

# techniques de cytogénétique végétale

Joseph Jahier ed.

TECHNIQUES ET PRATIQUES



 **INRA**  
EDITIONS







# techniques de cytogénétique végétale

J. JAHIER

A.M. CHEVRE  
F. EBER

R. DELOURME  
A.M. TANGUY

*et le Groupe de Travail INRA « Cytologie et Cytogénétique »*

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE  
147, rue de l'Université, 75338 Paris Cedex 07

## TECHNIQUES ET PRATIQUES

*Ouvrages parus dans la même collection :*

**Guide des analyses courantes en pédologie**

D. BAIZE  
1988, 172 p.

**Techniques for the brucellosis laboratory**

G.G. ALTON, L.M. JONES, R.D. ANGUS, J.M. VERGER  
1988, 192 p. (en anglais).

**Maladies de la tomate - Observer, identifier, lutter**

D. BLANCARD  
1988, 232 p.

**Espèces exotiques pour la reconstitution du couvert végétal  
en région méditerranéenne**

Bilan des arboretums forestiers d'élimination  
P. ALLEMAND  
1989, 150 p.

**Le cerf et son élevage - Alimentation, techniques et pathologie**

Co-édition INRA - Le Point Vétérinaire  
A. BRELURUT, A. PINGARD, M. THERIEZ  
1990, 144 p.

**Le contrôle anti-dopage chez le cheval**

D. COURTOT, Ph. JAUSSAUD  
1990, 156 p.

**L'alimentation des chevaux**

W. MARTIN-ROSSET  
1990, 232 p.

**Maladies des Cucurbitacées - Observer, identifier, lutter**

D. BLANCARD, H. LECOQ, M. PITRAT  
1991, 320 p.

**Weeds of the Lesser Antilles**

**Mauvaises herbes des Petites Antilles**

J. FOURNET, J.L. HAMMERTON  
Co-édition INRA - CARDI  
1991, 216 p. (anglais, français)

**Illustrated key to West-Palaearctic genera of Pteromalidae**

Z. BOUČEK, J.Y. RASPLUS  
1991, 140 p.

**Maladies de conservation des fruits à pépins**

Pommes et poires  
P. BONDOUX  
Co-édition INRA - PHM Revue horticole  
1992, 174 p.

© INRA, Paris, 1992  
ISBN 2-7380-0396-6  
ISSN 1150-3912

Il est interdit de reproduire intégralement ou partiellement le présent ouvrage - loi du 11 mars 1957 - sans autorisation de l'éditeur ou du Centre Français d'exploitation du droit de Copie, 6 bis, rue Gabriel Laumain, 75010 Paris.

# Sommaire

INTRODUCTION . . . . .	5
OBSERVATION DES CHROMOSOMES : TECHNIQUES DE BASE	
<b>Mitoses</b> . . . . .	7
Introduction . . . . .	7
Nombre et morphologie des chromosomes . . . . .	10
Etablissement de caryogrammes . . . . .	32
<b>Méioses</b> . . . . .	36
Introduction . . . . .	36
Appariement des chromosomes . . . . .	41
Comportement méiotique . . . . .	53
TECHNIQUES COMPLÉMENTAIRES D'ÉTUDE DES CHROMOSOMES ET DE L'ADN	
<b>Banding</b> . . . . .	57
Introduction . . . . .	57
Giemsa-Banding . . . . .	60
Fluorochrome-Banding . . . . .	69
<b>Hybridation <i>in situ</i></b> . . . . .	72
Introduction . . . . .	72
Hybridation <i>in situ</i> sur chromosomes utilisant la radioactivité . . . . .	73
Hybridation <i>in situ</i> d'une sonde d'ADNr biotinylée et fluorescente . . . . .	81
Hybridation <i>in situ</i> sur chromosomes utilisant des sondes d'ADN mar- quées à la digoxygénine et détectées par épifluorescence . . . . .	85
<b>Cytophotométrie et Autoradiographie</b> . . . . .	91
Introduction . . . . .	91
Cytophotométrie . . . . .	94
Autoradiographie . . . . .	96
ÉTUDE DU POLLEN ET DU SAC EMBRYONNAIRE	
<b>Pollen</b> . . . . .	99
Introduction . . . . .	99
Fertilité pollinique après coloration . . . . .	101
Germination du pollen . . . . .	109
Dénombrement chromosomique . . . . .	125

