

République Algérienne démocratique et populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche Scientifique
Université Frère Mentouri Constantine 1

Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro-Alimentaires –INATAA–

Filière : sciences alimentaires
Département : technologie alimentaire
Promotion : 2^{ème} année Licence

Travaux pratiques de physiologie végétale

Enseignants : KEHAL F. (MAA)
BENAMARA M. (MCB)
BOUGUERRA A. (MAA)
ZERIZER H. (MCA)

Année universitaire : 2019 /2020

TP N° 01. Analyse du sol

Introduction

Les analyses physicochimiques du sol permettent aux agriculteurs d'évaluer les niveaux de fertilisations des sols et de l'adapter aux programmes de fertilisation complémentaire en fonction des besoins des sols et des cultures. Ces analyses permettent aussi d'obtenir le meilleur rendement au niveau de la productivité, maîtriser les coûts de production et de protéger l'environnement.

Préparation du sol

Séchage : pour obtenir un sol uniforme

Broyage : pour augmenter la surface de contact entre le sol et les réactifs

Expérience 01. Dosage du calcaire dans le sol

- *Le calcaire total correspond à la quantité de Carbonate de calcium (CaCO₃)*
 - Peser 1g de sol et verser dessus une solution de HCl (1N) ; après effervescence ajouter une quantité d'eau distillée, remuer et verser sur le filtre.
 - Recueillir le résidu sur le filtre et mettre dans une étuve à 105°C jusqu'à poids constant.
 - Mesurer le pourcentage de calcaire dans le sol selon l'équation suivante :
- % de calcaire = $(P_i - P_f)/P_i * 100$ ou : P_i : poids initial du sol ; P_f : poids final du sol.
- La formule de la réaction est la suivante :



Carbonate de Calcium + Acide chlorhydrique \implies Chlorure de Calcium

Expérience 02. Dosage de la matière organique dans le sol

- Peser 1g de sol, verser dessus 5ml d'H₂O₂ concentré, et remuer (le H₂O₂ concentré détruit la matière organique ; les produits sont dégradés en CO₂, H₂O et NO₂ et parfois SO₂) ;
- Filtrer et rincer avec de l'eau distillée ;
- Porter à l'étuve à 105°C jusqu'à poids constant ;
- Mesurer le % de la matière organique selon l'équation suivante :

$$\% \text{ de MO} = (P_i - P_f)/P_i * 100$$

P_i : poids initial ;

P_f : poids final.

- Les sols sont répartis en trois classes :

→ Teneur faible < 4% ; Teneur modérée 4-9% ; Teneur élevée 9-30%

Expérience 03. Technique de sédimentation

La méthode de sédimentation consiste à séparer les constituants du sol en fonction de leurs poids selon la loi de Stokes.

Prendre un bécher en verre et ajoute un volume de terre et 3 d'eau et laisser décanter pendant 48h. On aura 5 phases de décantation dans l'ordre :

1. Fraction grossière > 2 mm ;
2. Sable grossier : 2 à 0.2 mm ;
3. Sable fin : 0.2 à 0.04 mm ;
4. Limon : 0.04 à 0.002 mm;
5. Argile < 0.002 mm.

Selon les résultats obtenus, les sols se classent en différentes catégories :

- ✓ Sableux
- ✓ Limoneux
- ✓ Argileux

Expérience 04. Mesure du pH

Peser 5g de sol et mélanger à 10ml d'eau distillée (1/3 – 2/3), agiter la solution pendant une minute. Procéder à la lecture du pH.

On classe les sols selon leur acidité de la manière suivante :

pH < 4.5 : sols très acides

4.5 < pH < 6 : sols faiblement acide

6 < pH < 7 : sols équilibrés

pH > 7 : sols calcaire (basique)

TP N° 02. Détermination de la pression osmotique par la méthode de la plasmolyse-limite

Introduction

L'osmose est un phénomène de diffusion de la matière mis en évidence lorsque des molécules d'eau (de solvant de façon générale) traversent une membrane semi-perméable qui sépare deux liquides dont les concentrations en produits dissous sont différentes. La différence de concentration provoque une différence de *pression osmotique* qui engendre un déplacement du *solvant* à travers la membrane.

1. Matériels et réactifs

- Bulbe d'oignon ;
- Onze (11) verres de montre ;
- Solution de saccharose M (1 mol.L^{-1}) (soit 342 g/L ou 34,2%) ;
- Eau distillée ;
- 2 pipettes de 5 ml;
- Lame-lamelles ;
- Microscope optique ;
- pinces fines et rasoir.

