

TECHNIQUES ET MILIEUX DE CULTURE
UTILISES PAR LE LABORATOIRE DU VANILLIER

Note mise à jour le 1-er Juin 1961

I- SEMIS ET CULTURE SUR SOLUTIONS NUTRITIVES STERILISEES

a)- Préparation des graines: prélèvement aseptiques recommandé dans le cas de fruits petits ou immatures - quand les fruits sont normaux: dégraisser les graines au toluène pendant 5 minutes puis les laver à l'alcool à 90° pendant 2 minutes en éliminant les débris placentaires par décantations successives. Les graines sont placées dans un microplaine et rincées soigneusement à l'eau de robinet. Décapage effectué à l'eau de javel. La concentration du produit (25 à 50%) et la durée du traitement (30' à 24 heures) varient suivant l'épaisseur du tégument seminal. On admet que le traitement est suffisant quand on voit - à la loupe - blanchir les premières graines. Rinçage soigné à l'eau stérile.

b)- Désinfection des graines dans la solution antiseptique n°6 pendant 15'

SO ₄ Cu	1,5 gr.
Formol	1,5 cc
Eau	100 cc

graines et antiseptiques sont introduits dans un tube stérile à raison de 1 vol. de graines pour 25 vol. d'antiseptique environ. L'antiseptique est éliminé au bout de 20 minutes et remplacé par un égal volume d'eau stérile. Le tube de graines est agité soigneusement pendant quelques minutes et cette eau de lavage est éliminé à son tour. On la remplace par un second volume d'eau stérile, puis par un troisième.

Toutes ces manipulations sont effectuées devant la flamme d'un bec Bunsen. Le tube utilisé pour contenir les graines a 180x22. Les tubes d'eau stérile : 180x18. Les graines sont alors ensemencées à la spatule.

c)- Semis : sur milieu 17d pH-5,5 à 6 (voir formule plus loin) en tubes de 225x25, placée en étuve à 32°. Pour réduire les risques de contamination, on a intérêt à effectuer sans interruption les trois manipulations précédentes. Pour les graines hybrides V.fragrans x V. Pompona et réciproque, faire les semis sur 32u pH 5,5 ainsi que les repiquages ultérieurs. Pour ces deux milieux, doser la levure en fonction du développement du matériel végétal : 0,5‰ pour les semis, 1‰ pour les sphérules de 5mm et plus - à partir de 15mm repiquer sur B5.

d)- / ...

- d)- Contamination par le Rhizoctonia : à faire au moment des semis dans le cas des graines germant vite. Sinon, effectuer cette opération après la germination pour éviter que le milieu ne se dessèche prématurément.
- e)- Eclaircissement : Cultures effectuées à l'obscurité jusqu'à la taille de 15mm environ. Par la suite, exposer en lumière diffuse pendant un mois puis en lumière normale. Mais toujours éviter l'insolation directe.
- f)- Température : Le facteur température jouant un rôle capitale dans le déclenchement de la germination, les tubes de culture sont maintenus à 32° pendant toute cette période; ils sont laissés dans les incubateurs jusqu'à ce que les sujets les plus développés aient atteint la taille de 10 à 15mm. A ce stade seulement, il est possible de les mettre à la température ambiante.
- g)- Repiquages : Doivent être effectués tous les 2 mois au maximum sur milieu 17-d pH 5,5/6 ou sur 32u pH 5,5 jusqu'à ce que les sphérules aient atteint 15mm; on passe ensuite sur milieu B6. Les plantules deviennent difficiles à repiquer aseptiquement, quand elles atteignent la taille de 40mm et, passé ce stade, il est préférable, de ne plus les manipuler. On se contentera, si les milieux de culture sont trop secs, de les réhydrater avec 3 ou 4cc d'eau filtrée sur papier Chardin, puis stérilisée à 134° pendant 1/2 heure. On se sert pour ce travail d'une seringue de 100cc ébouillantée pendant 15 minutes.

II- LE PASSAGE EN MILIEU NATUREL

Quand les plantules ont atteint la taille de 10 à 15cm, on les repique sur le compost ci-dessous désinfecté à la chaleur humide (80° pendant 2 heures):

- Sciure de bois décomposée 1 vol.
- sable de rivière tamisé 1 vol.
- terre de bruyère tamisée 1 vol.