<b>Sac embryonnaire</b> . . . . .	128
Introduction . . . . .	128
Techniques d'observation . . . . .	129
 PRODUCTION D'HYBRIDES INTERSPÉCIFIQUES. CULTURE D'EMBRYONS ET D'OVAIRES FÉCONDÉS	
<b>Techniques</b> . . . . .	137
Introduction . . . . .	137
Culture d'embryons et d'ovaires fécondés . . . . .	139
<b>Composition des milieux</b> . . . . .	146
 POLYPLOÏDISATION	
<b>Obtention de polyploïdes</b> . . . . .	149
Introduction . . . . .	149
Techniques d'obtention . . . . .	150
<b>Estimation du niveau de ploïdie</b> . . . . .	158
Introduction . . . . .	158
Techniques d'estimation . . . . .	159
 ANNEXES	
<b>Préparation de colorants</b> . . . . .	167
Carmin acétique . . . . .	167
Fuschine carbolique . . . . .	168
Réactif de Schiff . . . . .	169
<b>Montage permanent</b> . . . . .	170
Sans séparation lame-lamelle . . . . .	170
Avec séparation lame-lamelle . . . . .	171
<b>Prises de vue</b> . . . . .	172
<b>Ouvrages conseillés</b> . . . . .	173
<b>Liste du matériel végétal</b> . . . . .	174
<b>Liste des rédacteurs</b> . . . . .	176
 TABLE DES MATIÈRES . . . . .	 181



# Introduction

La Cytogénétique fait le lien entre la cytologie et la génétique. Les premiers travaux chez les végétaux ont débuté au cours de la seconde moitié du 19<sup>e</sup> siècle mais c'est surtout à partir de 1920 que la cytogénétique s'est développée et son importance n'a cessé de croître par la suite.

C'est d'abord une science d'investigation. Elle a pris une part active à la compréhension des mécanismes héréditaires et du monde végétal dans sa diversité (taxonomie, phylogénie). C'est aussi une des nombreuses disciplines sur lesquelles s'appuie l'amélioration des plantes. Elle se situe avant tout en amont de la sélection. Elle participe à :

- la connaissance du matériel végétal utilisé : nombre de chromosomes, polyploïdie, allopolyploïdie...,
  - l'établissement de cartes génétiques grâce à la production et l'étude d'aneuploïdes (lignées monosomiques, télosomiques... lignées d'addition...),
  - l'exploitation de la variabilité intraspécifique, interspécifique ou induite.
- L'expérience montre que les outils de la cytogénétique sont indispensables à une exploitation rationnelle des hybrides interspécifiques. Par ailleurs, la cytogénétique a trouvé un nouveau domaine d'application dans l'étude et l'utilisation des produits issus de culture *in vitro* (hybrides somatiques, variants somaclonaux...).

La cytogénétique peut être impliquée au niveau même de la création variétale en participant à l'explication et la résolution de problèmes ponctuels rencontrés par les sélectionneurs : instabilité, stérilité...

En 1970, Madame CAUDERON (laboratoire de cytogénétique, INRA Versailles) crée le groupe de travail INRA « Cytologie-Cytogénétique » qui constitue un point de rencontre pour de nombreux chercheurs utilisant plus ou moins régulièrement les outils de la cytogénétique au sein du Département de Génétique et Amélioration des Plantes de l'INRA, mais aussi dans d'autres instituts et des universités -français ou étrangers- et dans des établissements de sélection.

En 1984, le groupe édite un ouvrage intitulé « Fiches techniques à l'usage des laboratoires de cytologie et de cytogénétique ». Ce manuel est une

## Introduction

compilation de techniques utilisées par les différents membres du groupe. Dans cette seconde édition, de nouvelles techniques utilisées ou élaborées par les participants de plus en plus nombreux aux réunions annuelles du groupe ont été intégrées.

