

Kit pomme de terre CIV

Réf. POMDT.

CONSERVATION

1 mois à 4°C

GENERALITES

Totipotence des cellules végétales :

In vitro, les cellules végétales possèdent la particularité de pouvoir se dédifférencier (elles sont alors comparables à des cellules embryonnaires).

A partir de ces cellules indifférenciées, il est possible d'obtenir une nouvelle plante ou d'induire la différenciation en un certain type cellulaire.

Notez que la régénération d'une plante complète est un phénomène complexe.

Les facteurs de croissance et leurs proportions dirigent l'organogenèse, c'est ce que nous allons tenter de mettre en évidence lors des manipulations proposées.

Importance de la stérilité :

Les phénomènes biologiques que nous allons tenter de mettre en évidence sont possibles si les conditions de stérilité sont bien respectées, en effet dans la nature, la nécrose cellulaire empêcherait la réalisation des expériences mises en œuvre.

Cals :

Tissu néoplasique, stade de prolifération cellulaire comparable à des cellules cancéreuses.

Les cellules d'un cal sont propices à la différenciation.

Infections :

Les cultures sont longues et les milieux relativement riches, c'est pourquoi le risque de voir apparaître un contaminant est important.

Les causes de contaminations sont nombreuses :

Lors de la manipulation, les conditions de stérilité doivent être rigoureusement respectées.

L'air ambiant est porteur de germes qui peuvent se déposer si les mouvements d'air sont importants et les milieux mal protégés.

Explant mal stérilisé.

Le milieu de culture :

Les milieux de culture sont complexes, ils sont constitués de :

- vitamines
- microéléments
- macroéléments
- gélose (agar)

Et peuvent être supplémentés de :

- sucres
- facteurs de croissance

Le développement du végétal est influencé par la répartition des facteurs de croissance et les conditions du milieu de culture. En général :

Quand le rapport Auxines/Cytokinines >1 , la rhizogénèse est stimulée.

Quand le rapport Auxines/Cytokinines <1 , le bourgeonnement est stimulé.

CONDITIONS DE STERILITE LORS DES MANIPULATIONS :

QUELQUES REGLES SIMPLES

- nettoyage de la paillasse à l'alcool ou à l'eau de javel
- travail dans un rayon de 30 cm autour de la flamme d'un bec bunsen

La flamme d'un bec bunsen permet de créer un cône de stérilité d'une trentaine de centimètre de diamètre quand celle-ci mesure 7 à 10cm de haut.

Le bec bunsen doit être placé au milieu de la paillasse et toutes les manipulations réalisées à proximité.

- mains passées à l'alcool jusqu'aux poignets et entre les doigts, port d'une blouse en coton
- instruments et milieux stérilisés ouverts et utilisés autour de la flamme
- ne pas poser le matériel sur la paillasse ni toucher le col des tubes ou la partie du matériel qui sera en contact avec le matériel végétal, les milieux ou les solutions
- éviter les mouvements brusques, ne pas parler devant des boîtes ouvertes
- Les instruments sont régulièrement stérilisés à l'alcool et à la flamme au cours de la manipulation
- pot avec alcool pour stériliser le matériel

Attention, l'alcool s'enflamme très rapidement, le pot à alcool doit être métallique si possible et impérativement muni d'un couvercle pour priver le feu d'oxygène au cas où l'alcool s'enflammait.

Ce réflexe doit être appris aux élèves avant toute manipulation !!

NB : une technique pratique permet de distribuer le matériel aux élèves tout en conservant sa stérilité : il suffit de stériliser une dizaine de serviettes en papier (type essuie-main) enveloppées dans une feuille de papier aluminium = champ stérile. Fournir à chaque binôme un champ stérile, ainsi il suffit de glisser le matériel entre les deux premières serviettes (première épaisseur) et il reste stérile. De plus chaque binôme disposera de 10 serviettes donc au fur et à mesure de la manipulation, les élèves auront la possibilité de se servir de plusieurs épaisseurs pour poser leur matériel.

Remerciements à Marie-Jeanne Pellerin – Lycée Charles Le Chauve de Roissy en Brie pour la partie manipulation en conditions stériles...

KIT POMME DE TERRE

A RECEPTION

Conserver les milieux au réfrigérateur dès réception du matériel et ce jusqu'au TP.

Les auxines sont très rapidement dégradées, il convient donc de manipuler dans les deux semaines suivant la réception du kit.

COMPOSITION

Milieux :

- 300 ml de milieu minéral Pomme de terre sans facteur de croissance - **P1**
- 300 ml de milieu minéral Pomme de terre + Auxines à 1 mg/L - **P2**
- 300 ml de milieu minéral + Cytokinines à 1 mg/L + Auxines à 1 mg/L - **P4**
- 300 ml de milieu minéral + Cytokinines à 1mg/L - **P3**

Option :

80 tubes de cultures adaptés à la culture des germes de pomme de terre.

MATERIEL NECESSAIRE

Pommes de terre à longs germes (2 mois dans un carton à l'obscurité qui favorise leur allongement).

Scalpels stériles, pinces stériles, *Domestos*, alcool.

Pour la stérilisation du matériel, se reporter à la partie « généralités ».

PREPARATION

-Si le matériel dont votre établissement dispose le permet, nous conseillons fortement de préparer un ou deux champs stériles (voir « généralités ») contenant une dizaine de feuilles de papier essuie-main par binômes. Ces champs stériles permettront de poser le matériel végétal lors de l'étape de découpe.

-Préparer une soixantaine de bains d'eau stérile (si possible) = Petits pots de bébé avec couvercles remplis d'eau stérile (stérilisation à l'autoclave ou cocotte-minute 20 minutes à 120°C ou encore à l'étuve sèche 30 minutes à 130°C).

