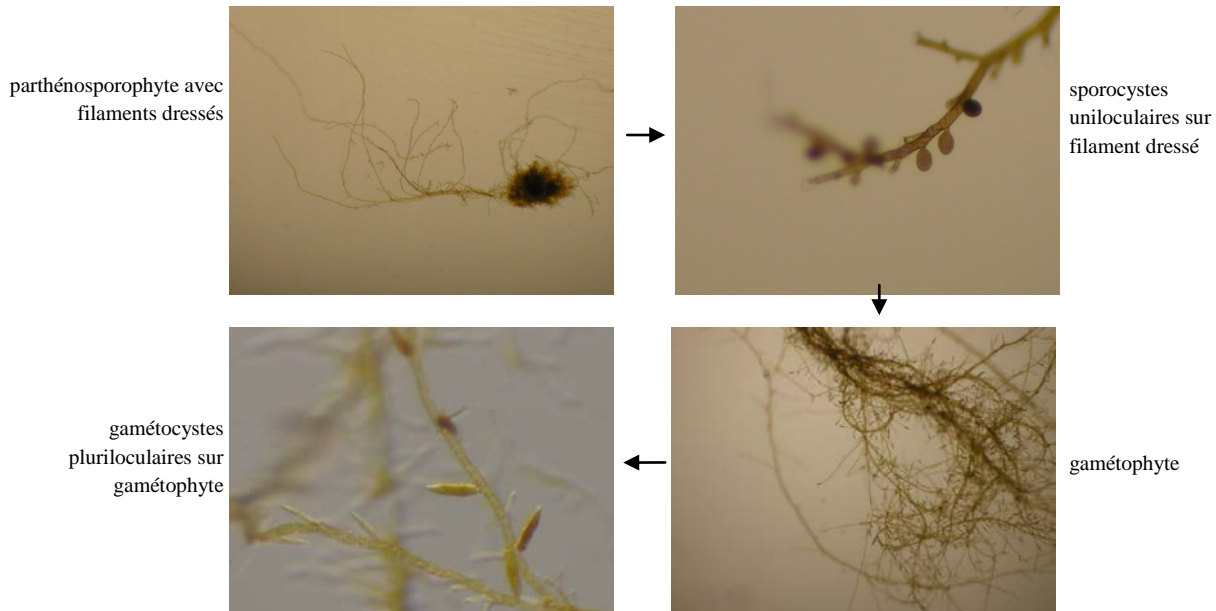


ECTOCARPUS SP

PRODUCTION DE SPOROCYSTES UNILOCAIRES ET DE GAMETOPHYTES



Production des sporocystes uniloculaires

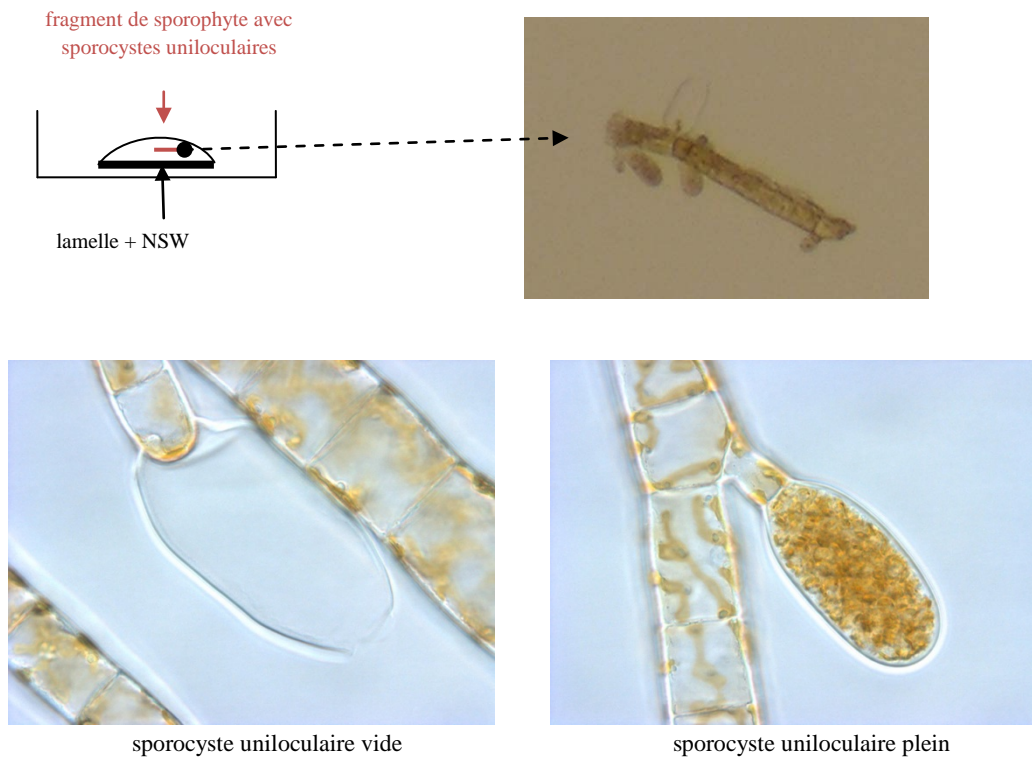
- isoler 1 parthénosporophyte ou sporophyte par boîte de Pétri diamètre 90 mm et contrôler le développement des filaments dressés puis des sporocystes,
 - les sporocystes uniloculaires apparaissent après les sporocystes pluriloculaires,
 - ne pas changer d'eau de mer (risque de ne pas avoir de sporocystes uniloculaires).