Le champ d'action de la cytogénétique est vaste et ses frontières ne sont pas clairement définies. Les méthodologies employées sont nombreuses. Elles concernent avant tout l'étude des chromosomes lors de la mitose et de la méiose par les techniques classiques mais aussi par des techniques plus récentes (banding, hybridation *in situ*). Un chapitre important de cet ouvrage est consacré aux techniques d'étude du pollen et du sac embryonnaire. Enfin, l'hybridation interspécifique étant utilisée par de nombreux cytogénéticiens, quelques techniques de production d'hybrides interspécifiques, de polyploidisation et d'estimation du niveau de ploïdie sont présentées.

De par son contenu et sa présentation, cet ouvrage est un nouvel outil de travail non seulement pour les chercheurs et techniciens de laboratoires de cytogénétique mais aussi pour les enseignants et étudiants.

# Observation des chromosomes

## Techniques de base

### Mitoses

#### Introduction

Les techniques présentées ont pour objectif la réalisation de préparations chromosomiques qui permettent de :

- dénombrer les chromosomes
- et/ou étudier leur morphologie pour l'établissement de caryotypes ou pour la mise en évidence de modifications chromosomiques (délétions, réarrangements...).

Le matériel d'étude est constitué de semences germées, de plantes ou de tissus en culture *in vitro* placés dans des conditions permettant une croissance active. Le prélèvement des tissus a lieu au moment où le pourcentage de cellules en division (index mitotique) est élevé ; par exemple pour la préparation des protoplastes on utilise des colonies tissulaires en phase exponentielle de croissance.

A partir du prélèvement, 7 phases principales sont distinguées dans la réalisation des préparations.

#### *Le prétraitement*

Il se fait par trempage des tissus en division dans un agent mitoclasique qui a pour effets principaux de :

- bloquer les divisions mitotiques au stade métaphase
- contracter les chromosomes

Les agents utilisés sont : la colchicine, l' $\alpha$ -bromonaphtalène, la 8-hydroxyquinoléine et l'eau froide (0 - 2 °C). L' $\alpha$ -bromonaphtalène est le plus utilisé en raison de sa facilité d'emploi et de son coût.

### *La fixation*

Le fixateur détruit toute vie cellulaire. Il doit avoir une action rapide pour bloquer toute évolution des divisions cellulaires et permettre de conserver l'intégrité structurale des chromosomes.

Les fixateurs utilisables sont très nombreux. Ceux qui sont utilisés dans les techniques décrites sont : l'acide acétique et les « Fluids » I et II proposés par Carnoy (1886).

I = Ethanol acétique (3:1)

II = Ethanol - Chloroforme - Acide acétique (6:3:1)

### *Le stockage*

Il est possible de différer les autres phases. Le matériel peut être conservé pendant plusieurs mois dans l'éthanol, le plus souvent éthanol 70 % . Certains fixateurs comme le Carnoy I peuvent également servir de solution de stockage.

### *L'hydrolyse*

Cette étape est généralement nécessaire pour obtenir ultérieurement un bon étalement des cellules et des chromosomes entre lame et lamelle. L'agent le plus fréquemment employé pour le ramollissement des tissus est l'acide chlorhydrique. Son action peut être associée à celle d'enzymes. L'hydrolyse dissout les sels pectiques de la lamelle moyenne et permet l'éclaircissage du cytoplasme. En outre, l'acide chlorhydrique libère les groupements aldéhydiques sur les molécules de sucre de l'ADN par destruction des liaisons entre les bases puriques et le désoxyribose.

### *La coloration*

Le réactif de Schiff préparé à partir de la fuchsine basique est le colorant le plus utilisé. Il se fixe sur les groupements aldéhydiques libérés lors de l'hydrolyse pour donner une coloration rouge aux chromosomes. Fréquemment, cette technique de coloration est appelée technique « Feulgen » car elle a été décrite pour la première fois par Feulgen (1926).

### *Le montage*

La majorité des techniques présentées concernent les mitoses dans les méristèmes racinaires. Dans ce cas, la zone méristématique hydrolysée et colorée est isolée, déposée sur une lame dans une goutte d'eau acétique ou de carmin acétique et écrasée entre lame et lamelle pour assurer la dissociation des cellules. Cette dissociation est plus difficile si les tissus ont été préalablement stockés dans l'alcool pendant une longue durée et si la quantité de tissu déposé est importante. Il faut éviter un écrasement trop violent car il y a risque d'éclatement des cellules et donc d'observation de cellules incom-

## Mitoses

plètes. Puis, afin d'assurer un bon étalement des chromosomes, un léger chauffage de la lame est conseillé avant d'exercer une pression homogène sur la lamelle.