2. Méthodes

2.1 Principe

Pour connaître la pression osmotique d'un tissu, il suffit de chercher, dans une gamme de solutions de concentration croissante, celle qui en équilibre osmotique avec les cellules. Comme cet état d'équilibre n'est pas directement perceptible, en admet que la solution qui produit un faible début de plasmolyse (plasmolyse limite) est pratiquement isotonique du milieu cellulaire.

2.2 Protocole

- Préparer une série de 11 tubes contenant des concentrations croissantes de saccharose ;
- Mettre quelques millilitres de chaque solution dans 11 verres de montre posés sur une feuille de papier, sur laquelle on indiquera les concentrations correspondantes ;
- Prélever de petits fragments d'épiderme à l'aide d'une pince fine ;
- Placer les morceaux d'épiderme dans les verres de montre ;

- Attendre 15 à 30 min et observer.

Tableau 01.

N° des verres de montre	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
V ³ de la solution de sacc.(mL)	0	0.5	1	1.5	2	2.5	3	3.5	4	4.5	5
Volume d'eau distillée (mL)	5	4.5	4	3.5	3	2.5	2	1.5	1	0.5	0
Concentration molaire (mol.L ⁻¹)	0	0,1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1

3. Interprétation des résultats

- Les cellules sont turgescentes pour les faibles concentrations de milieu et plasmolysées pour les fortes concentrations ;
- Il existe une concentration pour laquelle on observe une très légère plasmolyse (plasmolyse limite) ;
- En état de turgescence, l'entrée d'eau s'arrête lorsque la pression exercée par ce mouvement (pression osmotique) est équilibrée par la pression de réaction de la paroi (pression de paroi ou pression de turgescence).
- Calculer la pression osmotique du suc vacuolaire en fonction des résultats observés,

Exemple :

- Si la dernière préparation turgescente correspond au verre de montre n°4 (concentration molaire en saccharose : 0.3) et la première préparation plasmolysée correspond au n°5 (concentration molaire en saccharose : 0.4) on peut écrire que la concentration molaire de la *solution isotonique* au suc vasculaire et par conséquent la concentration molaire m du suc vacuolaire est compris entre

$$0.3 < m < 0.4$$

- La pression osmotique du suc vacuolaire est donc comprise entre les valeurs :

$$22.4 * 0.3 < P < 22.4 * 0.4$$

TP N° 03.Extraction et séparation des différents pigments photosynthétiques

Introduction

Les organismes chlorophylliens sont capables de synthétiser des molécules organiques simples sous l'action de la lumière visible. Cette synthèse nécessitant la lumière comme source d'énergie s'appelle la photosynthèse. L'utilisation de l'énergie lumineuse est rendue possible grâce à l'existence de pigments : molécules capables d'absorber certaines longueurs d'onde lorsqu'elles sont éclairées par de la lumière blanche. Cette propriété leur donne une couleur déterminée.

Les chlorophylles sont les pigments majeurs impliqués dans la capture des photons. La chlorophylle est synthétisée et dégradée dans l'enveloppe du chloroplaste, mais elle n'est présente et active comme pigment que dans les thylacoïdes.

Les caroténoïdes accompagnent toujours les chlorophylles dans les membranes thylacoïdales où ils jouent apparemment le double rôle de pigments accessoires pour la capture de l'énergie lumineuse et de photoprotecteurs contre les intensités lumineuses élevées. On les trouve également associés à l'enveloppe du chloroplaste. Ils sont aussi très répandus dans de nombreux tissus végétaux (parenchyme de Tomate, racines de Carottes, pétales, écorce d'Orange,etc...).

1. Matériels et réactifs

- Un mortier et pilon ;
- sable de mer ;
- une éprouvette (25, 50, 100mL);
- un papier filtre ;
- feuilles d'épinard ;
- un bécher (10 et 50 mL) ;
- erlenmeyer (10 et 50 mL) ;
- un entonnoir,
- une pipette Pasteur ;
- Ether de pétrole ;
- Acétone ;
- Dichloroéthane ;
- un agitateur magnétique, une tige et un barreau (aimant) ;
- une bande de papier chromatographie de 2 cm de large ;
- papier aluminium.

2. Extraction des différents pigments photosynthétiques

Mener l'extraction rapidement et conserver les extraits au froid et à l'abri de la lumière (papier aluminium) afin de minimiser les risques de dégradation des pigments.

