

## Choix du matériel à utiliser pour l'isolement de protoplastes de bananier (*Musa sp.p.*), Musacées.

F. BAKRY\*

CHOIX DU MATERIEL A UTILISER POUR L'ISOLEMENT DE PROTOPLASTES DE BANANIER (*MUSA sp.p.*). MUSACEES.

F. BAKRY.

*Fruits*, Jul.-aug. 1984, vol. 39, n° 7-8, p. 449-452.

RESUME - Des isolements de protoplastes ont été réalisés à partir de tissus et de cals de bananier (*Musa spp.*). Avec une même solution enzymatique, on n'obtient que des cellules isolées si le matériel est d'origine foliaire (limbes, cals issus de feuilles), alors que l'on ne récupère que des protoplastes si l'on utilise des cals issus de tissus inflorescentiels.

### INTRODUCTION

Les bananiers à fruits comestibles (*Musa sp.p.*) sont parmi les plantes les plus cultivées des zones intertropicales, que ce soit en exploitation vivrière ou bien pour le commerce international. Leurs traits caractéristiques sont la parthénocarpié, l'aspermie, la triploïdie ( $2n = 33$ ). Ces bananiers sans graines ne se reproduisent que par voie asexuée.

Des programmes d'amélioration par hybridation avec des espèces sauvages ( $2n = 22$ ) ont été entrepris depuis longtemps afin de conférer aux cultivars utilisés des résistances aux principaux agents pathogènes. Il s'agit en particulier de champignons (*Mycosphaerella musicola* LEACH, *M. fijiensis* MORELET, responsables des cercosporioses jaune et noire ; *Fusarium oxysporum* var. *cubense* SMITH entraînant la maladie de Panama) et de bactéries (*Pseudomonas solanacearum* SMITH agent de la maladie de Moko) (CHAMPION, 1984).

\*La stérilité plus ou moins complète des cultivars intéressants, liée principalement à la structure triploïde de ces

plantes, représente un obstacle majeur à surmonter dans tous les travaux de sélection classique.

L'utilisation des diverses techniques de culture *in vitro*, permet, depuis quelques années, d'aboutir à la création d'une variabilité autrement que par la voie sexuée. Ces nouvelles méthodes, de mieux en mieux contrôlées, peuvent s'insérer raisonnablement dans les programmes de sélection. Elles s'avèrent même indispensables lorsque, pour le matériel concerné, et c'est bien le cas pour le bananier, les voies classiques de sélection sont, nous l'avons dit, potentiellement limitées.

On sait, en effet, à l'heure actuelle, au moins chez un certain nombre de plantes, obtenir des «embryoïdes» ou des bourgeons néoformés conduisant à des plantes entières à partir de cals, de culture de tissus, de cellules isolées ou de protoplastes. De nombreux travaux effectués ces dernières années (LARKIN et SCOWCROFT, 1981 ; SCOWCROFT et LARKIN, 1982 ; MEINS, 1983 ; ORTON, 1983) ont montré que lorsque l'initiation des individus néoformés passait par une étape plus ou moins importante de prolifération anarchique, ils pouvaient être différents de la plante de départ, les différences pouvant porter sur la structure du patrimoine génétique ou sur son expression.

\* - Laboratoire de Morphogénèse expérimentale végétale, associé au CNRS - Bat. 360 - Université Paris Sud - F 91405 ORSAY.

Parmi les voies nouvelles offertes par la culture *in vitro*, l'une des plus séduisantes est sans doute l'isolement et la culture de protoplastes car elle permet ensuite tout un ensemble de biotechnologies nouvelles telles que l'hybridation somatique, l'introduction de matériel nucléaire étranger, etc. Déjà dans ce domaine, des résultats intéressants ont été obtenus sur des plantes à intérêt économique telles que la pomme de terre (SHEPARD et al., 1983) ou des céréales : blé, orge par exemple (DAVEY, 1983).

Mais si les techniques sont au point pour un certain nombre de dicotylédones appartenant principalement à la famille des Solanacées, les succès sont beaucoup plus rares chez les monocotylédones (VASIL et VASIL, 1983). Il paraît essentiel, néanmoins, que des travaux de ce type soient entrepris sur le bananier.

Nos efforts se sont portés dans un premier temps sur le choix du matériel végétal à utiliser pour isoler des protoplastes. En effet, ce paramètre revêt une importance particulière chez les monocotylédones où la qualité du matériel végétal d'origine influe de façon prépondérante sur la capacité des protoplastes à se diviser ultérieurement (CHIN YI LU et al., 1981).

