**TP n°02 : Préparation de milieux de culture MS**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | **Composition de milieu de culture** | **Pour 1 litre de milieu de culture**  **mg/l** | **Solution mère**  **Concentration**  **Selon la disponibilité des produits chimiques** | **La quantité**  **des produits à pesé (g/l)** | **Volume de prélèvement**  **Pour préparer un litre de milieu de culture** |
| **Macro-éléments** | NH4NO3  KNO3  CACL2, 2H2O  Mg SO4, 7 H2O  KH2PO4 | 1650  1900  440  370  170 | 10 Fois | …………….  …………….  …………..  ………......  ……………. | …………..ml |
| **Micro-éléments** | MnSO4,H2O  ZnSO4, 7H2O  H3BO3  KI  Na2MoO4,2H2O  CuSO4, 5H2O  CoCl2,6H2O | 22,3  8,6  6,2  0,83  0,25  0,025  0,025 | 100 fois | …………….  ……………  ……………  …………….  …………….  ……………  ……………. | …………ml |
| **Fe-EDTA** | Na2 EDTA  FeSO4, 7H2O | 37,3  27,8 | 100 fois | ……………..  ……………. | ml |
|  |  | **Solution mère mg/100ml** |  |  |  |
| **Vitamines et acides amines** | Glycine  Acide nicotinique  Pyridoxine  Thiamine  Myo-inositol | 0,2  0,5  0,5  0,1  100 |  |  | ml |
| **Sucre** | Saccharose | 25g/l |  |  |  |
| **Agar** | Agar | 7g/l |  |  |  |

La culture *in vitro* est l’ensemble des techniques qui permettent de maintenir en vie ou de faire croître un organisme entier, un organe, un tissu ou une cellule isolée dans les conditions aseptiques et parfaitement contrôlées. Toutefois, la réussite de la culture *in vitro* des tissus végétaux dépend de plusieurs facteurs que sont le génotype, l’âge de l’explant et les facteurs environnementaux à savoir la température, l’éclairement, l’humidité et les conditions strictes d’asepsie ainsi que les facteurs nutritionnels et composition du milieu de culture qui sont choisis par l’expérimentateur en fonction des objectifs visés.

**Composition du milieu de culture MS :**

**Préparation des solutions mères :**

Les solutions mères de macro-éléments, micro-éléments, fer et vitamines sont préparées comme vu dans le tableau ci-dessus, aux concentrations voulues pour constituer un stock pour la préparation du milieu nutritif.

Lors de la préparation des solutions mères, les différents éléments sont apportés dans l’ordre décroissant de leur concentration afin d’éviter tout risque de précipitation. Ensuite toute les solutions mères sont étiquetées, puis conservées au froid (4°C) et à l’abri de la lumière.

Les calcules des concentrations est selon le choix du préparateur mais le volume à prélever dépend de la concentration des solutions mères (complétez le tableau ci-dessus)

**Préparation du milieu de culture**

Les milieux de culture sont préparés dans des erlènes, Premièrement, ajouter les volumes adéquats de chaque solution mère indiquée dans le tableau ci-dessus En suite, ajouter 25g/l de saccharose et compléter le volume avec de l’eau distillé jusqu’à 1500 ml tout en agitant la solution jusqu’à la dissolution totale du sucre dans le milieu de culture. Le pH du milieu est ajusté à 5,7 ± 0,1 avec du NaOH (1N) (base) ou HCl (1N) (acide) en agitation continue. Après ajouter 7g/l d’agar graduellement, le tout est ensuite porté à ébullition à l’aide d’un agitateur magnétique chauffant jusqu'à la dissolution de toutes les particules d’agar et le milieu devient clair.

Enfin, le milieu ainsi préparé est distribué dans des tubes de 25x150 mm et des bocaux en verre, à raison de 10 ml par tube et 25 ml par bocal. Ensuite, les tubes et les bocaux sont fermés avec des capuchons en plastique.

**Stérilisation**

La réussite de la culture *in vitro* repose en grande partie sur les conditions d’asepsie totale.

**Stérilisation du milieu de culture**

La stérilisation de milieu de culture, est assurée par l’autoclave à une température de 120° C, et une pression de 1 bar pendant 20 minutes. Pour la stérilisation de substances thermolabiles comme les vitamines, hormones et acides aminés on utilise des pièces de filtration avec un papier filtre 0.22 micromètre stérile.

**Stérilisation des instruments**

Tous les instruments métalliques (pinces, scalpels, bistouris ...) ou verreries (Béchers, boites de pétri et des erlènes...) sont enrobés avec du papier aluminium avant leur mise en étuve, et sont mis à l’étuve à une température de 120° C pendant 20 minutes.

**Désinfection du matériel végétale**

Il-y-a plusieurs protocoles de désinfection utilisés en culture in vitro, le choix dépend de :

* Type de l’explant a utilisé ;
* L’espèce : herbacée ou ligneuse ;
* Produits disponibles.