- 1) Laver, sécher puis peser précisément 1.5g de feuille d'épinard ;
- 2) Couper le matériel végétal en petits fragments ;
- 3) Ajouter 4ml d'acétone (*pour obtenir un mélange acétone/eau de concentration final 80% si l'on tient compte de l'eau présente dans les feuilles*) et broyer jusqu'à obtenir un mélange homogène ;
- 4) Ajouter 6mL d'acétone à 80% et broyer de nouveau soigneusement ;
- 5) Laisser décanter quelques minutes (10min) ;
- 6) Récupérer le surnageant dans un erlen 10mL (*de préférence, filtrer sur papier filtre et recueillir la solution acétonique de chlorophylles*) et compléter à 10mL avec de l'acétone à 80% ;
- 7) Fermer avec du parafilm et agiter.

Remarque :

- Broyer le matériel végétal dans l'acétone en présence de sable de mer fin, éventuellement en tamponnant le milieu avec la craie (CaCO_3) ;
- Ajouter de Chlorure de Calcium (CaCl_2) permet en outre favoriser l'extraction en perméabilisant la membrane chloroplastique.

2. Séparation des différents pigments photosynthétiques par chromatographie sur papier

Les pigments sont séparés par chromatographie sur papier à l'aide d'un solvant apolaire : la séparation s'effectue selon l'affinité des pigments vis-à-vis du solvant c'est-à-dire selon le degré d'apolarité des pigments.

- 1) Introduire dans le tube de chromatographie 10mL de solvant de migration (éther de pétrole/acétone/dichloroéthane : 8.5/1/0.5 v/v/v) - éluant - (*à l'aide du distributeur*) ;
- 2) Fermer hermétiquement le tube ;
- 3) Tracer à l'aide d'un crayon un trait à 2cm du bord inférieur d'une bande de papier chromatographie (*afin que le dépôt ne soit pas en contact avec le solvant*) ;
- 4) Déposer en bande fine avec une pipette pasteur une partie de l'extrait pigmentaire non dilué sur le trait et sécher (*recommencer plusieurs fois le dépôt et le séchage jusqu'à l'obtention d'une tache très foncée*) ;

- 5) Introduire le chromatogramme dans le tube entouré de papier noir puis fermer le tube ;
- 6) Arrêter la migration quand le front du solvant aura atteint 20cm.
- 7) Sécher la chromatographie

2.3 Analyse des résultats

Dessiner le chromatogramme, identifier les pigments en vous aidant des formules, justifier leurs ordres de migration.

- a) β -Carotène($C_{40}H_{56}$) : de couleur orangé;
- b) *Chlorophyllea* ($C_{55}H_{72}O_5N_4Mg$): de couleur vert bleuté;
- c) *Chlorophylleb* ($C_{55}H_{70}O_6N_4Mg$): de couleur vert jaune;
- d) *Xanthophylle*($C_{40}H_{56}O_2$) : de couleur jaune.

TP N° 04.Extraction et dosage des différents pigments photosynthétiques**Introduction**

La photosynthèse est un mécanisme biochimique permettant aux végétaux supérieurs de fabriquer eux même des hydrates de carbone (sucres et amidon) à partir d'eau et de CO₂. Cette réaction nécessite un apport externe d'énergie sous forme de lumière. Cette réaction siège dans des organites propres à la cellule chlorophyllienne: les chloroplastes. De nombreuses protéines et autres molécules contribuent au mécanisme, parmi eux les pigments photosynthétiques : Chlorophylle a et b ainsi que les caroténoïdes. Ce sont les molécules lipophiles qui absorbent spécifiquement la lumière à certaines longueurs d'onde.

Le but de cette expérience est de quantifier par une méthode spectrophotométrique les pigments photosynthétiques de la feuille d'épinard.

1. Matériels et réactifs

- Spectrophotomètre ;
- Deux (02) mortiers et pilons ;
- Une éprouvette (25, 50, 100mL);
- Un papier filtre ;
- Trois (03) béchers (25 et 50 mL) ;
- Deux (02) erlenmeyers (25 et 50 mL) ;
- Deux (02) petits entonnoirs ;
- Dix (10) pipettes Pasteur ;
- Cinq (05) pipettes (1, 5 et 10ml) ;
- Une poire ;
- Cétone (250ml) ;
- Un agitateur magnétique, une tige et un barreau (aimant) ;

2. Extraction des différents pigments photosynthétiques

Mener l'extraction rapidement et conserver les extraits au froid et à l'abri de la lumière (papier aluminium) afin de minimiser les risques de dégradation des pigments.

