

Kit germination de pollen et mise en place du tube pollinique

Réf. C/POL

A RECEPTION DU COLIS :

- ☑ **Vérifier la composition** du colis indiquée ci-dessous
- ☑ **Stocker** les articles du colis dans les bonnes conditions :
 - Ouvrir le sachet principal
 - 📍 Placer le flacon noté « milieu de culture » à **+ 4°C** 📍
 - 📍 Placer le sachet noté « A » à **température ambiante** 📍
- ☑ **Avant toute manipulation, étudier la fiche sécurité**

COMPOSITION DU COLIS :

- 1 **flacon** noté « **milieu de culture** » à stocker à **+4°C**
- 25 compte-gouttes
- 25 boîtes de culture
- 1 tube de 10 mL d'eau stérile
- 2,50 m de Parafilm

MATERIEL NECESSAIRE :

- Film étirable
- Lames à concavité
- Eprouvette de 100 mL
- Feutres permanents
- Micro-ondes ou éventuellement bain-marie
- Gants
- Eau distillée
- Gant anti-chaleur ou manique de préhension
- Papier absorbant
- Paire de ciseaux
- Ciseaux fins droits
- Pinces fines
- Fleurs fraîches matures : lys ou tulipes bien ouverts venant d'un fleuriste ou encore fleurs de prunus (fleurs sauvages poussant près du sol déconseillées)
- Pissettes
- Verres de montre
- Microscope grossissement x 40 (et éventuellement x 100)
- Ethanol

MATERIEL CONSEILLE :

- Caméra numérique

OBJECTIFS COGNITIFS

Le TP se déroule en plusieurs étapes :

Dissection des pièces florales pour récupérer les grains de pollen

Mise en culture des grains de pollen sur milieu de culture

Observation des grains de pollen

Observation des tubes polliniques après quelques heures ou jours de culture selon le degré de maturation et la nature des grains de pollen choisis

RAPPELS

Les tubes polliniques :

Les grains de pollen sont les gamétophytes mâles des fleurs contenant deux gamètes mâles (voire 3) chacun. Ils sont contenus dans les sacs polliniques (formant les anthères) qui se déchirent pour les laisser sortir quand ces derniers sont mûrs. Le grain de pollen va être transporté par différents moyens (anémogamie, entomogamie, hydrogamie ou zoogamie). Lorsqu'il entre en contact avec le pistil de la gynécée d'une fleur (assez visqueux pour retenir les grains), le grain de pollen germe : il gonfle car il est en présence d'eau et de sucres dans les bonnes proportions puis le tube pollinique se forme (extension de l'intine du pollen par l'un des pores germinatifs du grain) et se renforce au fil de sa croissance. Le tube pollinique est dirigé dans le tissu du style de la fleur par un système d'interstices prévus à cet effet entre les cellules de la partie femelle. De cette manière, le tube est guidé à travers le style, vers l'ovule de la fleur de manière à véhiculer les gamètes mâles (noyaux végétatif et reproducteur). Il y a alors fécondation simple ou double si les gamètes mâles et femelles sont bien compatibles.

☐NB☐ : Dans le TP proposé, il est question d'observer la formation du tube pollinique (il est possible d'observer les noyaux végétatif et germinatif quand le pollen est de taille suffisamment importante et que le microscope est de bonne qualité). Il est préférable de ne pas émettre d'hypothèses quant à l'orientation des tubes polliniques : en effet, un ouvrage récent en biologie végétale a prouvé qu'il n'y avait pas de chimiotactisme dirigeant la croissance du tube pollinique vers l'ovule de la fleur.

👁️ **ATTENTION** 👁️ : utiliser des fleurs de tulipe de fleuriste ou des lys de fleuriste (bonne qualité de pollen) ou encore des fleurs de prunus. Il est vivement déconseillé de choisir des fleurs sauvages poussant près du sol car elles sont couvertes de nombreux contaminants (spores...) qui auront tendance à se développer au dépend des tubes polliniques !

