

Kit tabac CIV

Réf. TABAC.

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

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'au 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 Brigitte Maurel – BTS Technologique Decazeville pour ses précieux conseils et l'élaboration du protocole du kit Carotte...

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

KIT TABAC

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.

Les plants de tabac sont conservés à température ambiante, à la lumière du jour et dans un endroit propre ni trop sec ni trop humide.

COMPOSITION

Matériel obligatoire :

-400ml de milieu Murashige et skoog + AIA à 1mg/L noté **MSA**

-400ml de milieu Murashige et skoog + AIA à 1mg/L + BAP à 1mg/L noté **MSAC**

-400ml de milieu Murashige et skoog + AIA à 0,1mg/L + BAP à 1mg/L noté **MSEL**

-3 plants de tabac stériles

Options :

-75 boîtes de pétri stériles diamètre 90mm

MATERIEL NECESSAIRE

Scalpels stériles, pinces stériles, eau de javel, 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 les feuilles de tabac lors de l'étape de découpe.

-Préparer les boîtes ou tubes de milieu de culture :
Couler 20 boîtes (ou 20 tubes) de milieu **MSA**, 20 de **MSAC** et 20 de **MSEL**.
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 couler 20 boîtes pour 400ml. Laisser refroidir le milieu jusqu'à la solidification.
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.

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) Prélèvement des plants de tabac et découpe des feuilles

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 la boîte ou 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...

Allumer le bec bunsen et manipuler désormais dans le cône de stérilité.

Utiliser une pince stérile (si possible recourbée à l'extrémité) pour déraciner le plant de tabac.

Placer le plant de tabac entre deux feuilles d'un champ stérile.

Note : 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, séparer les feuilles de la tige.

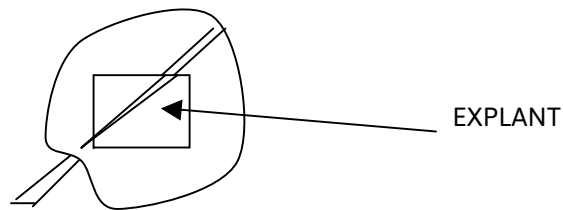
Les feuilles serviront ensuite aux élèves.

2) Découpe des explants

Les feuilles de tabac sont placées entre deux feuilles de papier d'un champ stérile ou comme ci-dessus entre deux feuilles de papier aluminium stérilisées.

Découper avec un scalpel stérile des carrés de 0,7cm à 1cm de côté dans les feuilles de tabac, la nervure médiane de la feuille doit être au centre de l'explant.

Schéma :



Trois carrés seront nécessaires par binôme.

Utiliser un scalpel bien aiguisé et découper en appuyant avec la lame et non par un mouvement transversal, vous risqueriez de découper également la feuille de papier essuie-tout (ou aluminium) et ainsi mettre en contact la feuille de tabac et le plant de travail.

3) Ensemencement des explants

Chaque binôme disposera de trois boîtes (ou tubes) de milieu :

- 1 boîte de milieu **MSA**
- 1 boîte de milieu **MSAC**
- 1 boîte de milieu **MSEL**

A l'aide d'une pince stérile, déposer un explant de tabac par boîte de milieu, à plat et en prenant soin de placer vers le haut la face de la feuille dirigée vers le ciel dans la nature.

Placer les boîtes (ou tubes) à la lumière du jour et à température ambiante dans un endroit très propre pendant trois semaines à un mois. Le Parafilm n'est pas conseillé car il limite les échanges gazeux mais il peut être une solution au cas où les risques de contamination semblent important lors des trois semaines de cultures.

INTERPRETATION DES RESULTATS

Observable au bout de trois semaines à un mois.



MSA : L'explant de tabac va se développer et les auxines vont induire la croissance de racines.



MSAC: De la même manière, l'explant va se développer et les facteurs de croissance vont induire la formation de cals (amas de cellules indifférenciées).



MSEL: Développement de bourgeons. (cette étape peut s'avérer plus longue que les autres)

Cette expérience démontre que les facteurs de croissance dirigent l'organogenèse du végétal en induisant la différenciation cellulaire. C'est la proportion des facteurs de croissance qui détermine la différenciation.

La cellule végétale est totipotente, c'est à dire qu'il est possible, in vitro, de reconstituer une plante complète à partir d'une cellule.