

Coloration de la vacuole au Rouge Neutre

Il semble que certains collègues rencontrent des difficultés pour réaliser la coloration de la vacuole au Rouge Neutre, voire abandonnent cette technique au cours des séances de travaux pratiques consacrées à l'étude de l'organisation cellulaire. En effet, dans certaines conditions, le résultat obtenu n'est qu'une coloration de la paroi squelettique de la cellule végétale.

Or il est parfaitement possible de réussir sans difficulté la manipulation, notamment lorsqu'on prend le matériel d'étude classique qu'est le petit fragment d'épiderme interne d'écaille de bulbe d'Oignon. Il faut se rappeler que la perméabilité cellulaire dépend du pH des solutions ou colorants utilisés. La préparation du Rouge Neutre nécessite une mise en solution qui ne pose pas de problème quand on dispose d'une eau distillée à pH voisin de la neutralité.

Mais nos laboratoires disposent en général d'un déminéralisateur qui fournit une eau déminéralisée dont le pH est acide, situé entre 5 et 6. Dans ces conditions, le Rouge Neutre ne permet pas de mettre en évidence la vacuole. Le remède consiste à utiliser une solution tampon au pH voisin de la neutralité, par exemple pH = 7,4.

MATÉRIEL

- | | |
|-----------------------------|--------------------------------|
| - Phosphate monopotassique; | - Rouge Neutre à 1 %; |
| - Phosphate disodique; | - Bulbe d'Oignon; |
| - Eau distillée; | - Lames, lamelles, microscope. |

RÉALISATION

Préparation de la solution tampon

• On fait une solution de phosphate monopotassique M/15, soit 9,08 g de KH_2PO_4 par litre, et une solution de phosphate disodique M/15, soit 9,47 g de Na_2HPO_4 par litre. Le pH de 7,4 est obtenu en mélangeant par exemple 161 ml de la solution de phosphate disodique et 39 ml de la solution de phosphate monopotassique.

• Au moment de la manipulation il suffit alors de mélanger la solution de Rouge Neutre à 1 g/litre et la solution tampon à pH 7,4. Les proportions : 1 volume de Rouge Neutre pour 3 volumes de solution tampon donnent de bons résultats, mais il est recommandé de faire le mélange juste avant l'emploi.

UTILISATION

Le fragment d'épiderme est directement disposé dans une goutte du mélange Rouge Neutre-solution tampon.

Si l'on désire, par contre, étudier la plasmolyse et la déplasmolyse provoquée, la coloration se fait dans un verre de montre pendant environ 2 minutes, puis l'épiderme coloré est monté dans une goutte de solution hypertonique par rapport au contenu vacuolaire, telle une solution de saccharose molaire. La plasmolyse qui suit dans les 3 à 5 minutes est toujours parfaitement observable. La déplasmolyse peut être provoquée très facilement en disposant une goutte d'eau sur le bord de la lamelle et en aspirant de l'autre côté avec du papier filtre.

Il est évident que la réussite de ces manipulations dépend aussi d'autres paramètres; entre autres, les élèves doivent veiller à ne pas prélever un fragment trop important et surtout ne pas le laisser se dessécher à l'air.