

Recette pour compter les chromosomes

B.C. et MATHIEU Daniel - Juin 2003

Avertissement de l'auteur :

Je tiens à signaler qu'il s'agit d'une recette rapide et qu'il en existe des plus performantes ; mais ces dernières sont plus lourdes à mettre en oeuvre (se renseigner dans des facs, labos et même dans les sociétés de mycologie). J'ai utilisé la recette indiquée ci-dessous essentiellement pour les Nigritelles puis pour les *Ophrys fusca* afin de vérifier les taxons diploïdes (à 40 chromosomes) des taxons tétraploïdes (à 80 chromosomes) ; donc autant dire qu'un comptage aboutissant à environ 40 ou à environ 80 me satisfaisait amplement (j'ai néanmoins pu faire de beaux clichés).

De plus, la réussite de cette recette est conditionnée par :

- votre connaissance de la biologie et donc des tissus des ovaires (il faut bien savoir à quoi correspond ce qui est observé sous le microscope: il y a par exemple des cellules à n chromosomes dans l'ovule non fécondé et d'autres à $2n$ autour);
- le matériel utilisé (le microscope bien sûr... et mieux, un engin avec une caméra reliée à un grand écran qui facilite le comptage; je n'en avais malheureusement pas; mais aussi les réactifs utilisés, en particulier le carmin: sans qu'on puisse les juger à l'avance, il existe manifestement des poudres de qualités différentes dans le commerce - qu'on se procure auprès de labos ou de pharmacies - et qui permettent de fabriquer un colorant – le carmin acétique - dont les propriétés tinctoriales seront plus ou moins bonnes... j'ai connu des déceptions!);
- les ovaires prélevés enfin: certains ont une activité chromosomique forte (et on peut observer de nombreuses plaques métaphasiques favorables à un bon comptage: cf des exemples dans les articles de Teppner et Klein) et d'autres semblent "au repos"; je n'ai pas pu corrélérer ce fait aux conditions de la récolte: météo, heure, t°, etc. si quelqu'un à des idées à ce sujet? Bon voici la recette, et bonne chance!

RECETTE POUR COMPTER LES CHROMOSOMES

I- Ingrédients

1. Colchicine (pour avoir plus de figures métaphasiques, mais c'est facultatif) en solution à 0,05% ou 0,1% (soit 1 comprimé de la colchicine du commerce, uniquement sur ordonnance, pour 1 ou 2 ml d'eau)
2. Carnoy (comme fixateur): méthanol + chloroforme + acide acétique glacial en proportions respectives de 6 / 3 / 1 (prévoir par ex. 12 ml du premier, 6 ml du second et 2ml du dernier).
3. Carmin acétique (comme colorant des chromosomes) il faut 55 ml d'eau, 45 ml d'acide acétique et 0,5 g (c'est cher!) de poudre de carmin: faire bouillir le mélange eau + acide acétique, ajouter le

carmin, maintenir l'ébullition 5', laisser refroidir puis filtrer. Le colorant obtenu se conserve au moins deux ans au frigo. (je fais faire cette préparation par une pharmacie).

II- Matériel

Tubes à essais et microscope à immersion.

III- Technique

Il s'agit de loin de la technique la plus simple; d'autres existent, sans doute plus efficaces, mais nettement plus lourdes.

1. (étape facultative) prélevez un (voire plusieurs) ovaire (le stade bouton floral semble préférable) et plongez le aussitôt 2 à 3 heures (maximum) dans la colchicine.
2. (ou 1.) récupérez les ovaires et plongez les de suite dans le fixateur (préparé de préférence au dernier moment) pendant deux ou trois heures au moins. Les prélèvements peuvent être conservés ainsi une ou deux semaines au frigo et plusieurs années au congélateur.
3. placez l'ovaire dans du carmin acétique, portez le tube à essais à ébullition et maintenir l'ébullition au moins 15 secondes (voire plus; attention aux projections !). Posez l'ovaire refroidi sur une lame que l'on recouvre d'une lamelle (et disséquez le éventuellement pour ne garder que les ovules des ovaires à grosses parois; inutile pour les Nigritelles), puis écrasez l'ovaire (= squashez l'ovaire; j'utilise l'ongle du pouce à travers un buvard pour bien écraser en douceur). Observez enfin au microscope (objectif x100 à immersion), souriez (c'est réussi) et photographiez (c'est une autre recette).

AUTRE RECETTE tirée de Mikio Aoyama and Kohji Karasawa Bulletin of The Hiroshima Botanical Garden N° 10 Mar. 1988ISSN °0386-5304

1. immerger 1 à 2 mm de méristème dans une solution de 0,002 M de 8- hydroxyquinoline pendant 4 H à 18 °C(condensation des chromosomes)
2. Fixer dans de l'acide acétique à 45 % 10 mn à 5°C
3. Hydrolyser dans un mélange HCL 1 N (2V) et Acide acétique à 45 % (1v) quelques mn (de qq secondes à 12 mn environ selon le type et la grosseur des racines)le tout à 60°C.
4. colorer avec une solution acto-orceine 1% en écrasant délicatement les cellules entre lame et lamelle (Squash).

NB:

- Certains auteurs remplacent le 8- hydroxyquinoline par de l'eau glacée une nuit à 4°C pour obtenir le même effet
- On peut réaliser l'hydrolyse acide uniquement dans l'acide chlorhydrique 1N (Tanaka& Kamemoto;1960)
- Les méristèmes une fois fixés peuvent être conservés plusieurs mois à -20°C dans de l'alcool à 70°C et réhydratés avant hydrolyse et coloration.
- On peut utiliser comme colorant la solution de Feulgen (30 mn à T° ambiante)

Complément d'information

De Chantal HUGOUVIEUX, le lundi 24 mars 2003.

Je connais un mycologue belge très sympathique, Marcel LECOMTE, qui peut fournir des colorants ou réactifs pour la microscopie, et en particulier du carmin acétique tout prêt. Voici l'adresse de son site : http://users.skynet.be/Champignons_passion/main.htm. Cliquer sur le bouton "Produits chimiques".

Si vous cliquez sur le bouton "Fiches techniques" vous pourrez lire des fiches sur les différents produits avec leur composition, les précautions à prendre, leur utilisation, etc.

Auteurs

Synthèse réalisée par : **B.C.** et **Daniel MATHIEU**

Date : **Mars 2003**

Ont contribué à cette synthèse :

- Olivier GERBAUD
- Chantal HUGOUVIEUX

Synthèse réalisée à partir d'échanges ayant eu lieu sur [apiferafr](#), listes de discussions sur les orchidées, le 23 mars 2003.