

## Kit fusion des propoplastes Réf. FUSION.

### A RECEPTION DU COLIS :

- Vérifier la composition** du colis indiquée ci-dessous
- Stocker** l'ensemble du kit à température ambiante.
- Avant toute manipulation, étudier la fiche sécurité**

### COMPOSITION

- |                                      |             |
|--------------------------------------|-------------|
| - 40 g de Poly Ethylène Glycol (PEG) | Sachet FUS1 |
| - 0,2 g de glucose                   | Sachet FUS2 |
| - 0,15 g de Nitrate de Calcium       | Sachet FUS3 |

### MATERIEL NECESSAIRE

- Chou rouge et poireau frais

### **NOTE :**

Avant de réaliser la fusion de protoplastes, il est nécessaire de les isoler. Pour ce faire, nous proposons un kit d'obtention de protoplastes (Référence PROT1).

Ce kit de fusion des protoplastes s'utilise en complément du kit d'obtention des protoplastes.

Nous vous proposerons un protocole complet pour l'obtention et la fusion de protoplastes de chou rouge et de poireau. Pour réaliser ce protocole, il est nécessaire de disposer des kits d'obtention et de fusion.

Le chou rouge et le poireau ont été sélectionnés pour leur facilité à différencier les protoplastes (verts pour le poireau du fait de la présence de chlorophylle dans les chloroplastes et rouges pour le chou du fait de la présence d'anthocyanes dans les vacuoles).

### PREPARATION

#### OBTENTION DE PROTOPLASTES

- Préparer la solution d'obtention de protoplastes (voir notice du kit obtention).

#### **Préparation du poireau :**

Découper des fragments de feuille de poireau bien verte de 1cm<sup>2</sup>, enlever l'épiderme (coté terne...) à l'aide d'une petite pince pointue puis déposer les fragments immédiatement coté épiderme enlevé sur le mélange enzymatique. Continuer jusqu'à recouvrir entièrement la surface.

#### **Préparation du chou rouge :**

Découper des lamelles tangentielles fines dans une feuille de chou et placer immédiatement dans le mélange enzymatique, la face sectionnée contre la solution.

- Incuber 1h30 à 37°C, 3h00 à 25°C ou une nuit à température ambiante.

## MANIPULATION

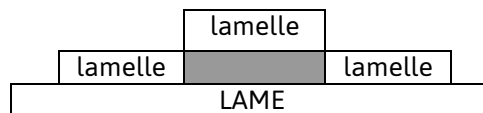
### OBSERVATION

Afin de conserver l'intégrité des protoplastes, il est nécessaire de fabriquer une **chambre d'incubation** composée d'une lame en verre et trois lamelles :

- Sur une lame en verre, disposer deux lamelles de la façon suivante :



- Déposer une goutte de la solution d'incubation entre les deux lamelles puis recouvrir d'une autre lamelle sans effectuer de pression :



- Observer au grossissement X400.

**Note :** L'épaisseur des lamelles par rapport à la lame n'est pas proportionnelle.

### FUSION DE PROTOPLASTES

- Préparer la solution :
  - o Préparer 100 ml de tampon pH7
  - o Ajouter le contenu des trois sachets FUS1, FUS2 et FUS3.



La solution se conserve congelée.

- Dans une **chambre d'incubation** (voir fabrication ci-dessus en partie 5), déposer une goutte de suspension de protoplastes de poireau et une goutte de suspension de protoplastes de chou.
- Mélanger délicatement avec la pointe d'une pipette.
- Ajouter une goutte de la solution de fusion.
- Recouvrir d'une lamelle et observer immédiatement.
- Lorsque vous observez deux protoplastes de chou et de poireau accolés, restez sur ce champ d'observation en attendant la fusion complète.

### **FICHE SECURITE (guide non exhaustif)**

Le PEG et le glucose ne requièrent pas de précautions d'utilisation particulières. Nous vous recommandons tout de même d'utiliser des gants pour éviter toute source d'allergie.

Ne pas ingérer. En cas de contact direct avec les yeux ou la peau rincer abondamment à l'eau claire.

Produit	Pictogramme et risques normalisés	Actions à mener en cas			
		De contact avec la peau	d'inhalation	de projection dans les yeux	d'ingestion
Nitrate de Calcium	 Comburant  Irritant	Rincer abondamment à l'eau claire. Si des troubles apparaissent, consulter un médecin.	Donner de l'air frais. Assistance respiratoire si nécessaire. Si les troubles persistent, consulter un médecin.	Laver avec de l'eau en écartant les paupières plusieurs minutes. Si des troubles apparaissent, consulter un médecin.	Rincer abondamment la bouche avec de l'eau. Ne pas faire boire. Si des troubles apparaissent, consulter un médecin.

### **FICHE CONSERVATION**

Le glucose, le PEG et le nitrate de sodium se conserve à température ambiante, à l'abri de la lumière, pendant 6 mois environ.

Veillez à ne pas introduire de contaminant dans la solution de glucose lors de vos manipulation ; utilisez des outils stériles ou à usage unique.

### **FICHE TRI ET RECUPERATION**

Le glucose, le PEG et le nitrate de sodium peuvent être jetés à l'évier avec de grandes quantités d'eau.