Isolement des sporocystes uniloculaires

- isoler le(s) sporophyte(s) portant les sporocystes uniloculaires matures dans une boîte de Pétri avec de l'eau de mer,
- préparer des boîtes de Pétri (diamètre 90 ou 55mm) avec une lamelle autoclavée 18 x 18 mm (pour coller la lamelle dans la boîte, mettre une goutte d'eau de mer dans la boîte puis poser la lamelle dessus),
- couper le filament dressé avec une pipette Pasteur entre les sporocystes uniloculaires et le transférer sur la lamelle à l'aide de la pipette Pasteur ,
 - 1 fragment par boîte de Pétri et 1 sporocyste par fragment sauf si beaucoup de sporocystes => isoler plusieurs sporocystes et indiquer le nombre sur la boîte
 - attention à ne pas mettre de sporocystes pluriloculaires,
 - attention à ne pas mettre d'autres fragments de filaments,
- recouvrir la lamelle d'eau de mer, parafilmer et stocker à 13°C lumière forte,
- surveiller le relâchement (1-3 jours après isolement) avec une loupe binoculaire, si au bout de 3 jours, pas de relâchement => à jeter (germination possible des spores dans les sporocystes, contamination bactérienne, ...),



- après relâchement, enlever le fragment avec une pince et remplir la boîte de Pétri d'eau de mer avec du Provasoli.



Production des gamétophytes

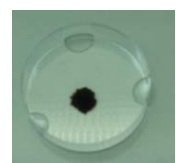
- stocker les boîtes de Pétri avec relâchement à 13°C, lumière faible* et contrôler le développement des gamétophytes (2-4 semaines).

Isolement des gamétophytes

- lorsque les gamétophytes sont visibles sous la loupe (0,2 mm), les transférer dans des boîtes de Pétri diamètre 140 mm (10 / boîte),
- laisser les boîtes à lumière faible* pour permettre la croissance des gamétophytes (lumière normale*, les gamétocystes pluriloculaires peuvent arriver très vite avant la croissance des gamétophytes),
- lorsque la croissance est suffisante (environ 1 cm), transférer les gamétophytes à lumière forte* pour développement et maturation des gamétocystes pluriloculaires,
- contrôler la maturité des gamétocystes pluriloculaires sous la loupe binoculaire (si suffisamment foncés, préparer un relâchement).