### *L'observation*

Les chromosomes végétaux ont une longueur moyenne d'environ  $6\mu\text{m}$ . Les cellules en division sont repérées rapidement au microscope photonique à l'aide d'un objectif de faible grossissement ( $G = 10$  généralement). L'observation des chromosomes est faite à un grossissement supérieur. Le plus souvent, les combinaisons (oculaire  $\times$  objectif) utilisées donnent des grossissements compris entre 1000 et 1500.

L'observation peut être différée de quelques jours par la réalisation d'un montage temporaire. Celui-ci, obtenu en lutant la lamelle avec de la dissolution de caoutchouc évite un dessèchement trop rapide de la préparation.

La conservation des préparations pendant plusieurs années peut être souhaitée pour de nombreuses raisons (lames de démonstration, possibilité d'étudier ultérieurement le matériel dans un autre objectif...). Il est alors nécessaire de réaliser des montages permanents (technique décrite Annexes p. 170).

JAHIER J., TANGUY A.M.

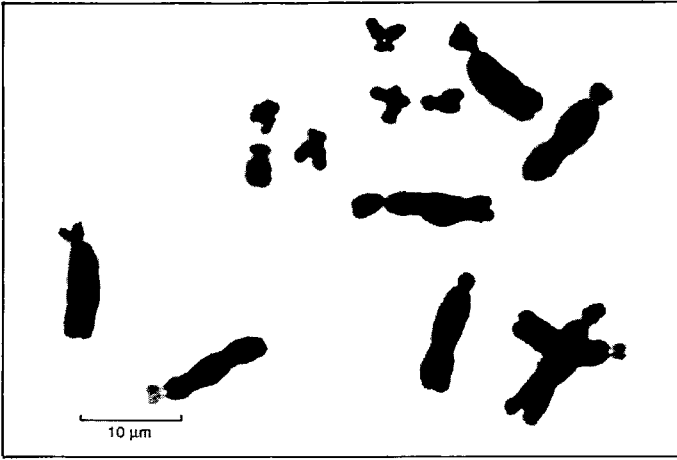
## **Nombre et morphologie des chromosomes**

### **Méristèmes racinaires**

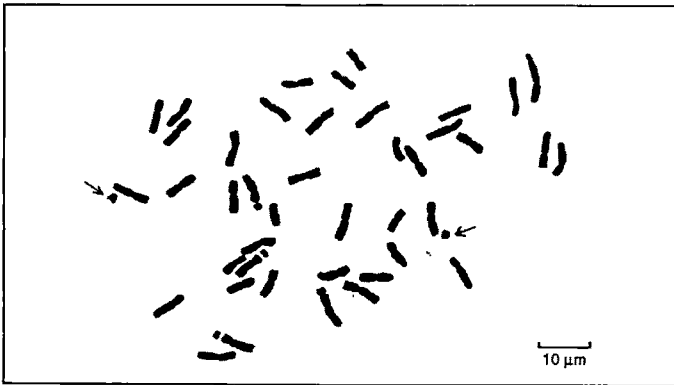
<b>Espèces</b>	<b>Triticées</b> Valable pour toutes les espèces essayées.
<b>Prélèvement</b>	Extrémités de racines en croissance active, en fin d'après-midi, tissus bien turgescents. Possible sur jeunes feuilles, bractées d'involucre, jeunes pétales.
<b>Prétraitement</b>	$\alpha$ -bromonaphtalène en solution saturée (eau ordinaire) pendant 5 h à température ambiante ou 16 h à 5 °C.
<b>Fixation</b>	Acide acétique à 90 %, 30 mn à température ambiante ou 10-12 h à 5 °C.
<b>Stockage</b>	Ethanol 70 % (après avoir effectué 2 rinçages dans éthanol 95 %, 5 mn chacun).
<b>Rinçage</b>	Eau ordinaire, 3 rinçages successifs, de chacun 5 mn.
<b>Hydrolyse</b>	HCl 1M 10-12 mn à 60 °C.
<b>Macération</b>	Pectinase (Fungal, Unit. States Corp.) 2 % dans l'eau distillée, pendant 45 mn à température ambiante. Rincer à l'eau distillée.
<b>Coloration</b>	Réactif de Schiff, 60 mn à température ambiante.
<b>Rinçage</b>	Eau distillée, environ 10 mn.
<b>Montage</b>	Isoler la zone méristématique et l'écraser entre lame et lamelle dans une goutte de carmin acétique de Belling à 1 % ou eau acétique à 45 %.
<b>Rédacteurs</b>	CAUDERON Y. et GAY G.