#### MATERIEL ET METHODES

##### Matériel végétal utilisé.

Le matériel utilisé pour l'isolement de protoplastes est cultivé aseptiquement *in vitro* sur un milieu de base (LSb) proche de celui de LINSMAIER et SKOOG (1965), dans des conditions écologiques bien définies ( $27^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , 70 p. 100 d'humidité relative, obscurité totale ou lumière éclairément 12 h/24 h,  $60 \mu\text{Einst cm}^{-2}\text{.sec}^{-1}$  P.A.R. ; tubes Philips TLS 40 W 33).

Il comprend :

- des limbes de feuilles prélevés sur des plantes multipliées *in vitro*. Celles-ci appartiennent à deux espèces sauvages : *M. acuminata* COLLA (AA) et *M. balbisiana* COLLA (BB) et à trois cultivars différents : cv. Cavendish (AAA), cv. French Plantain (AAB) et cv. Bluggoe (ABB). Elles sont placées soit à la lumière soit à l'obscurité totale pendant trois semaines avant l'isolement.

- des cals de cv. Cavendish (AAA), cultivés à la lumière ou à l'obscurité, sur un milieu LSb contenant soit du 2,4,5 T (acide 2,4,5-trichlorophénoxyacétique) pour ceux à aspect granuleux issus de gaines foliaires de plantes cultivées *in vitro*, soit de l'AIA (acide indole acétique) et de la BAP (benzylaminopurine) pour ceux nodulaires, originaires de tissus inflorescentiels.

#### TECHNIQUE D'ISOLEMENT DE PROTOPLASTES

Le matériel est hâché finement et placé dans une solution enzymatique composée de la solution saline de CPW (FREARSON et al., 1973) à laquelle on ajoute 0,7 M de mannitol, 2,5 p. 100 (poids/volume) de cellulase R-10 («ONOZUKA» YAKULT, Pharma. Indus., Japon), 0,2 p. 100 d'hémicellulase (SIGMA, Chemical Company, USA), 0,3 p. 100 de pectolyase Y<sub>23</sub> (SEISHIN, Pharmaceutical Company, Japon) et 0,6 p. 100 de macérozyme (YAKULT, Pharma. Indus., Japon). Le pH est ajusté à 5,6 avec KOH.

La suspension est placée en agitation lente (80 rp/mn) à l'obscurité à  $27^{\circ}\text{C}$  pendant 9 heures. Après l'incubation, la suspension est filtrée (maille 83  $\mu$ ) et diluée au 4/5ème avec une solution saline de KMC (HARMS et POTRYKUS, 1978). Elle est ensuite centrifugée à 100 g pendant 5 minutes. Le culot est récupéré dans la solution KMC. L'observation est faite en boîte de Pétri ou dans une cellule de Nageotte.

#### RESULTATS ET DISCUSSION

Tous les essais d'isolement de protoplastes à partir de limbes, n'ont jamais donné de protoplastes isolés mais seulement une suspension de cellules, de formes variées, à cytoplasme rétracté sous l'effet de la forte pression osmotique exercée par le mannitol. Ce résultat est obtenu quels que soient l'espèce ou le cultivar employé, le conditionnement des plantes avant le prélèvement des feuilles (lumière ou obscurité) (figure 1).

Un résultat semblable est trouvé si l'on utilise des cals d'origine foliaire, qu'ils aient été ou non placés à la lumière avant le prélèvement (figure 2).

Par contre, si l'on fait un isolement à partir de cals nodulaires d'origine inflorescentielle, on ne récupère, après rinçage, que des protoplastes parfaitement sphériques dépourvus de coque cellulosique. Ceux-ci, de diamètre très variable, présentent tous un cytoplasme très dense (figure 3 a et b).

Ces résultats conduisent aux conclusions suivantes :

- Les enzymes pectinasiques (macérozyme, pectolyase) agissent dans nos conditions d'expériences avec tout le matériel végétal employé, cela quelle que soit son origine. Leur efficacité est par ailleurs confirmée puisque l'on peut obtenir des suspensions cellulaires avec tous ces tissus si on les applique seules (sans cellulases, ni hémicellulases) dans les mêmes conditions.

- Par contre, selon la nature du matériel utilisé, la digestion des parois cellulosiques par les cellulases et hémicellulases est possible ou non ; ces substances sont totalement inf-

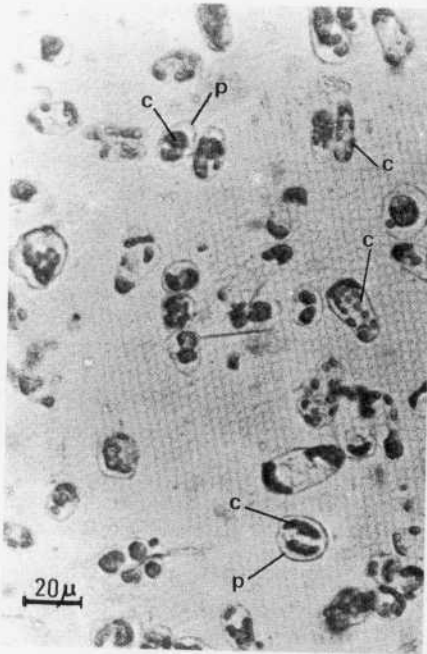


Figure 1 - Cellules isolées de limbes.  
p : paroi cellulosique ; c : chloroplastes

