

TP N°2 : la multiplication des plantes herbacées in –vitro

Modèle : Pomme de terre (*Solanum tuberosum*)

II- Désinfection des explants en conditions aseptiques

- **But du TP** : Illustration du protocole de désinfection de germes de pomme de terre en conditions aseptiques

1- Matériel :

- Pomme de terre germée ;
- béciers de 50 ml ;
- Hotte à flux laminaire ;
- Bec bunsen ;
- Scalpels à lames interchangeables ;
- Pincés inox de 13 cm de longueur ;
- Tubes dotés de milieu de culture stérile ;
- Plaque en verre de 30 cm² ;
- Barre en verre ;
- Etiquettes autocollantes.
- Papier filtre stérile.

2- Produits chimiques

- l'hypochlorite de calcium à 1% (Eau de javel) ;
- Eau distillée stérile ;
- l'éthanol à 70%

3- Mode opératoire :

- Se laver soigneusement les mains avec un antiseptique et les laisser sécher ;
- Allumer la hotte et désinfecter le plan travail et les parois latéraux avec l'hypochlorite de sodium (l'eau de javel) ou par de l'éthanol à 70° ;
- Placer le bec bunsen au centre du plan de travail et l'allumer pour avoir une flamme bleue (sans que sa flamme dépasse 10 cm) ;
- Placer le matériel nécessaire dans la hotte sans création d'encombrement, et en laissant de l'espace pour la manipulation ;

Les explants sont des germes de tubercules de 0.5 à 1cm qui sont stockés dans l'obscurité pendant un mois, la stérilisation de ces explants se fait selon le protocole suivant :

- ✓ Mettre les explants dans l'éthanol à 70% pendant 30 secondes;
- ✓ Mettre ces explants dans une solution hypochlorite de calcium à 1% pendant 15 minutes;
- ✓ Rincer avec l'eau stérile 3 à 4 fois pendant 3 minutes ;
- ✓ Laisser les explants dans l'eau stérile jusqu'au repiquage dans les tubes.

3- Ensemencement des explants :

Avant de commencer la manipulation, on se lave les mains avec du savon suivi de l'alcool à 70°. On prépare la hotte par stérilisation et la mise en marche de la ventilation. On prépare tout le nécessaire et on laisse la hotte fonctionner pendant 30 minutes avant de commencer l'ensemencement des explants.

On ajoute les vitamines et les hormones filtrées au milieu de culture autoclave, puis on le coule dans les tubes de culture. On fait la stérilisation des explants sous la hotte selon la nature de l'explant ; on réduit la taille de chaque explant pour la pomme de terre (0.5 cm à 0.8 cm).

Le repiquage des explants sur les milieux de culture est effectué à l'aide de pince Stérilisée et près de la flamme du bec bunsen, tout en flambant l'ouverture du tube avant et après l'opération sous la hotte.

7 - Incubation des explants :

7- 1 - Dans les tubes :

Les conditions environnementales fréquemment utilisées sont 20 à 28° C, sous la lumière fluorescente à raison de 16 heures jour /8 heures nuit pour une intensité utilisée de l'ordre de 300 lux.

4- Acclimatation :

Les vitro plants développés sur les milieux ont réussi à avoir un développement important de la partie aérienne et la partie racinaire. Ils ont été transférés dans des pots contenant de la vermiculite et du sable stérile.

Le premier arrosage est assuré par une solution nutritive stérile.

Les pots sont posés par la suite dans un dessiccateur ou l'on met dans sa partie inférieure une quantité d'eau de robinet, pour créer une atmosphère humide, car les stomates des jeunes vitro plants sont ouverts pendant la phase d'incubation.

L'arrosage est réalisé avec de l'eau de robinet régulièrement dès la deuxième semaine.