Mitoses

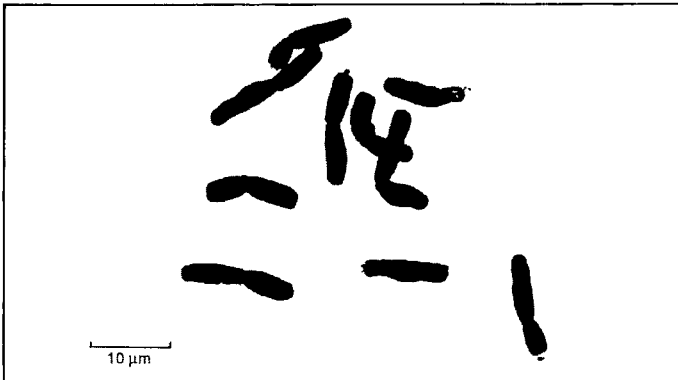
Chromosomes



Gasteria à verrue, *Gasteria verrucosa*,  $2n = 14$  (caryotype asymétrique).



Lignée d'addition ditélosomique blé - *Hordeum chilense*,  $2n = 42 + 2t$   
( $t = '1H^{ch}S$  indiqué par une flèche).



Pivoine, *Paeonia mlokosevitchi*,  $2n = 10$  (une paire avec un microsatellite).

## Nombre et morphologie des chromosomes

### Méristèmes racinaires

<b>Espèce</b>	<i>Pennisetum violaceum</i> (forme sauvage du mil).
<b>Prélèvement</b>	Extrémités de racines en croissance active. Possible à tous les stades de développement de la plante.
<b>Prétraitement</b>	$\alpha$ - bromonaphtalène en solution saturée dans la solution utilisée pour l'arrosage avec adjonction de quelques gouttes de mouillant (Tween) pendant 24 h à 28-32°C (température de culture du mil). Il est nécessaire d'effectuer le prétraitement à la lumière ; en fin de prétraitement, la pointe des racines est colorée en brun.
<b>Fixation</b>	Ethanol acétique (3 : 1) pendant au moins 12 h.
<b>Stockage</b>	Ethanol acétique (3 :1) jusqu'à trois mois. Au-delà, éthanol à 70 %.
<b>Coloration</b>	Carmin acétique 0,5 % plus quelques gouttes d'acétate ferrique.
<b>Montage</b>	Ecrasement ménagé de la zone méristématique entre lame et lamelle, dans du carmin acétique.
<b>Rédacteur</b>	AMOUROUX C.

### Composition pour un litre de solution d'arrosage

#### Macroéléments

Nitrate de potassium . . . . .	0,28 g
Phosphate monopotassique . . . . .	0,14 g
Sulfate de magnésium . . . . .	0,28 g
Sulfate d'ammonium . . . . .	0,14 g
Nitrate de calcium . . . . .	1,11 g
Complexe ferrique d'EDTA . . . . .	0,041 g

#### Oligoéléments

Chlorure de potassium . . . . .	0,028 g
Acide borique . . . . .	0,030 g
Sulfate de manganèse . . . . .	0,0174 g
Sulfate de zinc . . . . .	0,0028 g
Molybdate d'ammonium . . . . .	0,0014 g
Sulfate de cuivre . . . . .	0,0014 g