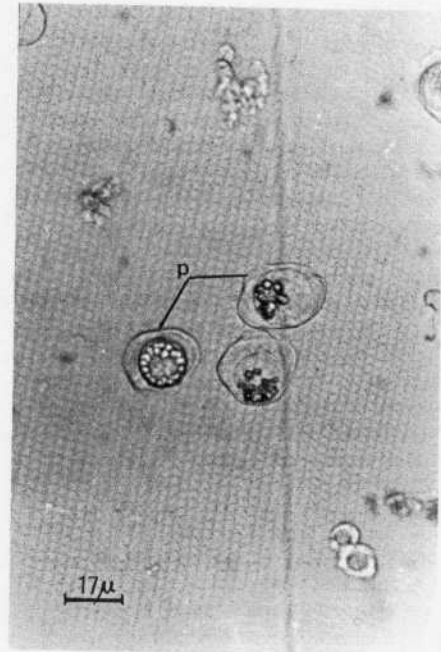


Figure 2 - Cellules de cals foliaires  
p : paroi cellulosique.

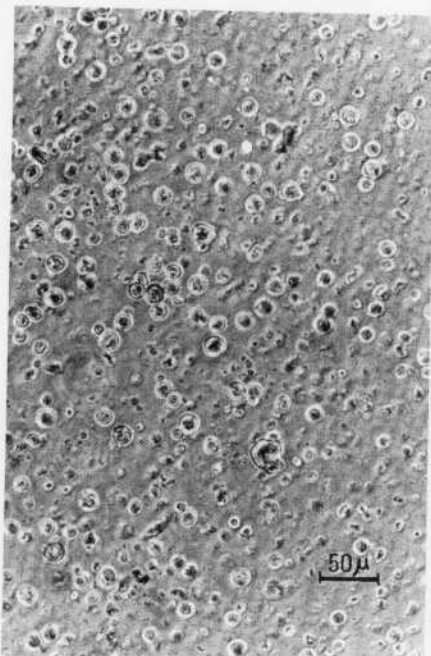


Figure 3 b - Protoplastes de cals inflorescentiels

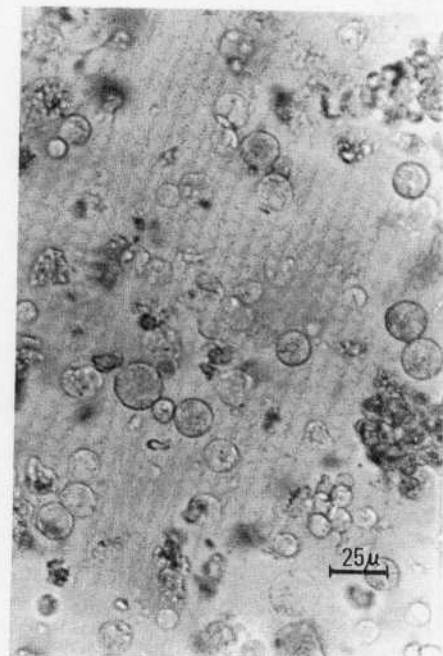


Figure 3 a - Protoplastes de cals inflorescentiels.  
(vue de détails).

ficaces sur les parois de nature foliaire (cellules de limbe et de cal) et à l'inverse, parfaitement efficaces avec les cellules de cal noduleux d'origine inflorescentielle.

- Il s'agit d'une réponse qualitative à l'action des enzymes cellulases. En effet, pour une quantité donnée de pectinases, quelles que soient les concentrations en cellulases et hémicellulases testées (supérieures à celles indiquées), on obtient le même résultat négatif pour les cellules de limbes et de cal d'origine foliaire.

D'autres enzymes à activité cellulosique (cellulysin, drisérase), utilisés dans un large éventail de concentrations (0,1 à 5 p. 100 poids/volume), aboutissent au même résultat.

Par ailleurs, il semble que ce soit la nature du matériel végétal et moins son préconditionnement (lumière ou obscurité) qui ait une importance pour que l'action des cellulases et hémicellulases soit efficace. Dans cet esprit, et pour vérifier que les tissus inflorescentiels étaient bien en cause, nous avons tenté d'isoler des protoplastes à partir de bractées et tépales de fleurs de cv. Cavendish. Malheureusement, cette opération a été empêchée par la présence d'une sève abondante et de son durcissement très rapide à l'air qui ont entraîné une nécrose complète du matériel.

