

Protoplaste, l'avenir de la régénération biologique ?

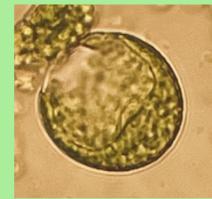
LA RÉGÉNÉRATION IN VITRO DES PLANTES À PARTIR DE PROTOPLASTES DE POMMES DE TERRE

Qu'est ce qu'un protoplaste?

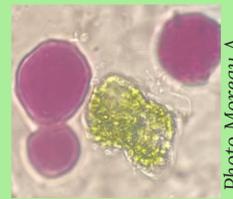
Un protoplaste est une **cellule végétale ayant perdu sa paroi pecto-cellulosique**. Cela permet des fusions somatiques entre différents protoplastes, permettant de **créer des hybrides** entre espèces. Par exemple la pomate qui est la fusion entre la pomme de terre et la tomate.



Protoplaste de poireau (microscope x400)



Protoplaste mort (microscope x400)



Fusion poireau-poireau et fusion chou-chou (microscope x400)

Introduction

Depuis 1975, les cultures de protoplastes de pommes de terre ont été étudiées afin d'établir des **méthodes efficaces et reproductibles** pour la régénération des pousses. L'hybridation somatique permet de **transférer des résistances** aux insectes, aux maladies (mildiou), et la tolérance aux herbicides (métribuzine). La pomme de terre est une espèce facilement transformable par l'introduction d'ADN exogènes et qui produit un grand nombre de pousses transgéniques.

L'objectif est d'atteindre un taux de régénération élevé des pousses in vitro à partir de protoplastes en vérifiant et en contrôlant plusieurs facteurs telles que l'isolation, la purification, l'induction de cals et la régénération.

Protocole

1 **Extraction** des protoplaste de pomme de terre: On utilise 3 méthodes d'extractions (décollement, hachement, et bande foliaire).



2 **Lavage** : On introduit les protoplastes dans 3 milieux de lavages différents (M1, M2 et M3) pour une durée de 6h.

Tableau 1 : Composition et technique de lavage

Nom	Composition	Cellulase/Maceroyzime (% w/v)	Volume	Incubation (min)	Temps de plasmolysis (heure)	Temps d'enzymolysis (heure)	Efficacité d'extraction (% protoplaste/g)
M1	20 mM MES 0.5 M mannitol 20 mM KCl 10 mM CaCl2 0.1% Bovine Serum Albumin (BSA) pH 5.7	1/0.2	3*	0	1	5	5.24 ± 1.90
						6	8.56 ± 1.84
						18	12.27 ± 3.40
M2	20 mM MES 0.5 M mannitol 20 mM KCl 10 mM CaCl2 0.1% BSA pH 5.7	1/0.5	1*	40	0	5	21.09 ± 6.49
						6	39.63 ± 4.09
						18	28.14 ± 3.34
M3	20 mM MES 0.5 M mannitol 20 mM KCl 10 mM CaCl2 0.1% BSA pH 5.7	1/0.5	3*	40	0	5	36.40 ± 4.66
						6	63.59 ± 5.14
						18	N/A

3 **Purification** : Avant l'induction il faut faire baigner pendant 15min les protoplastes dans une solution de saccharose concentrée entre 10 et 20% afin de conserver les protoplastes viables. (2ml de protoplaste + 6ml de solution de saccharose)

4 **Induction** des micro-cals : On place les protoplastes en incubation dans deux milieux différents CI 1 et CI 2. La composition des deux milieux utilisés diffère surtout en termes de sels inorganiques et de vitamines.

Tableau 2 : Composition des milieux d'induction

Nom	Composition
CI 1	Stocks macro B et micro B, éléments de fer B, glucides B, vitamines B, NAA à 1,0 mg/L, 0,4 mg/L BAP et autres matières organiques, pH 5,6
CI 2	Stocks de macro A et micro A, éléments de fer A, glucides A, vitamines A, 1 g/L de BSA, 1,0 mg/L de NAA, 0,4 mg/L de BAP et autres matières organiques, pH 5,6

5 **Prolifération** : On place les protoplaste en incubation dans le milieu P pendant 4 semaines.