- Laver, sécher puis peser précisément 1.5g de feuille d'épinard ;
- Couper le matériel végétal en petits fragments ;
- Ajouter 4ml d'acétone (*pour obtenir un mélange acétone/eau de concentration final 80% si l'on tient compte de l'eau présente dans les feuilles*) et broyer jusqu'à obtenir un mélange homogène ;

- Ajouter 6mL d'acétone à 80% et broyer de nouveau soigneusement ;
- Laisser décanter quelques minutes (10min) ;
- Récupérer le surnageant dans un erlen 10mL (*de préférence, filtrer sur papier filtre et recueillir la solution acétonique de chlorophylles*) et compléter à 10mL avec de l'acétone à 80% ;
- Fermer avec du parafilm et agiter.

3. Dosage des pigments totaux

3.1 Rappel

La lumière blanche est composée de différentes radiations visibles dont la longueur d'onde varie de 400 nm (violet) à 750-800 nm (rouge foncé). Une substance colorée absorbe préférentiellement certaines radiations de la lumière blanche. Cette propriété lui donne sa couleur. Si cette substance est un photorécepteur, les radiations absorbées peuvent être celles qui agissent sur lui et entraînent une photo-réaction.

3.2 Protocole

- introduction 2mL d'extrait pigmentaire dans une fiole jaugée de 20mL et compléter avec de l'acétone à 80% ;
- Fermer la fiole avec du parafilm et agiter ;
- placer une cuve en verre, qui contient le solvant d'extraction, dans le faisceau et régler le zéro de l'appareil à 460nm.
- remplacer cette cuve par une autre qui est emplie au 2/3 par l'extrait pigmentaire dilué et lire l'absorbance (A) ;
- recommencer les opérations successivement à 645 et 663nm (régler le zéro de l'appareil pour chaque longueur d'onde utilisée).

3.3 Interprétations des résultats

L'objectif est de doser par spectrophotomètre d'absorption, les chlorophylles a et b ainsi que les caroténoïdes présents dans l'extrait. Les formules ci-dessous établies à partir de loi de BEER-LAMBERT permettent de calculer les concentrations en pigments :

$$C_a = 12.7 A_{663} - 2.63 A_{645}$$

$$C_b = 22.9 A_{645} - 4.68 A_{663} \text{ en mg.L}^{-1}$$

$$C_{\text{car}} = 5 A_{460} - (3.19C_a + 130.3 C_b)/200$$

TP N° 05. Germination des graines

Introduction

La germination est une phase physiologique qui correspond à la transition de la phase de vie latente de la graine sèche à la phase de développement de la plantule. Le processus de germination commence dès que la graine sèche est hydratée.

La germination au sens strict correspond au temps qui s'écoule de l'imbibition de la graine jusqu'au début de la croissance de la radicule. Elle peut être subdivisée en trois périodes : imbibition de la graine, activation de la graine et début d'allongement des cellules de la radicule. Pendant la période d'imbibition, la graine absorbe l'eau du milieu externe. Elle gonfle, pouvant atteindre un volume triple de celui à l'état sec ; le tégument se rompt parfois. L'imbibition peut durer de quelques minutes à trois heures suivant la structure et la perméabilité des téguments. La période d'activation de la graine peut durer une dizaine d'heures. Aucun changement notable ne s'est visible. Seules s'opèrent quelques modifications du métabolisme, qui préparent le déclenchement de la croissance. Au cours de la période de début d'allongement des cellules de la radicule, et suivant les espèces, la radicule perce l'albumen et /ou les téguments de la graine. Dès que cette percée est réalisée, la graine a germé ; la germination au sens strict est terminée.

La seconde phase de la germination représente le début de la croissance de la plantule. Les différentes parties de celle-ci (radicule, tigelle, cotylédons, gemmule) vont entamer leur croissance successivement. La radicule croît d'abord. La tigelle entreprend ensuite sa croissance par élongation, dont l'importance varie considérablement suivant les espèces.

On distingue la germination épigée : où les cotylédons sont soulevés au dessus de la surface du sol et la germination hypogée : où les cotylédons restent souterrains (au-dessous de la surface du sol). Pendant la germination, la plantule utilise pour la couverture de ses besoins énergétiques les réserves de la graine (amidon, lipides, etc.) , qui sont transformées, sous l'action d'enzymes appropriées, en substances directement utilisables pour la croissance (saccharose, acides aminés). Lorsque ces substances sont épuisées, la jeune plante, qui possède un appareil racinaire et un appareil aérien formés et fonctionnels et peut réaliser la photosynthèse, devient autonome et peut assurer elle-même sa propre croissance.