-Préparer les tubes de milieu de culture :

Couler 20 tubes de 15 ml de milieu P1, 20 de P2, 20 de P3 et 20 de P4 :

Faire chauffer les bouteilles de milieu au bain-marie bouillant (eau jusqu'au col de la bouteille) jusqu'à totale dissolution (30 à 60 minutes). Penser à dévisser légèrement le bouchon pour éviter l'explosion. Laisser légèrement refroidir, puis verser le milieu dans les tubes (de préférence avec une pipette stérile). Ne pas visser les bouchons à fond, laisser refroidir le milieu jusqu'à la solidification puis visser les bouchons à fond.

Attention : Les auxines et cytokinines sont des produits thermolabiles, il ne faut surtout pas chauffer trop fort les milieux. Surveiller les milieux pour éviter l'ébullition.

Conserver au réfrigérateur jusqu'au TP.

Astuce : Etiquetez les tubes avant de couler le milieu avec les annotations P1, P2, P3 et P4.

Les milieux doivent être coulés devant la flamme d'un bec bunsen.

Ne pas couler les milieux plus de quatre jours avant le TP pour conserver au mieux les facteurs de croissance.

MANIPULATION

1) Préparation du matériel biologique :

Laver les germes de pomme de terre à l'eau du robinet le mieux possible puis installez-les dans un bain de Domestos dilué à 20%. Laisser 15 minutes afin de les stériliser.

Le Domestos à une action antifongique et antibactérienne.

2) Prélèvement des germes de pomme de terre et découpe :

DESORMAIS MANIPULER EN CONDITIONS STERILES

Cette étape réclame une attention particulière, les risques de contaminations sont importants et risquent de faire échouer la manipulation.

Les instruments (pince ou scalpels) doivent être rigoureusement stérilisés et les règles de stérilité suivies à la lettre (voir chapitre généralités).

Plusieurs types de contaminants peuvent apparaître :

- Moisissures reconnaissables par la présence de mycélium (filaments cotonneux blanchâtre ou grisâtre). Dès qu'un contaminant de ce type apparaît, il vaut mieux écarter la culture concernée car le reste des cultures pourrait être rapidement contaminé.
- Bactéries présentant un aspect laiteux et se développant en colonies parfois colorées. Ce type de contaminant est moins grave, cependant l'élève ne doit pas être en contact avec ce micro-organisme qui pourrait être pathogène. Parafilmer le tube concerné.

Si le contaminant apparaît au pied de l'explant végétal, la stérilisation du végétal n'a pas été parfaitement réalisée.

Si le contaminant est sur le milieu, le manipulateur peut être soupçonné.

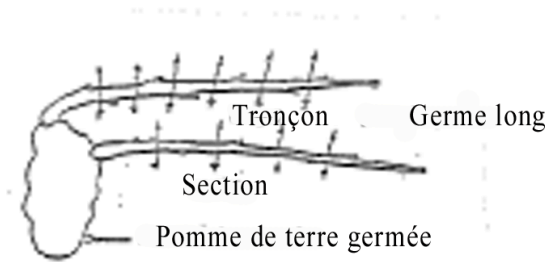
A l'aide d'une pince stérile, prélever les germes de pomme de terre et leur faire subir trois bains successifs de 5 minutes dans l'eau stérile (3 bains différents).

Il est impératif d'éliminer totalement le détergent qui serait toxique pour la culture.

Déposer les germes dans des boîtes de pétri stériles ou des champs stériles.

Autre astuce (mais moins efficace) : En absence de champ stérile, il convient de stériliser du papier aluminium sur une face grâce à de l'alcool et une flamme puis de poser le plant de tabac sur la face stérilisée. Travailler ensuite en recouvrant le plant de tabac avec un autre papier aluminium stérilisé de la même façon.

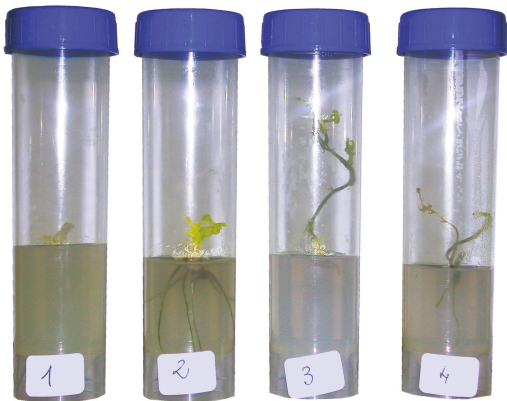
A l'aide d'un scalpel stérile, découper le germe en tronçons (comme sur le schéma ci-dessous) en repérant le bas et le haut.



3) Ensemencement

Installer les tronçons tête en haut dans les quatre tubes P1 à P4 à l'aide d'une pince stérile. Enfoncer dans la gélose d'un tiers de leur longueur. Fermer les tubes.

INTERPRETATION DES RESULTATS



Résultats attendus :

Milieu P1 : Sans facteurs de croissance, ne permet pas de développement. Si il y a croissance c'est que les germes contenaient des facteurs de croissance endogènes.

Milieu P2 : Développement de racines favorisé par la présence d'auxines.

Milieu P3 : Croissance des bourgeons induite par la présence de cytokinines.

Milieu P4 : Développement de racines et tiges. Il a même été obtenu des mini-pommes de terre au bout de trois mois de culture au lycée Charles Le Chauve (Roissy en Brie).

NOTE :

Si on manipule avec des germes récents, ils sont courts et possèdent leurs propres hormones, les résultats seront observables mais différents des résultats théoriques. Il est possible d'obtenir les résultats inversés.