Relâchement des gamétophytes

- la veille du relâchement des gamètes, simulation de la marée basse :
 - mettre les gamétophytes au centre d'une boîte de Pétri diamètre 55 mm : faire une boule, enlever l'excès d'eau de mer et placer au bord de la boîte 3 gouttes d'eau de mer (pour apporter un peu d'humidité),

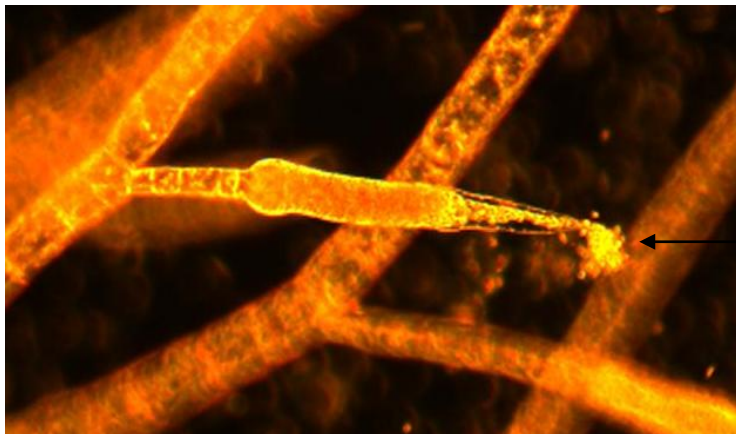


* : lumière faible 1,5-1,8 $\mu\text{mol.s}^{-1}\text{m}^{-2}/\mu\text{A}$ - lumière normale 5-5,6 $\mu\text{mol.s}^{-1}\text{m}^{-2}/\mu\text{A}$ - lumière forte 15,9-20,9 $\mu\text{mol.s}^{-1}\text{m}^{-2}/\mu\text{A}$

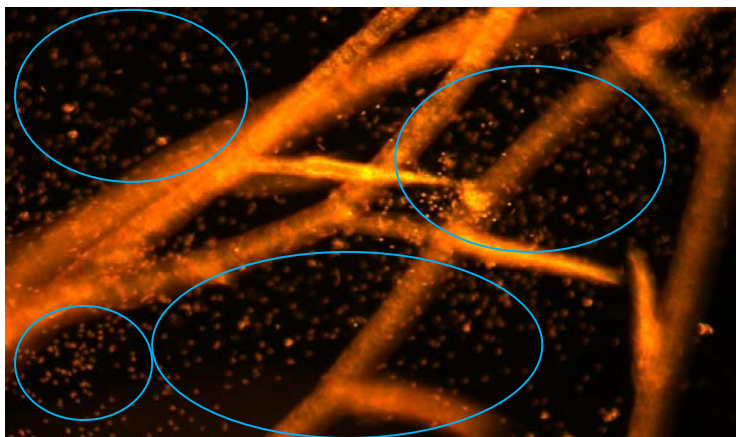
- parafilmer et mettre à l'obscurité dans une boîte à 13°C pendant 10 à 18 heures (si urgence, préparer la boîte le matin et la laisser 4 h à l'obscurité).

➤ Le jour du relâchement, simulation de la marée haute :

- ajouter 300-500 µlitres (selon les besoins) d'eau de mer naturelle,
- au bout de 5 mn, contrôler le relâchement à la loupe (ne pas dépasser 20 mn sinon les gamètes risquent de se coller dans le fond de la boîte),
- prélever les quantités nécessaires selon les besoins avec une pipette,
- remettre les gamétophytes dans de l'eau de mer avec du Provasoli (les gamétophytes peuvent servir à 3-4 relâchements).



gamétocyste pluriloculaire en cours de relâchement



relâchement de gamètes

Production de parthénosporophytes ou sporophytes

- lors du relâchement des gamétophytes, prélever de l'eau de mer avec des gamètes à l'aide d'une pipette et transférer dans des boîtes de Pétri diamètre 140 mm, (on peut compter le nombre de gamètes par boîte en utilisant la cellule de Neubauer modifiée – voir fiche 12),
- conserver à 13°C lumière faible*.

Rq : pour permettre le développement des parthénosporophytes ou sporophytes, prélever 10-20 µl d'eau de mer avec gamètes.

* : lumière faible 1,5-1,8 µmol.s⁻¹m⁻²/µA - lumière normale 5-5,6 µmol.s⁻¹m⁻²/µA - lumière forte 15,9-20,9 µmol.s⁻¹m⁻²/µA