PREPARATION

PREPARATION DE LA SALLE :

Disposer pour les élèves :

- des lames à concavité simple ou double passées à l'alcool
- des compte-gouttes en plastique
- du papier absorbant
- des paires de ciseaux passées à l'alcool
- des pinces fines et des ciseaux droits fins passés à l'alcool
- des feutres permanents
- des boîtes de culture
- des fleurs fraîches matures (étamines déhiscentes, grains de pollen sur le point de tomber) : il est conseillé de prendre des fleurs de lys ou des tulipes de fleuriste (meilleure qualité de pollen) bien ouvertes. Il est aussi possible de choisir des fleurs de prunus bien épanouies (au printemps). Il est vivement déconseillé d'utiliser des fleurs sauvages poussant près du sol.
- des microscopes (grossissement x 40 à x 100)
- des pissettes d'eau distillée
- des verres de montre passés à l'alcool
- du film étirable de type Parafilm

PREPARATION DU MILIEU DE CULTURE (JUSTE AVANT LE TP) :

- Enlever le bouchon du flacon contenant le milieu de culture
- Mettre le flacon au micro-onde à puissance moyenne pour faire fondre le milieu gélifié (au maximum 4 minutes)
- Utiliser des gants anti-chaueur ou des maniques et surveiller régulièrement l'avancée de la fonte du milieu en agitant le flacon
- Arrêter le chauffage quand le milieu devient bien transparent
- Agiter le milieu pour homogénéiser
- Transvaser éventuellement le milieu dans un récipient facilitant le prélèvement par les élèves
- Veiller à ce que ça ne soit pas trop chaud pour les élèves mais suffisamment chaud pour que le milieu ne se solidifie pas tout de suite

APRES LA MANIPULATION DES ELEVES :

- Surveiller l'apparition des tubes polliniques au microscope (au moins 2 fois par jour)
- Placer les boîtes au réfrigérateur dès leur apparition pour une meilleure conservation (quelques jours).

☐NB☐ : Il est possible d'observer l'apparition des tubes polliniques au microscope (à x 40) sans avoir à enlever le couvercle de la boîte

MANIPULATION

PREPARATION DES ENCEINTES HUMIDES DE CULTURE

- Bien se laver les mains pour ne pas contaminer la culture (le milieu et le protocole permettent de limiter le développement des moisissures mais il est nécessaire de manipuler avec propreté)
- Utiliser un papier absorbant imbibé d'alcool pour frotter les outils avec
- Découper des disques (autant que de boîtes de culture utilisées) dans le papier absorbant de diamètre 8,5 cm environ
- Déposer un disque dans chaque boîte de culture
- Humidifier généreusement les disques de papier à l'aide des pissettes d'eau distillée
- Installer dans chaque boîte une lame à concavité (en veillant à placer le creux de la lame vers le haut)
- Refermer le couvercle des boîtes

DISSECTION DES PIÈCES FLORALES

- Identifier les différentes parties des fleurs
- Repérer les étamines portant les grains de pollen, contenus dans des sacs
- Couper les étamines soigneusement avec des ciseaux passés à l'alcool et conserver dans un verre de montre bien propre

👁👁 ATTENTION 👁👁 : évitez le plus possible de toucher les étamines avec les mains sources de contamination

DEPOT DU MILIEU DE CULTURE SUR LES LAMES

- Ouvrir les boîtes de culture
- Utiliser un compte-gouttes pour prélever quelques gouttes de milieu de culture encore chaud

👁👁 ATTENTION 👁👁 : veillez à ne pas vous brûler !