1. Objectifs

- Comprendre les différentes étapes du développement de la plante à partir de la graine ;
- Mise en évidence de la croissance par élongation ;
- L'évaluation de la croissance (taux et vitesse de croissance).

2. Matériels et réactifs

- Graines de lentilles, blé dur ou autres
- Eau de javel
- Boîtes de pétri
- Coton imbibé d'eau
- Papier millimétrique

3. Méthode expérimentale

Principe

Pour que la graine germe, il faut que les activités cellulaires reprennent. Dans un premier temps, elle doit impérativement s'imbiber d'eau. La respiration reprend et la consommation d'oxygène permet de tirer de l'énergie des molécules organiques mises en réserve, grâce à l'hydrolyse enzymatique. La plantule apparaît alors par multiplications cellulaires : racine d'abord puis feuilles. Elle a désormais besoin d'un support de culture. Puis elle subit une croissance par élongation des organes et un développement par acquisition de nouveaux organes.

Mode opératoire

- Laver les graines dans de l'eau javellisée afin d'enlever les bactéries. Puis rincer avec de l'eau distillée ;
- Prendre des boîtes de pétri ;
- Recouvrir le fond de la boîte de pétri de coton humide ;
- Déposer 2 à 3 graines sur le coton dans chaque boîte ;
- Placer les boîtes de pétri dans une salle à température ambiante et Chaque 2 jours, effectuer les mesures de la longueur des racines et tige
- Représenter graphiquement la croissance de la racine de la tige en fonction du temps (jours)

Calculer les paramètres de croissance pour les plantes germées (taux de croissance et vitesse de croissance).

Résultats

Dès la germination, la petite racine, appelée radicule, grandit pour former la racine principale. Elle s'allonge à partir de son extrémité contenant un méristème apical racinaire, et s'enfonce dans le sol. La jeune tige de l'embryon se développe en tige principale à partir d'un méristème apical caulinaire (situé à l'extrémité) qui assure la croissance en longueur. Cette tige est formée de noeuds (zones d'insertion des feuilles) et d'entre-noeuds (segments dépourvus de

feuilles). Un bourgeon axillaire est situé à l'aisselle du point d'insertion de chaque feuille. Les rameaux secondaires poussent à partir des bourgeons axillaires. Chaque bourgeon contient un méristème. La croissance résulte de la division cellulaire, ou mitose, et de l'élongation des cellules. L'élongation est l'augmentation *irréversible* en volume selon une direction particulière. La croissance d'un organe est le résultat de l'augmentation du nombre de cellules qui le constituent et de la taille des cellules individuelles. La multiplication cellulaire présente généralement une allure exponentielle ou logistique (figure 1).

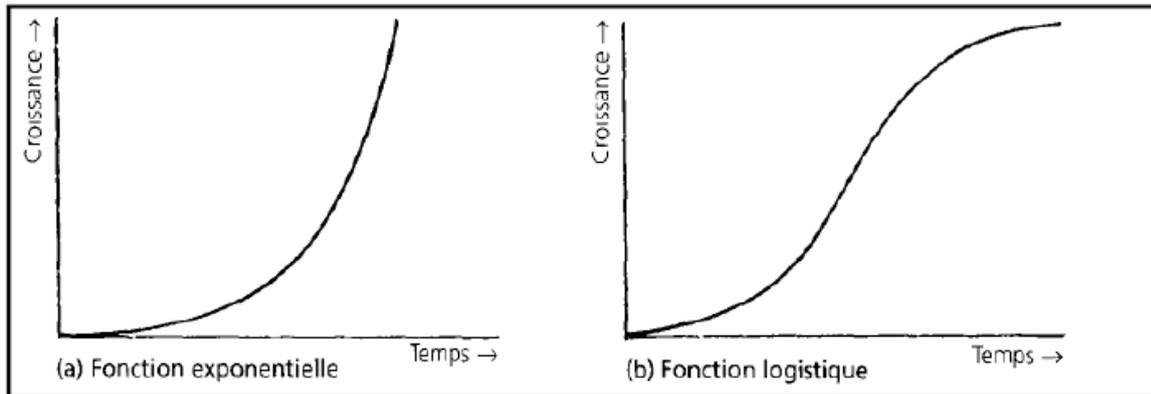


Figure 1. Allure générale de la courbe de croissance des plantes.

$$\text{La vitesse de croissance (V)} = \frac{\Delta Y}{\Delta T}$$

$$\text{Taux de croissance} = \frac{\Delta Y}{Y \Delta T}$$

D'où : Y : c'est la taille de la tige

T : Temps de croissance