Tableau 3 : Composition du milieu de prolifération

Nom	Composition
P	107 mg/L NH4Cl, 2,5 g/L de saccharose, 54,7 g/L de mannitol, 40 mg/L de sulfate d'adénine, 0,1 g/L d'hydrolysat de caséine, vitamines C, 0,1 mg/L de NAA, 0,5 mg/L de BAP

6 **Verdissement** des callosités : On place en incubation dans le milieu G pendant 4 à 6 semaines.

Tableau 4 : Composition du milieu de verdissement

Nom	Composition
G	267,5 mg/L NH4Cl, 2,5 g/L de saccharose, 36,4 g/L de mannitol, 80 mg/L de sulfate d'adénine, 0,1 g/L d'hydrolysat de caséine, vitamines C, 0,1 mg/L d'AIA, 2,5 mg/L de zéatine

7 **Régénération des pousses** : Pour induire la croissance des pousses à partir de ces cals verts, les cellules ont été transférées dans deux milieux de régénération que sont SI 1 et SI2, pour déterminer le milieu optimal.

Tableau 5 : Composition des milieux de régénération

Nom	Composition
SI 1	30 g/L de saccharose, 0,01 mg/L de NAA, 2,0 mg/L de zéatine, 0,1 mg/L d'acide gibbérellique (GA3), 4,0 g/L de gélose végétale, pH 5,6
SI 2	10 g/L de saccharose, sans vitamines, sans myo-inositol, 0,01 mg/L de NAA, 2,0 mg/L de zéatine, 0,1 mg/L de GA3, 2,5 g/L de gélarite, pH 5,6

Résultats

1 La méthode d'extraction permettant d'obtenir un nombre maximal de protoplaste est l'utilisation de bandes foliaires (13,23*10⁵ protoplaste/g). Les résultats montre que cette méthode est 3 fois plus efficace que la première et 2 fois plus efficace que la deuxième.

2 On observe que le meilleur milieu de lavage est le milieu M3, il permet une meilleure extraction des protoplaste.

Tableau 6 : Efficacité des milieux de lavages

Milieu	M1	M2	M3
Efficacité d'extraction (x10 ⁵ Protoplaste/g)	8.56	39.63	63.59

4 Les protoplastes ont montré une meilleure induction de micro-cals en milieu CI 2 contenant une solution de BSA à 1g/L et des vitamines A. Néanmoins, par rapport à ceux induits en milieu CI 1, les micro-cals induits en milieu CI 2 ont proliféré et se sont développés plus vigoureusement.

5 Pour obtenir une prolifération optimale, il est nécessaire d'avoir un espace approprié au développement, vérifier préalablement la présence de bactéries endogènes des feuilles puis privilégier une plante in vitro stérile afin de minimiser les risques de contamination.



Photo KI-Beom Moon

6 La couleur de la plupart des cals viables avec une taille suffisante de 1 cm² passe du vert clair au vert foncé.



Photo KI-Beom Moon

7 La régénération des pousses à été optimale dans le milieu SI 2, ce milieu donc préférable au milieu SI 1.

Analyse

Pour augmenter la production de protoplaste, un temps d'enzymolyse plus long est bénéfique. Il est possible de réduire ce temps en modifiant les conditions d'extraction, le volume tampon de lavage et le type d'enzyme utilisé. Ensuite, la purification permet d'obtenir un grand nombre de protoplastes viables. La croissance des pousses n'a été induite que dans le milieu SI2, cela montre qu'une concentration trop élevée en saccharose ralentit la croissance des protoplastes. Enfin, une faible concentration en gélarite a eu un effet positif sur la régénération des pousses.

Conclusion

Pour conclure, cette étude a mis en évidence une méthode de régénération des protoplastes de pomme de terre. Cette méthode a donné 80% d'efficacité de régénération pour les pousses cultivées in vitro. Ce système pourrait aider à développer de nouvelles variétés de pommes de terre ainsi qu'augmenter la vitesse production de ce féculent.

Bibliographie

- A More Accessible, Time-Saving, and Efficient Method for In Vitro Plant Regeneration from Potato Protoplasts - PMC (nih.gov)
- Culture in vitro et la multiplication végétative (La) | CNRS Images