***Tp 2 ensemencement des explants* –**

1. **La Stérilisation des instruments :**

Tous les instruments métalliques (pinces, pointes, bistouris ...) ou verreries (Béchers, tubes de culture, boîtes de Petris ...) sont enrobés avec du papier aluminium, et sont mis à l‟étuve à une température de 170° à 200° C pendant 2 heures de temps. Au cours des manipulations les instruments métalliques sont plongés dans l‟alcool à 70%, puis passés aux flammes du bec Benzen afin de brûler l‟alcool.

1. **Stérilisation des explants :**

Les cultures de tissus végétaux se heurtent à des problèmes de brunissement à cause des contaminations par divers agents (bactéries, champignons ...) ce qui exige l‟utilisation de solutions stérilisantes telles que l‟hypochlorite de calcium à 1 à 2 % pour la pomme de terre et les graines de tomate et poivrons et l‟éthanol à 70%.

**2-1 Stérilisation des explants de pomme de terre :**

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 d‟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.(Nowbuth et LÊ ,2004)

* Même étape pour les graine de poivron et tomate **.**

1. **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 ou entre 2 bec fonctionner pendant 30 minutes avant de commencer l‟ensemencement des explants. On ajoute les vitamines et les hormones filtrées au milieu de culture autoclavée, 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 prés de la flamme du bec bensen, tout en flambant l‟ouverture du tube avant et après l‟opération sous la hotte ou entre les bec

1. **Incubation des explants :**

**Dans les boite de petries :**

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.

1. **Mesures et notation effectuées:** Les mesures effectuées sont de l‟ordre morphologique, on mesure la taille de la tige, le nombre de feuilles, le nombre de racines, la longueur des racines aussi le taux de contamination;