

Protocole de clonage cellulaire à travers la réalisations de cals

La formation de cals végétaux est une technique courante utilisée en culture de tissus végétaux pour induire la prolifération de cellules non différenciées. Voici un protocole général pour réaliser des cals à partir d'explants végétaux dans des boîtes de Pétri :

****Matériel requis :****

1. Boîtes de Pétri stériles
2. Lame de scalpel stérile
3. Plante mère pour les explants
4. Milieu de culture approprié (Murashige et Skoog (MS) par exemple)
5. Hormones de croissance (auxine par exemple)
6. Agar-agar (si nécessaire pour gélifier le milieu)
7. Autoclave pour la stérilisation du milieu de culture et des instruments

****Étapes du protocole :****

****Étape 1 : Préparation des boîtes de Pétri****

1. Stérilisez les boîtes de Pétri vides en les plaçant dans un autoclave ou un appareil de stérilisation approprié. Les boîtes de Pétri doivent être propres et exemptes de toute contamination bactérienne ou fongique. Assurez-vous également qu'elles sont complètement sèches avant utilisation.

****Étape 2 : Préparation du milieu de culture****

1. Préparez le milieu de culture approprié (par exemple, le milieu MS) en suivant les instructions spécifiques pour sa préparation. Vous pouvez utiliser la recette que nous avons fournie précédemment pour réaliser 1L ou 500 mL de milieu.
2. Si vous utilisez de l'agar-agar pour gélifier le milieu, ajoutez la quantité appropriée d'agar-agar au milieu avant la stérilisation. Mélangez bien pour disperser l'agar-agar dans le milieu.

****Étape 3 : Stérilisation du milieu de culture****

1. Versez le milieu de culture préparé dans des flacons en verre ou des bouteilles avec des bouchons vissés.
2. Stérilisez le milieu en utilisant un autoclave ou un appareil de stérilisation à 121 °C et 15 psi pendant environ 15 à 20 minutes. La stérilisation est essentielle pour éliminer toutes les bactéries, les champignons et autres contaminants qui pourraient compromettre la culture in vitro.

****Étape 4 : Préparation des explants****

1. Stérilisez les lames de scalpel en les trempant dans de l'alcool à 70 % ou en les passant rapidement à la flamme jusqu'à ce qu'elles rougissent.
2. Sélectionnez des explants à partir de la plante mère. Les explants peuvent être des morceaux de feuilles, de tiges, de racines, de bourgeons, ou tout autre tissu végétal approprié pour votre expérience. Assurez-vous que les explants sont sains et exempts de maladies.

****Étape 5 : Inoculation des explants****

1. Placez les morceaux d'explants dans les boîtes de Pétri stériles contenant le milieu de culture solidifié. Vous pouvez disposer plusieurs explants dans chaque boîte, en veillant à ce qu'ils ne se touchent pas.
2. Ajoutez des hormones de croissance au milieu de culture pour stimuler la formation de cals. Les hormones couramment utilisées pour la formation de cals sont l'IAA (acide 3-indole acétique), le NAA (acide naphthalène acétique) et la kinétine. Les concentrations d'hormones dépendront de l'objectif de l'expérience et du type de plante utilisée. Les concentrations typiques peuvent varier de quelques milligrammes à plusieurs dizaines de milligrammes par litre de milieu.
3. Scellez les boîtes de Pétri avec du ruban adhésif ou des couvercles pour éviter la contamination et placez-les dans une chambre de culture in vitro avec des conditions de lumière, de température et d'humidité appropriées pour la plante que vous cultivez.

****Étape 6 : Culture et observation des cals****

1. Incubez les boîtes de Pétri dans la chambre de culture in vitro pendant la période appropriée. La durée de culture dépendra de l'objectif de l'expérience et du type de plante utilisée. Les cals devraient commencer à se former au bout de quelques semaines.