

 Institut National de la Recherche Agronomique	MODE OPERATOIRE	Référence :
	Comptages chromosomiques sous microscopie photonique (graminées fourragères et à gazon)	BM-MO-RES-02
		Version : 01
Centre de recherches Poitou-Charentes		Date : 8/12/04
UGAPF 86600 Lusignan		Page : 1 sur 4

Objectifs :

Préparation des étalements chromosomiques pour déterminer le niveau de ploïdie des plantes

Matériel :

De très jeunes racines sont prélevées soit sur des plantes, soit sur des semences mises à germer, soit sur de jeunes talles ou plantules placées en milieu favorable à la formation de nouvelles racines :

- en hydroponie à 24°C avec oxygénation par un bulleur,
- dans du terreau à une température suffisante, à l'extérieur en été, en serre à mi-saison ou en chambre de culture avec une thermopériode de 12h à 18°C dans l'obscurité et 12h à 25°C avec éclairage. Arrosage modéré pour éviter l'asphyxie des racines.

Prélèvement et conservation :

- Il doit se faire environ 4 à 5 heures après le lever du jour ou le début de la période d'éclairage et autant de temps après un arrosage.
- Les racines sont mises dans des piluliers contenant du bromo-1-naphtalène posés sur de la glace pendant le prélèvement puis à 4°C pendant 20 h afin de bloquer les divisions cellulaires et de contracter les chromosomes. L'identification de chaque échantillon se fait sur un morceau de bristol immergé avec les racines, celui-ci accompagnera les racines à chaque étape du traitement.
- Les jeunes racines sont ensuite fixées dans une solution froide (4°C) d'éthanol : acide acétique (3 : 1 en volume) et stockées au réfrigérateur jusqu'à utilisation. La fixation détruit toute vie cellulaire et conserve les chromosomes dans un bon état structural.

Traitement des racines :

- Rincer les racines dans un petit panier à mailles pendant 15 min dans un tampon 0.01M d'acide citrique – citrate de sodium pour éliminer le fixateur.
- Placer le panier dans une petite cuve contenant de l'acide chlorhydrique 1 N maintenue à 60°C en étuve pendant 10 minutes, augmenter le temps jusqu'à 15 min si les racines sont grosses ou plus dures.
- L'hydrolyse assouplit le tissu végétal et permet d'obtenir un bon étalement des cellules et des chromosomes entre lame et lamelle.
- Rinçage dans le tampon

	Rédacteur	Vérificateur	Approbateur
Nom	Chargelègue Jérôme	Largeaud Claudine	Huyghe Christian
Fonction	Technicien de recherche	Adjoint technique	Directeur d'unité
Visa			

 Centre de recherches Poitou-Charentes UGAPF 86600 Lusignan	MODE OPERATOIRE	Référence : BM-MO-RES-02
	Comptages chromosomiques sous microscopie photonique (graminées fourragères et à gazon)	Version : 01
		Date : 8/12/04 Page : 2 sur 4

- Replacer le panier dans une solution enzymatique cellulase - pectinase à 37°C pendant 20 à 25 min. pour digérer les parois cellulaires.
- Rinçage dans le tampon
- Après égouttage, les pointes racinaires sont placées dans de petits flacons contenant du colorant réactif de Schiff qui va teindre les méristèmes en mauve. Conservation au réfrigérateur et à l'abri de la lumière. Le temps de coloration minimum avant l'observation est de 1h à température ambiante (environ 20°C) et de 12h à 4°C.

Préparation des lames :

- Pour étaler les cellules, transférer les extrémités racinaires dans une goutte de carmin acétique de Belling sur une lame préalablement lavée à l'alcool. Enlever la coiffe, exciser la zone méristématique, recouvrir d'une lamelle et écraser doucement la lame avec l'extrémité arrondie d'un crayon.
- Observer la préparation au microscope photonique, le repérage des cellules s'effectue aux grossissements 100-200, travailler la lame à la flamme afin de mieux visualiser les chromosomes et faciliter l'écrasement. Si les cellules sont bien hydrolysées et bien étalées en métaphase I, il est possible de compter les chromosomes en grossissant 1000 fois la préparation, le contraste de phase peut faciliter l'observation. Le comptage se fait au tube à dessin qui équipe le microscope, il permet de tracer un à un chaque chromosome compté sur une feuille de papier.