## Nombre et morphologie des chromosomes

### Méristèmes racinaires

<b>Espèces</b>	<b>Toutes espèces</b>
<b>Prélèvement</b>	Pointes de racines (1 cm de long) en voie de croissance, tissus turgescents.
<b>Prétraitement</b>	$\alpha$ -chloronaphtalène en solution saturée dans l'eau ordinaire pendant 1 à 5 h à température ambiante ou 12 à 16 h à 5 °C.
<b>Coloration</b>	Placer directement les échantillons dans des coupelles ou dans des tubes de verre contenant la solution standard d'orcéine acétique à 1 %. Chauffer jusqu'à émission de vapeurs blanches (60 °C). Prolonger le chauffage en évitant l'ébullition, pendant 5 à 15 mn selon le matériel. Laisser refroidir.
<b>Montage</b>	Isoler le méristème et l'écraser entre lame et lamelle, dans une goutte d'orcéine standard sans HCl.
<b>Remarques</b>	Cette technique de coloration est particulièrement favorable à l'étude des caryotypes. Il faut dans ce cas choisir l'agent chimique de prétraitement le mieux adapté à l'espèce étudiée (colchicine ou 8-hydroxyquinoléine peuvent être préférées à l' $\alpha$ -chloronaphtalène). Il peut y avoir intérêt également à réduire le temps de prétraitement afin d'éviter une trop grande contraction des chromosomes.
<b>Rédacteur</b>	CAUDERON Y.

### Préparation du colorant

Solution-mère d'orcéine (solution de conservation)

Dissoudre par ébullition ménagée 2,2 g d'orcéine (GURR) dans 100 ml d'acide acétique glacial. Laisser refroidir, agiter et filtrer.

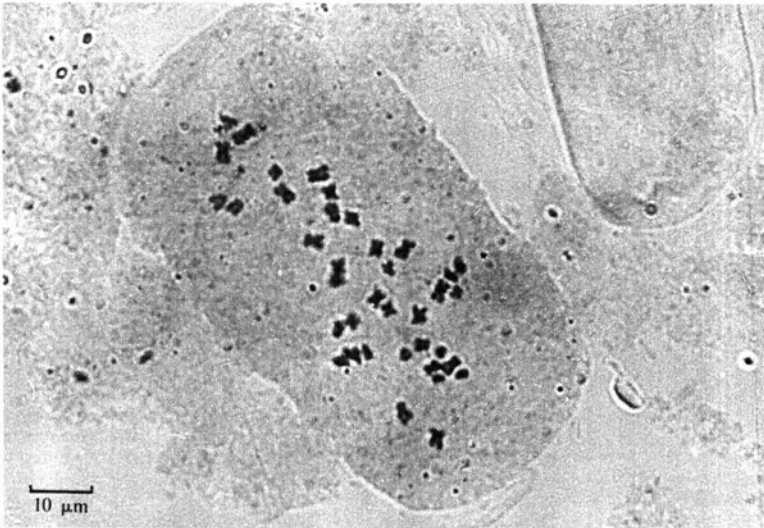
Solution standard à 1 %

La dilution se fait au moment de l'emploi : 4,5 ml de solution-mère, 5,5 ml d'eau distillée.

## Nombre et morphologie des chromosomes

### Méristèmes racinaires

<b>Espèce</b>	Colza
<b>Prélèvement</b>	En pot ou après germination en boîte de Pétri, zones méristématiques des racines.
<b>Prétraitement</b>	8-hydroxyquinoléine (BDH England) en solution aqueuse (0,29 g/l) pendant 4 h à température ambiante. La dissolution de la 8-hydroxyquinoléine se fait à 60 °C à l'aide d'un agitateur magnétique thermostaté ; la solution peut se conserver au réfrigérateur pendant 4 ou 5 jours.
<b>Fixation</b>	Ethanol acétique (3 : 1) pendant 12 h à 4 °C, en tubes bouchés.
<b>Stockage</b>	Alcool 70 % à 4 °C.
<b>Hydrolyse</b>	HCl 1M pendant 10 mn à 60 °C.
<b>Coloration</b>	Réactif de Schiff, 30 mn au moins à température ambiante.
<b>Montage</b>	Dilacération de la zone méristématique dans du carmin acétique de Belling à 1 %, puis après écrasement, addition d'une goutte de fuschine carbolique (voir p. 168).
<b>Rédacteurs</b>	CHEVRE A.M., EBER F.

