

CROISEMENT ET DEVELOPPEMENT DES ZYGOTES CHEZ *ECTOCARPUS SP*

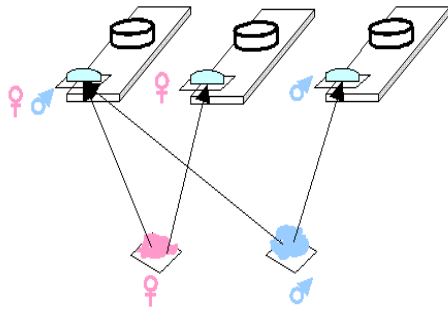
Matériel :

- anneaux type joints de plomberie blanc diamètre 1 cm (attention : joints noirs toxiques),
- vaseline non parfumée,
- lames,
- lamelles 22 x 22 mm,
- gamétophytes fertiles portant des gamétocystes pluriloculaires matures.

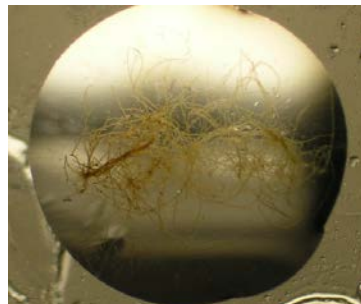
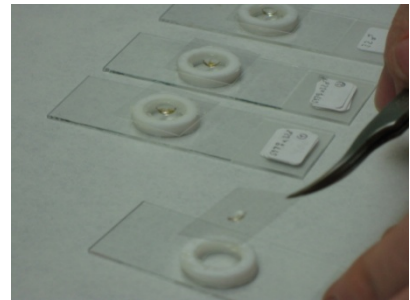
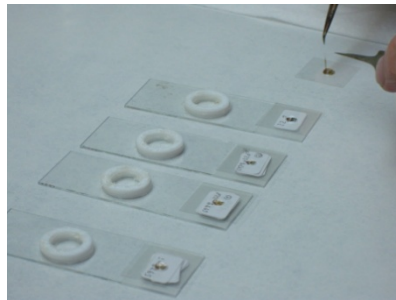
Manipulation (sous hotte à flux laminaire) :

- préparer 6 lames : coller 1 ou 2 anneaux selon leur épaisseur avec de la vaseline sur chaque lame, et déposer de la vaseline sur le dessus pour pouvoir coller la lamelle ultérieurement,
- poser une lamelle sur le bord de chaque lame pour qu'elle soit facilement saisissable et déposer dessus 30 μ l d'eau de mer avec du Provasoli,
- préparer deux lamelles sur la paillasse et déposer dessus chaque parent (évite de prélever directement dans la culture pendant la manipulation),
- déposer un fragment de gamétophytes dans chaque goutte (avec 1-10 gamétocystes pluriloculaires) : faire au moins deux lames avec chaque parent pour le croisement (σ et ρ) et deux lames de contrôle avec les parents séparés,
- retourner la lamelle sur l'anneau et laisser la nuit à 13°C,

jour J



**attention aux contaminations
entre les parents !!!!**

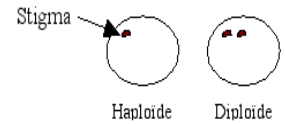


fragments de gamétophytes

σ et ρ

- le lendemain, faire un contrôle sous microscope : présence de 2 stigmas sur les zygotes,

- ces stigmas ne sont plus visibles au bout de 24-48 h,
- vérifier avec les parents que les gamètes n'ont pas 2 stigmas (pas d'anomalie),
- vérifier qu'il y a beaucoup de zygotes dans la goutte sinon les cellules à 2 stigma peuvent être des pseudo-zygotes,
- si 3 ou plus de 3 stigmas, polyspermie, événement rare mais possible,



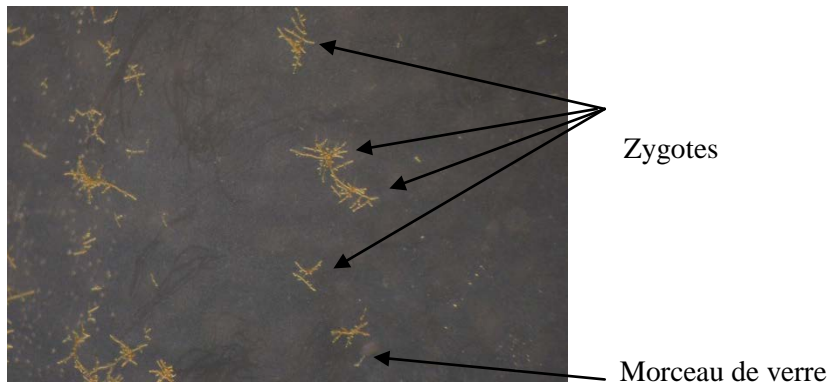
- retourner les lamelles et enlever les filaments,
- rincer environ 10 fois (avec une pipette pasteur, enlever la goutte de la lamelle, en remettre une puis recommencer 10 fois),
- vérifier sous le microscope que la goutte recouvre bien tous les zygotes,
- faire une marque sur un coin de la lamelle pour repérer facilement le zygote lors de son développement,
- faire un schéma de la goutte avec l'emplacement des zygotes et des points de repère (marque sur la lamelle, bord de la goutte, morceau de verre, groupe de gamètes) : repérer au moins 10 zygotes,
- conserver les lames à 13°C lumière normale et vérifier le développement des zygotes sous microscope (rectifier le schéma en fonction du développement des zygotes et des gamètes) : les zygotes se développent plus vite que les gamètes,

J+7j

- retourner la lamelle dans une boîte de Pétri 60 mm avec de l'eau de mer + Provasoli, faire attention que la marque sur la lamelle soit toujours présente,
- faire une nouvelle observation avec le microscope inversé pour repérer les zygotes et un nouveau schéma,
- conserver les boîtes à 13°C et suivre la croissance des zygotes,

J+8-9j

- au bout de 1-2 jours en boîte de Pétri : nettoyer la zone autour des zygotes qui ont été repérés (enlever les germes de gamètes et d'autres zygotes) sur le microscope inversé en utilisant une aiguille avec l'extrémité pointue passée dans l'alcool,
 - repérer à grossissement x10 ou x40 le zygote et le placer au centre du champ,
 - passer à grossissement x4,
 - descendre l'aiguille dans le champ jusqu'à voir l'ombre,
 - approcher l'aiguille du fond de la boîte sur le germe à enlever,
 - toucher avec l'extrémité de l'aiguille le germe qui va coller à l'aiguille,
 - sortir l'aiguille de l'eau pour décoller le germe de l'aiguille,
 - recommencer et faire un nouveau schéma,



J+21-22j

- suivre le développement des zygotes avec le microscope inversé pendant environ 2 semaines,
- transférer 1 zygote par boîte de Pétri diamètre 60 mm contenant de l'eau de mer et du Provasoli (pipette Pasteur),
- contrôler le développement des thalles et vérifier qu'il n'y ait pas d'autres individus dans la boîte (germes de gamètes).



attention à l'huile utilisée sous microscope : marque Zeiss (les autres peuvent être toxiques) => penser à nettoyer le côté de la lamelle avec l'huile avec de l'alcool avant de la transférer dans la boîte de Pétri.