Institut National de la Recherche Agronomique

Centre de recherches
Poitou-Charentes

UGAPF
86600 Lusignan

MODE OPERATOIRE

Comptages chromosomiques sous microscopie photonique (graminées fourragères et à gazon)

Référence :
BM-MO-RES-02

Version : 01

Date : 8/12/04

Page : 3 sur 4

PRINCIPALES ETAPES	DUREE ET CONDITIONS	OBJECTIF
Prélèvement de jeunes racines	A effectuer en fin de matinée. Extrémités de racines en croissance (blanc nacré)	
Prétraitement	Bain eau glacée + Bromo-naphtalène 20 heures à 4°C	Blocage des chromosomes en métaphase
Fixation - conservation	Solution d'éthanol - Acide acétique (3 : 1) 4° C pendant au moins 12 heures	Conservation des chromosomes et destruction de toute vie cellulaire
Rinçage	Tampon citrate 10-15 min	
Hydrolyse	Acide chlorhydrique 1N 10 min étuve à 60°C	Hydrolyse des cellules
Rinçage	Tampon citrate 10-15 min	
Macération	Solution enzymatique Acide citrique – citrate de sodium – cellulase - pectinase 20 – 25 min à 37° C en étuve	Digestion des parois cellulaires
Rinçage	Tampon citrate 10-15 min	
Coloration	Réactif de Schiff 1 heure à température ambiante ou 12 heures à 4°C	Coloration en rouge des chromosomes
Ecrasement	Présentation sous lame avec de carmin acétique de Belling	Observation et comptage des chromosomes au microscope photonique

 Institut National de la Recherche Agronomique Centre de recherches Poitou-Charentes UGAPF 86600 Lusignan	MODE OPERATOIRE	Référence : BM-MO-RES-02
	Comptages chromosomiques sous microscopie photonique (graminées fourragères et à gazon)	Version : 01
		Date : 8/12/04
		Page : 4 sur 4

PRODUITS UTILISES POUR LE COMPTAGE CHROMOSOMIQUE

Préparation du bromo-naphtalène

Mettre quelques gouttes (2 ou 3) de bromo-1-naphtalène ($C_{10}H_7Br$, Prolabo) dans un demi-litre d'eau. Secouer très fort avant chaque utilisation afin d'obtenir une émulsion. La solution se conserve à 4°C.

Préparation de l'alcool acétique

Mélanger un volume d'acide acétique pour trois volumes d'alcool absolu.

Préparation du carmin acétique

Pour 1000 mL : verser 450 mL d'acide acétique, 550 mL d'eau distillée et rajouter 5 grammes de carmin.

Faire bouillir doucement pendant 2 ou 3 heures. Filtrer.

Acide chlorhydrique à 1 N

Pour 1 litre de HCl à 1 N : verser 36 mL de HCl et 964 mL d'eau.

Préparation du tampon

0.01 M d'acide citrique - citrate de sodium à un pH = 4.8

Solution A = acide citrique mono hydraté 0.1M

Solution B = citrate tri-sodique bi hydraté 0.1M

Soit pour 500 mL de chaque solution :

	Produit	P.M (g.mol ⁻¹)	C voulue (mol.L ⁻¹)	Masse (g)
Solution A	Acide citrique	210.1	0.1	10.505
Solution B	Citrate tri-sodique	294.1	0.1	14.705

Solution mère : 40 mL de solution A et 60 mL de solution B.

Utilisation en dilution 1:9 en volume dans l'eau distillée. Conservation à 4°C.

Solution enzymatique

Solution enzymatique (enzymes extraites d'*Aspergillus niger*)

- 20% (v/v) de pectinase

- 2% (w/v) de cellulase

Dilution dans le tampon acide citrique-citrate de sodium 0.01 M déjà préparé pour les rinçages.

Soit, pour 10 mL de solution selon le type de pectinase :

- P4716 : 0.31mL de pectinase + 0.2g de cellulase + 9.49 mL de tampon

- P2829 : 0.4mL de pectinase + 0.2g de cellulase + 9.04 mL de tampon

FIN DU MODE OPERATOIRE