Quand cela est nécessaire, on sectionne les organes malades; la plantule est alors désinfectée rapidement dans une solution à 2% d'acide salicylique et lavée soigneusement. Si l'ablation a été pratiquée sur un organe souterrain, on laisse la plantule 24 heures à l'air libre avant de la mettre en terre, ceci pour que la cicatrisation s'effectue dans de bonnes conditions. La meilleure époque pour le passage en milieu naturel se situe pendant la saison chaude entre les mois d'Octobre et de Février. Il peut arriver que le compost soit envahi à la longue par une végétation adventive qui risque de compromettre le développement des jeunes vanilliers. Dans ce cas, repoter sur compost frais.

III- ENTRETIEN DES SERRES ET MESURES A PRENDRE EN CAS DE DECLAN-
CHEMENT D'UNE EPIDEMIE DE FUSARIOSE

Symptômes de la maladie; une pourriture de couleur brune évoluant très vite, apparait au collet de la plantule ou sur une racine. Les tissus atteints se liquéfient et la plantule meurt. L'épidémie pouvant se développer de façon foudroyante, il est indispensable de prendre aussitôt les mesures suivantes :

- a)- cas isolés : sortir de la serre les pots contenant des plantules atteintes - Sectionner les organes malades. Les parties restées saines sont désinfectées dans une solution à 2% d'acide salicylique puis rincées à l'eau. Les pots sont immergés pendant plusieurs minutes dans une solution concentrée de SO⁴ Cu et lavés à grande eau. Rempoter sur compost frais désinfecté à la chaleur humide - Remettre en place.
- b)- cas fréquents, en nombre croissant : Appliquer les mesures ci-dessus à toutes les plantules contenues dans la serre où l'épidémie s'est déclarée. Examiner chaque plantule, sectionner les parties malades et douteuses, désinfecter soigneusement les parties saines et les pots. Arroser copieusement les murs et les paillasse de la serre avec une solution très concentrée de SO⁴ Cu. Le compost utilisé pour les repotages sera désinfecté à la chaleur humide plus énergiquement que de coutume (80° pendant 3 heures).

IV- ISOLEMENT ET CULTURE DU RHIZOCTONIA REPENS

Il y a quelques années, le symbiote du Vanillier était extrait des racines de la V. Fragrans ou des sphérules issues de semis naturels de V. Madagascariensis; dans ce dernier cas, il était nécessaire de vérifier l'identité de la souche isolée, car l'espèce V. Madagascariensis peut héberger une autre forme de Rhizoctonia qui ne contamine pas la V. Fragrans. Aujourd'hui pour obtenir le symbiote, on utilise de jeunes plantules issues de semis, ayant séjourné en serre pendant un an et possédant à la base de la tige une racine principale nettement tubérisée. Le champignon se trouve en grande abondance et dans ces conditions, l'extraction du symbiote devient une manipulation simple.

En pratiquant quelques coupes à main levée dans les échantillons que l'on se propose d'ensemencer et en les colorant au Bleu C4B, on s'assure de la présence du symbiote. Si l'examen est positif, les échantillons sont brossés soigneusement, lavés et découpés en petits tronçons.

Ces/.....

Ces fragments sont mis dans un capsule d'eau stérile, passés rapidement à l'alcool, flambés et remis dans un erlenmeyer contenant 100cc d'eau stérile environ. Les échantillons sont alors placés dans un tube stérile - on y verse une solution de Hg Cl₂ 1% que l'on retire 45" après, on élimine les traces de Bichlorure de Mercure avec quatre lavages à l'eau stérile effectués par transvasements successifs sans toucher aux échantillons; on les ensemence à la spatule sur m 17-d. Après isolement, la souche est purifiée sur 23a. Avant d'utiliser cette nouvelle souche, il est prudent de l'inoculer sur les différents milieux de culture pour contrôler, dans chaque cas, son développement végétatif. Il arrive en effet que des souches donnant satisfaction sur les décoctions ligneuses prennent sur B6 un développement exagéré préjudiciable aux vanilliers. Il est également recommandé de vérifier les virulences de cette souche sur sphérules vierges. Si les résultats de ces deux tests sont positifs, la souche sera repiquée sur m.23a pour utilisation en grand. Les souches dégénérent assez facilement, il est nécessaire de faire un nouvel isolement chaque année.

