

La régénération in vitro des plantes à partir de protoplaste de pomme de terre

Les protoplastes une méthode rapide et efficace ?

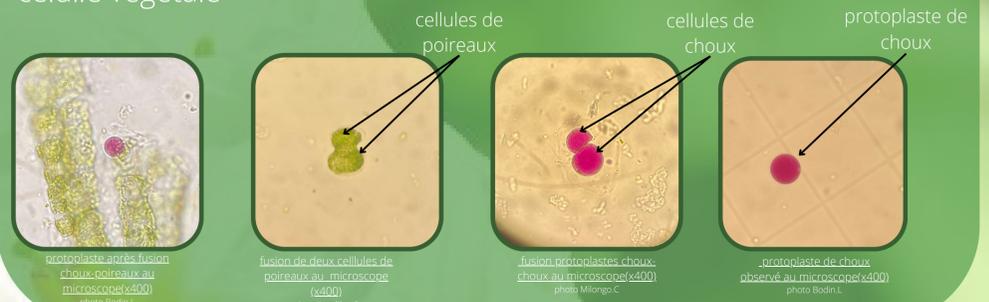
Contexte:

Les protoplastes sont utilisés ici pour augmenter la vitesse de régénération des plantes qui sont cultivées en cultures in vitro. On contrôle plusieurs facteurs : l'isolement, la purification, l'induction de cals et la régénération. Plusieurs tests ont été expérimentés pour savoir quelle méthode ou quelle concentration serait la plus efficace pour l'obtention des protoplastes viables à haut rendement. De nouveaux processus de régénération in vitro impliquant l'utilisation des protoplastes voient leur mise en place. On y retrouve notamment l'utilisation des protoplastes de pommes de terres.



C'est quoi un protoplaste ?

Les protoplastes sont des cellules de plantes, de bactérie, de champignons dont les parois cellulaires ont été supprimées à l'aide d'un processus enzymatique ou mécanique. Grâce à l'utilisation de protoplaste cela permet une amélioration variétale, une résistance accrue au virus ou même une transformation génétique d'une cellule végétale

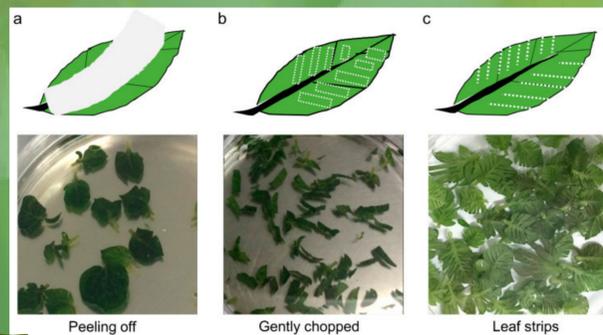


Expériences et résultats de la régénération in vitro :

1 Le protocole d'obtention des protoplastes se découpe en plusieurs étapes ...

Avant d'extraire les protoplastes il faut rigoureusement préparer les cultures, elles doivent donc respecter des conditions de croissance strictes (avec un ph de 5,7, milieu composé de sel minéraux et de vitamines, de saccharose (30g/l) et 8 g/L de gélose végétale) le tout cultivé dans une chambre à 25°C sous une lampe blanche

2 Matériels et méthodes



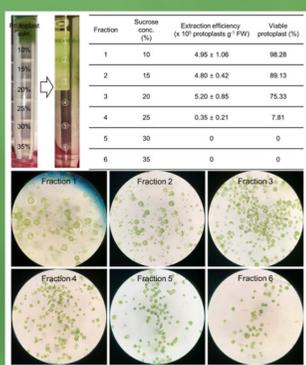
Coupage de l'épiderme avec une lame stérile selon 3 méthodes: (hachage et utilisation de ruban 3M pour retirer l'épiderme (a), épluchage (b), taillage en bande: plaies partielles des deux cotés de la nervure permettant de retirer les bandes foliaires(c))

3 Résultats

Extraction de protoplaste à partir de conditions enzymologiques : 3 types de conditions ont été élaborées, la condition d'extraction M3 est la plus optimale on introduit 1g d'épiderme pour 30 ml de solution d'extraction nous pouvons également ici voir la constitution des milieux M1, M2 et M3.

Les conditions	Moyen	Cellulase/Macérozyme (% p/v)	Volume de solution de lavage.	Agitation (tr/min)	Temps de plasmolyse (h)	Temps d'enzymolyse (h)	Efficacité d'extraction ($\times 10^5$ Protoplastes/g FW)
M1	20 mM Acide 2-(N-Morpholino)éthanesulfonique (MES)					5	5,24 ± 1,90
	0,5 M mannitol	1/0,2	1x	0	1	6	8,56 ± 1,84
	20 mM KCl 10 mM CaCl ₂ 0,1 % Albumine sérique bovine (BSA) pH 5,7					18	12,27 ± 3,40
M2	20 mM MES					5	21,09 ± 8,49
	0,5 M mannitol	1/0,5	1x	40	0	6	39,63 ± 4,09
	20 mM KCl 10 mM CaCl ₂ 0,1 % BSA pH 5,7					18	28,14 ± 3,34
M3	20 mM MES					5	36,40 ± 4,66
	0,5 M mannitol	1/0,5	3x	40	0	6	63,59 ± 5,14
	20 mM KCl 10 mM CaCl ₂ 0,1 % BSA pH 5,7					18	N/A

4 protoplastes viables



5 Immobilisation et isolement des protoplastes :

Les protoplastes sont plongés dans une solution d'alginate de sodium pour empêcher l'agglutination des protoplastes (avec une concentration finale de: 5×10^4 protoplaste/ml) et cela favorise aussi la division mitotique. Cette solution est solidifiée en gouttelettes formant des lentilles d'alginate



6 La régénération végétale :

Les gouttelettes solidifiées sont transférées dans un milieu permettant la formation de callosité puis ces microcals sont transférés dans un milieu de prolifération. Ces microcals sont ensuite incubés dans un milieu de verdissement qui vont alors former des jeunes pousses

Conclusion

Grâce au protocole et aux différentes expériences appliquées, il a été trouvé la solution la plus efficace en faisant varier plusieurs facteurs : la méthode d'isolement, différents gradients de saccharose, l'isolement et l'immobilisation à partir de solution d'alginate de sodium, le temps, permettant la production de protoplastes viables à haut rendement

Les rendements de protoplastes sont environ 3.7 fois plus élevés qu'une simple culture de protoplaste (soit de $6,36 \pm 0,51 \times 10^6$ protoplastes/g de poids frais) et la régénération des pousses se voit améliorée.



Bibliographie

H.-SK et J.-HJ ont conceptualisé et supervisé l'étude ; K.-BM a réalisé et analysé les expériences et rédigé le brouillon du manuscrit ; J.-SP, S.-JP et S.-RM ont réalisé les expériences d'induction de cals et de régénération des pousses ; H.-SC, Y.-IP et H.-JL ont analysé les données et révisé le manuscrit. Article publié le 22 juin 2018 par Hsiang-Yin Lin, Jhun-Chen Chen et Su-Chiung Fang