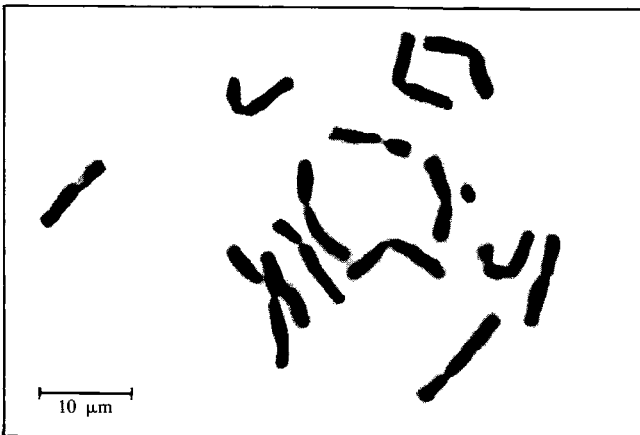


Chromosome de colza, *Brassica napus* L.,  $2n = 38$ .

## Nombre et morphologie des chromosomes

### Méristèmes racinaires

<b>Espèces</b>	<b>Blé, Orge, Betterave, Chicorée</b>
<b>Prélèvement</b>	Extrémités de racines en croissance active prélevées sur de jeunes germinations ou des plantes placées au moins 12 h à l'obscurité.
<b>Prétraitement</b>	1-bromonaphtalène à 1 % pendant 2 h à température ambiante.
<b>Fixation</b>	Ethanol acétique (3 : 1) pendant 24 h à 4 °C.
<b>Stockage</b>	Ethanol 70 % - Conservation au moins 1 an à 4 °C.
<b>Rinçage</b>	3 rinçages successifs avec de l'eau du robinet.
<b>Hydrolyse</b>	HCl 1M 10 mn à 60 °C.
<b>Coloration</b>	Réactif de Schiff, 10 à 15 mn pour le blé et l'orge, 1 à 2 h pour la betterave et la chicorée.
<b>Montage</b>	Dilacération de la zone méristématique dans une goutte d'eau acétique à 45 %. Etalement entre lame et lamelle.
<b>Rédacteur</b>	DEVAUX P.



Chromosomes  
d'*Hordeum bulbosum*  
L.,  $2n = 14$ .

#### Préparation du 1-bromonaphtalène à 1 %

Solution mère de 1-bromonaphtalène (solution de conservation)

1 ml de 1-bromonaphtalène (MERCK Art. 806210) dans 99 ml d'éthanol absolu. Conservation plusieurs années à 4 °C.

Solution à 1 %

La dilution se fait au moment de l'emploi : 1 ml de solution mère, 99 ml d'eau distillée. Bien mélanger. La solution prend un aspect trouble.

## Nombre et morphologie des chromosomes

### Méristèmes racinaires

<b>Espèces</b>	<b>Piment, Aubergine, Tomate</b>
<b>Prélèvement</b>	A effectuer en fin de matinée. Extrémités de racines saines (blanc nacré) en croissance active.
<b>Prétraitement</b>	$\alpha$ -bromonaphtalène en solution aqueuse saturée pendant 3 à 4 h à température ambiante ou 6 à 12 h à 4 °C.
<b>Fixation</b>	Ethanol acétique (3 : 1) pendant au moins 12 h.
<b>Stockage</b>	Ethanol acétique (3 : 1).
<b>Rinçage</b>	Eau distillée.
<b>Hydrolyse</b>	HCl 1M pendant 10 mn à 60 °C.
<b>Macération</b>	Pectinase (Rapidase C) à pH acide à 1 % pendant 50 mn à 35 °C ou 1 h 30 mn à température ambiante. Nécessaire pour l'aubergine et la tomate, inutile pour le piment.
<b>Rinçage</b>	Eau distillée.
<b>Coloration</b>	Réactif de Schiff pendant au moins 1 h, à température ambiante.
<b>Montage</b>	Isoler la zone méristématique et l'écraser dans une goutte de carmin acétique de Belling.
<b>Remarque</b>	Cette technique peut être utilisée pour suivre l'évolution des microspores dans les anthères en culture <i>in vitro</i> . On supprime alors le prétraitement et la macération.
<b>Rédacteur</b>	DUMAS de VAULX R.