- Déposer quelques gouttes du milieu dans les creux des lames de manière à les remplir

DEPOT DES GRAINS DE POLLEN

- Prendre les étamines prélevées au point numéro 2)
- Ouvrir les boîtes de culture
- Saupoudrer le pollen des étamines au dessus du milieu de culture sur les lames
- Si beaucoup de pollen est tombé sur la lame ou si le pollen est très coloré, déposer délicatement une goutte d'eau distillée sur le milieu de culture
- Remuer légèrement la lame

MISE EN CULTURE DES GRAINS DE POLLEN

- Bien refermer le couvercle des boîtes de culture
- Découper environ 10 cm de film étirable si votre professeur en a mis à votre disposition
- Enrouler la boîte de culture dans ce film en tirant de manière à bien fermer les côtés de la boîte : de cette manière, elle devient imperméable
- Laisser les boîtes à température ambiante

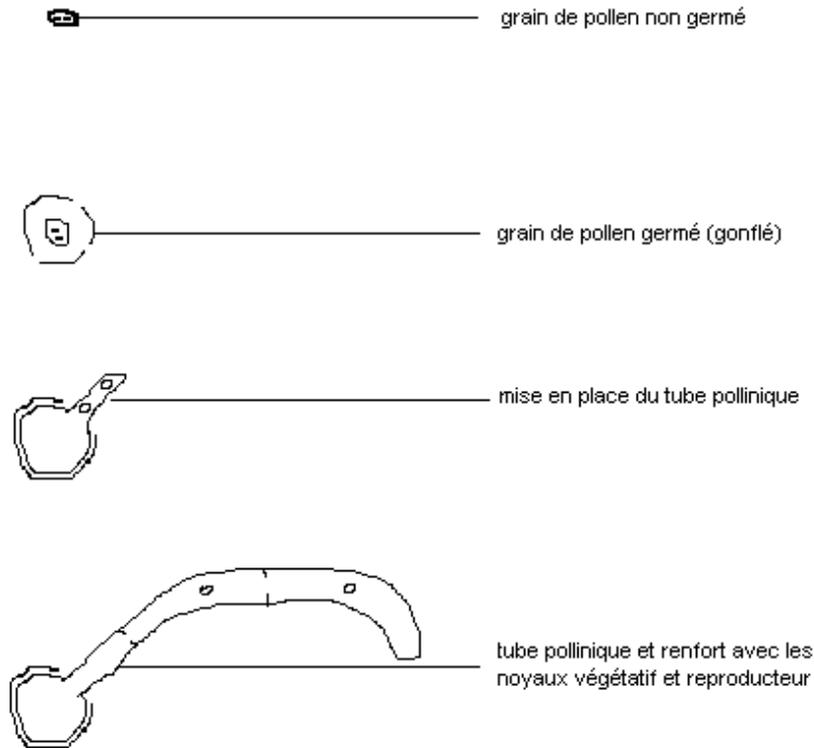
OBSERVATION DES TUBES POLLINIQUES

Au bout de 3h à 72h selon le degré de maturation des grains de pollen des fleurs, observer les lames au microscope au grossissement x 40 à x 100.

☐NB☐ : Les boîtes peuvent être conservées avec les lames à l'intérieur pendant quelques jours au réfrigérateur (il est préférable de surveiller la croissance des tubes polliniques au microscope régulièrement de manière à placer les cultures au réfrigérateur dès que les tubes sont développés)

RESULTATS ATTENDUS ET INTERPRETATION

Schéma d'observation des grains de pollen germés et des tubes polliniques :



FICHE SECURITE (guide non exhaustif)

Le milieu de culture ne requiert pas de précaution d'utilisation particulière.

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

Lors du chauffage du milieu de culture, veillez à utiliser des gants anti-chaaleur. En cas de brûlure, passer la zone atteinte sous l'eau froide pendant 10 à 15 minutes. Consulter un médecin si nécessaire.

FICHE CONSERVATION

Le milieu de culture se conserve au réfrigérateur pendant 1 an avant ouverture. Il se conserve 24 heures à 4°C après ouverture.

FICHE TRI ET RECUPERATION

Le milieu de culture se jette avec les ordures ménagères après décontamination à l'eau de javel.