l'eau de Javel qui servira à mettre les instruments (pince, scalpel, ciseaux...).

5 Désinfection des plantes

Si vous ne disposez pas de plant désinfecté prêt à être re-multiplié, il est indispensable de désinfecter la plante que vous voulez repiquer.

MATERIEL NECESSAIRE :

- Liquide vaisselle
- Un bocal contenant une solution d'eau de Javel ⁽¹⁾
- 4 bocaux d'eau distillée stérile ⁽²⁾
- Une boîte de Pétri stérile (facultatif)
- Une spatule ou une pince stérile
- Un scalpel stérile ou une paire de ciseaux stériles
- Un flacon contenant de l'eau de Javel pour la stérilisation des instruments
- Du papier de laboratoire, d'essuyage ou des mouchoirs en papier.

DESINFECTION

- Prélever la partie de la plante que vous désirez mettre en culture (feuille pour le Saint-Paulia).
- Rincer à l'eau du robinet afin d'ôter la terre et la poussière.
- Faire tremper dans l'eau de Javel, sur les trois-quarts de leur longueur, les instruments pendant dix minutes et les placer sur le plan de travail en les couvrant de papier imbibé d'eau de Javel, par exemple en retournant le bord du papier installé sur le plan de travail.
- Plonger l'explant environ 5 minutes dans un mouillant composé d'une goutte de liquide vaisselle dans de l'eau.
- Désinfecter dans une solution de Javel ⁽¹⁾ pendant 10 minutes.
- Le plan de travail aura été désinfecté au préalable (voir paragraphe précédent).
- Allumer le bec chauffant et à partir de ce moment, manipuler en conditions stériles, près de la flamme ou du flux d'air chaud.
- Rincer par 4 bains successifs de 5 minutes chacun dans de l'eau distillée stérile.
- Sortir l'explant et le placer dans une boîte de Pétri stérile afin de le découper stérilement à l'aide d'un scalpel.

(1) Préparation de la solution de « Javel » :

Diluer le berlingot de « Javel Plus » selon les indications du fabricant et utiliser la solution telle quelle. Si vous achetez une bouteille prête à l'emploi, il n'est pas nécessaire de diluer le contenu.

(2) Préparation des bocaux d'eau distillée stérile :

Dans des bocaux ou des flacons fermant hermétiquement et résistant à la chaleur, verser environ 100 mL d'eau distillée.
Fermer le couvercle sur les bocaux et les stériliser 45 minutes à l'autoclave.

Remarque :

Si vous partez d'un explant très sale et qu'après cette méthode de désinfection il reste contaminé, vous pouvez, avant de désinfecter dans l'eau de Javel, le placer environ 15 à 20 secondes dans une solution d'alcool à 70° (préparée en ajoutant 31 mL d'eau dans 100 mL d'alcool à 90°).

6 Mise en culture

La technique de mise en culture exposée ci-dessous est identique pour les premières mises en culture sur gel de multiplication ainsi que pour les repiquages sur gel d'enracinement des explants.

- Désinfecter le bouchon du flacon avec la solution d'eau de Javel.
- Ouvrir le flacon encolure vers la flamme du bec Bunsen ou dans le courant d'air très chaud d'un bec électrique et poser le bouchon face extérieure vers le haut. (Il est pratiquement impossible de contaminer l'intérieur du bouchon, la cavité formée étant close).
- Avec des gestes lents, prendre l'explant et introduire celui-ci dans le flacon en le posant sur le gel avec une légère pression sur ce dernier pour le stabiliser.
- Refermer le flacon en ayant au préalable passé à la flamme (ou dans le flux d'air chaud) l'encolure en verre.

7 Conservation des mises en culture

Chaque variation de température à l'intérieur du flacon induit une circulation d'air entre l'intérieur et l'extérieur du flacon. Il est donc conseillé, pour éviter des infections ultérieures des mises en culture, de les conserver **à une température la plus constante possible, l'idéal pour la plupart des expérimentations in vitro se situant vers 22 – 23° C.**

La lumière est également indispensable, cependant évitez d'exposer les flacons directement au soleil ; **16 à 18 heures de lumière par jour** seront nécessaires. Des éclairages d'appoint type lampes horticoles ou lumière du jour pourront être utilisés afin de donner aux cultures l'énergie lumineuse suffisante.

MATERIEL NECESSAIRE

Pinces droites grand modèle	564 027
Scalpel	564 014
Papier joseph	703 084
Autoclave	701 349
Bain-marie 100°C	591 026
Bec bunsen	703 129
Ou Bec électrique Serenit® microbio	701 291
Ou Bec Lab microbio	701 006
Biocub®10	535 008
Ou Enceinte éclairante horticole	554 005
Complément	
Hotte à flux laminaire	792 675

8 Service après vente

Pour tout problème, veuillez contacter :

JEULIN - SUPPORT TECHNIQUE
Rue Jacques Monod
BP 1900
27 019 EVREUX CEDEX FRANCE
0 825 563 563 *
** 0,15 € TTC/ min à partir d'un poste fixe*



Culture in vitro
Milieu pour multiplication Saint Paulia 1000mL
Ref :
114 004



NOTES

Assistance technique en direct

Une équipe d'experts
à votre disposition du Lundi
au Vendredi (8h30 à 17h30)

- Vous recherchez une information technique ?
- Vous souhaitez un conseil d'utilisation ?
- Vous avez besoin d'un diagnostic urgent ?

Nous prenons en charge immédiatement votre appel pour vous apporter une réponse adaptée à votre domaine d'expérimentation : Sciences de la Vie et de la Terre, Physique, Chimie, Technologie .

Service gratuit *

0825 563 563 choix n° 3. **

* Hors coût d'appel : 0,15 € ttc / min.
à partir d'un poste fixe.

** Numéro valable uniquement pour
la France métropolitaine et la Corse.

Pour les Dom-Tom et les EFE,
utilisez le + 33 (0)2 32 29 40 50

Aide en ligne :
www.jeulin.fr

Rubrique FAQ



Rue Jacques-Monod,
Z.I. n° 1, Netreville,
BP 1900, 27019 Evreux cedex,
France

Tél. : + 33 (0) 2 32 29 40 00
Fax : + 33 (0) 2 32 29 43 99
Internet : www.jeulin.fr - support@jeulin.fr

Phone : + 33 (0) 2 32 29 40 49
Fax : + 33 (0) 2 32 29 43 05
Internet : www.jeulin.com - export@jeulin.fr

SA capital 3 233 762 € - Siren R.C.S. B 387 901 044 - Siret 387 901 04400017

Direct connection for technical support

A team of experts at your
disposal from Monday
to Friday (opening hours)

- You're looking for technical information ?
- You wish advice for use ?
- You need an urgent diagnosis ?

We take in charge your request immediatly to provide you with the right answers regarding your activity field : Biology, Physics, Chemistry, Technology .

Free service *

+ 33 (0)2 32 29 40 50**

* Call cost not included

** Only for call from foreign countries