V- SOLUTIONS NUTRITIVES UTILISEES

a)- milieux empiriques

- 17d : sciure de bois décomposée tamisée: 125 gr.
- terreau : 20 -
- eau : 1000 cc
- ébullition à feu doux pendant 30 minutes; en filtre sur coton puis on ajoute :
- sucre de canne : 20 gr
- levure 0,5 à 1 -
- gélose 15 -
- fusion, répartition - stérilisation à 120° pendant 20 minutes
- pH voisin de 6.

Ce milieu est peu favorable au développement des champignons et des bactéries. On utilise le milieu 17d 0,5% de levure pour les semis et le 1-er repiquage. Pour les repiquages suivants, on utilise le milieu 17-d 1% de levure jusqu'à ce que le matériel végétal ait atteint la taille de 15 - 20mm. A ce stade on repique sur milieu B6

- B6 : Sciure de bois, décomposée, tamisée: 250 gr
- Eau : 1000 cc
- Ebullition à feu doux pendant 30', puis on ajoute
- Levure : 1 gr
- Sucre de canne : 20 -
- Phosphate bi-ammonique : 1 -
- Gélose : 17 -
- fusion, répartition, stérilisation à 120° pendant 30' - pH voisin de 6
- Ce / ...

Ce milieu est utilisé pour le repiquage des plantules ayant atteint la taille de 15 - 20mm . Il est conservé jusqu'au passage en milieu naturel.

- 23a : pulpe de pomme de terre rapée 100 gr.
- Eau 1000 cc
- macération pendant 2 heures suivie de filtration sur coton - on ajoute
- glucose 20 gr.
- gélose 30 -
- ébullition à feu doux pendant 5 minutes, filtration sur coton, repartition, stérilisation à 120° pendant 15'

Ce milieu est utilisé pour le repiquage du Rhizoctonia.

b)- Milieus synthétiques

- 32u : Nitrate de Calcium 1000mg
- Chlorure de Potassium 500 -
- Sulfate de Magnésium 250 -
- Nitrate de Sodium 50 -
- Sulfate ferreux 10 -
- Sulfate de Manganèse 7 -
- Phosphate monopotassique 0 à 1000 suivant pH
- Saccharose 20.000 -
- Levure 500 à 2.000 -
- Eau q.s.p. 1000 cc
- Gélose 20.000 mg

La teneur en levure est d'autant plus forte que le matériel est plus développé. Elle est de :

- 500 mg/l. dans le 32u3 (graines et sphérules)
- 1000 mg/l. dans le 32u5 (petites plantules)

L'ajustement au pH désiré est obtenu par modification de la teneur en phosphate monopotassique

pas de	Phosphate monopotassique	pH 32u :	6,3/6,4
100 mg	"		5,8
200 -	"		5,7
300 -	"		5,6
500 -	"		5,5
700 -	"		5,4
900 -	"		5,3
1100 -	"		5,2

Ce milieu, ajusté aux pH 5,5 à 6,1 convient aux Vanilliers, cependant en raison du temps réclamé par sa préparation, il n'est utilisé que pour les graines hybrides V. fragrans x V. Pompona et réciproque jusqu'à la taille de 15 à 20mm. Au delà de cette taille, les plantules sont repiqués sur B6.

c)- .../...

c)- Milieux inertes

sable de rivière : en boîte de Pétri, couche de sable de rivière stérilisé; de 5mm d'épaisseur, recouverte d'une rondelle de papier filtre, humidifié au minimum et maintenu à 32°; milieu préconisé quand il est nécessaire de manipuler les graines au moment de la germination. Après quoi, on repique le matériel végétal sur les solutions habituelles.

Il est également possible de faire germer les graines sur gel de silice préparé selon la méthode de Winogradsky.

Tonnier Jean-Pierre.

Techniques et milieux de culture utilisés par le Laboratoire du vanillier.

Ivoloïna : IRAM, 1961, 6 p. multigr.