

## Kit carotte CIV

Réf. C/CAROT.

### CONSERVATION

1 mois à 4°C

### 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 cals de carottes 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 Gamborg noté **GA** (nécessaire pour l'étape d'obtention de cals seulement)

-400ml de milieu Gamborg + AIA à 1mg/L noté **GAA**

-400ml de milieu Gamborg + AIA à 1mg/L + BAP à 1mg/L noté **GAAC**

#### Options :

-4 cals de carotte

-75 boîtes de pétri stériles diamètre 90mm

### MATERIEL NECESSAIRE

Dix belles carottes bien fraîches.

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 la carotte lors de l'étape de découpe.

-Préparer une solution d'hypochlorite de calcium de 5 à 7% (utiliser de l'eau de javel, la concentration en hypochlorite de calcium est généralement indiquée, il suffit de faire un simple calcul de dilution). Cette solution servira à la stérilisation des tissus.

Note : Diluer avec de l'eau déminéralisée.

-Préparer les boîtes ou tubes de milieu de culture :

1) Pour les professeurs désirant réaliser l'étape d'obtention des cals, couler 20 boîtes de pétri (ou 20 tubes) de milieu **GA** (les autres milieux sont conservés au réfrigérateur et coulés pour la deuxième séance une fois que les cals sont obtenus) :

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.

Conserver au réfrigérateur jusqu'au TP.

2) Préparation des milieux pour le repiquage des cals :

Couler 20 boîtes (ou 20 tubes) de milieu **GAA** ainsi que 20 boîtes (ou tubes) de milieu **GAAC**

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.

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

## MANIPULATION

### 1) Obtention de cals

Cette étape est supprimée si les cals de carotte sont commandés mais cependant conseillée car elle permettra de familiariser les élèves aux conditions de manipulation stérile)

Les cultures contaminées peuvent être témoins d'un manque de soin :

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...

Peler les carottes afin de supprimer l'épiderme.

Couper les extrémités de la carotte puis la plonger dans la solution de javel précédemment préparée pendant une vingtaine de minutes afin de stériliser les tissus. La carotte doit blanchir.

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

Rincer ensuite par deux bains successifs d'eau stérile de dix minutes en transvasant les carottes à l'aide d'une pince stérile.

Pour les étapes suivantes, les champs stériles sont très pratiques...

Placer la carotte entre deux épaisseurs de papier stérile dans le champ stérile puis à l'aide d'un scalpel stérile supprimer toutes les parties blanchies par la javel, elles s'avèreraient toxiques pour les cultures.

Placer alors la carotte entre deux épaisseurs de papier (plus loin) pour séparer les parties blanchies du reste de la carotte.

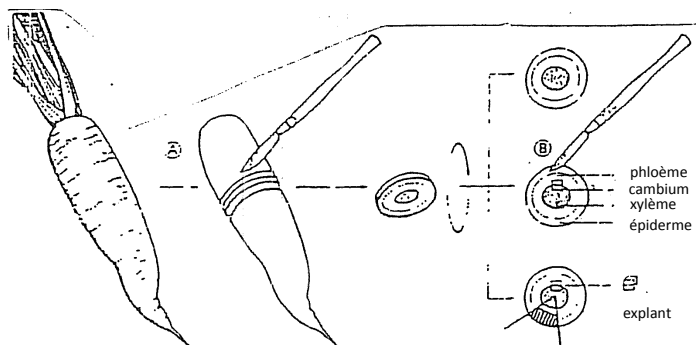
**Note :** En absence de champ stérile, il convient de stériliser du papier aluminium sur une face grâce à de l'alcool et une flamme puis de poser la carotte sur la face stérilisée. Travailler ensuite en recouvrant la carotte avec un autre papier aluminium stérilisé de la même façon.

Repérer le haut et le bas de la carotte (haut=coté feuille) car nous allons découper un morceau de carotte qui sera ensemencé sur le milieu dans le même sens que dans la nature (coté feuille vers le haut...) pour éviter l'action des auxines naturelles.

Découper en tranches fines (0,5cm d'épaisseur) tout en conservant les repères pris ci-dessus.

Découper selon le schéma suivant des explants de carotte

Schéma :



Ensemencer sur le milieu **GA**, puis placer à la lumière du jour et à température ambiante dans un endroit très propre pendant un mois à cinq semaines. Le Parafilm n'est pas conseillé car il limite les échanges gazeux mais il peut être une solution en cas où les risques de contamination semblent important lors des trois semaines de cultures.

Un mois plus tard, les cals se sont développées et peuvent être utilisés (cals = amas de cellules vertes).

## 2) Repiquage des cals sur les différents milieux

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).

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

- 1 boîte de milieu **GAA**
- 1 boîte de milieu **GAAC**

Prélever un morceau de cal de carotte à l'aide d'une pince stérile et d'un scalpel stérile, ensemer sur milieu **GAA** puis faire de même pour le milieu **GAAC**.

A partir de quatre cals de carotte, il faut ensemer 40 boîtes (20 **GAA** et 20 **GAAC**).

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

Sur milieu **GAAC**, les cals de carotte prolifèrent simplement durant les trois semaines de culture.

Sur milieu **GAA**, on voit apparaître des racines au bout de trois semaines à un mois.

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.