- Enfin, la réponse ne paraît pas être la caractéristique d'un clone particulier ; tous les tests d'isolement de protoplastes réalisés à partir de cellules de limbes ont donné le même résultat négatif, qu'il s'agisse d'espèces diploïdes ou de cultivars triploïdes.

En conclusion, nous avons mis en évidence des qualités différentes de notre matériel végétal chez le bananier (*Musa* spp.) en ce qui concerne la possibilité de digestion des parois celluloseuses par les cellulases et hémicellulases. Nous ne savons pas si ces différences de réponses sont dues à des modifications de la paroi elle-même ou plutôt à une

inhibition de l'enzyme par un composé élaboré par les cellules lorsque celles-ci se trouvent dans un état de différenciation donné.

Il est à noter à ce niveau que les limbes, ainsi que les cal d'origine foliaire, noircissent rapidement et meurent lorsqu'ils sont sur un milieu contenant de la BAP (à 1 mg/l environ) alors que les cal d'origine inflorescentielle sur le même milieu, croissent normalement, sans montrer de signes de nécrose.

Les résultats que nous avons obtenus sont l'aboutissement de travaux entrepris pour trouver une méthode d'isolement de protoplastes, fiable. Malgré les obstacles rencontrés (difficulté de dégradation des parois celluloseuses) il est enfin possible d'isoler pour la première fois, en quantité suffisante et de façon répétitive, des protoplastes de bananier.

Ceux-ci, issus de cal noduleux d'origine inflorescentielle, en pleine croissance, ont un cytoplasme très dense ; ils pourraient présenter de bonnes aptitudes à se diviser ultérieurement.

Enfin, ces travaux qui mettent l'accent sur la qualité du tissu à utiliser chez le bananier, montrent une nouvelle fois l'importance du choix du matériel végétal pour réussir un isolement de protoplastes. Pour arriver à un tel résultat, d'autres chercheurs, sur des espèces ligneuses, ont fait apparaître aussi l'importance du mode de culture (*in vitro* ou *in vivo*) et du stade de développement des plantes (SMITH et Mc COWN, 1982-1983).

#### REMERCIEMENTS

Nous adressons nos remerciements à l'IRFA qui nous a donné les moyens de réaliser ce travail, ainsi qu'à Mme L. ROSSIGNOL et M. Y. DEMARLY, pour leur encadrement scientifique.

#### BIBLIOGRAPHIE

- CHAMPION (J.). 1984.  
La recherche scientifique et l'amélioration des productions bananières.  
*Fruits*, vol. 39 (1), 28-32.
- CHIN YI LU. 1981.  
Isolation and culture of protoplasts of *Panicum maximum* JACQ. (Guinea grass) : Somatic embryogenesis and plantlet formation.  
*Z. Pflanzenphysiol. Bd.*, 104 (8), 311-318.
- DAVEY (M.R.). 1983.  
Recent developments in the culture and regeneration of plants protoplasts.  
in : *Protoplasts 1983. 6th International Protoplasts Symposium*. Basel, August 12-16, 19-29.
- FREARSON (E.M.), POWER (J.B.) and COKING (E.C.). 1973.  
*Dev. Biol.*, 33, 130.
- HARMS (C.T.) and POTRYKUS (J.). 1978.  
Fractionation of plant protoplasts types by iso-osmotic density gradient centrifugation.  
*Theor. Appl. Genet.*, 53, 57-63.
- LARKIN (P.J.) and SCOWCROFT (W.R.). 1981.  
Somaclonal variation. A novel source of variability from cell cultures for plant improvement.  
*Theor. Appl. Genet.*, 60, 197-214.
- LINSMAIER (E.M.) and SKOOG (F.). 1965.  
Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures.  
*Physiologia Plantarum*, 18, 100-127.
- MEINS (F.) Jr. 1983.  
Heritable variation in plant cell culture.  
*Am. Rev. Plant. physiol.*, 34, 327-346.
- ORTON (T.J.). 1983.  
Experimental approaches to the study of somaclonal variation.  
*Plant Molecular Biology Reporter*, vol. 1-2, 67-76.
- SCOWCROFT (W.R.) et LARKIN (P.J.). 1982.  
Somaclonal variation : a new option for plant improvement.  
in : *Plant improvement and somatic cell genetics*.  
Eds. Vasil K., Scowcroft W.R. and Frey K.J., Academic Press.
- SHEPARD (J.F.), BIBNEY (D.), BARSBY (T.) and KEMBLE (R.). 1983.  
Genetic transfer in plant through interspecific protoplast fusion.  
*Science*, 219, 638-688.
- SMITH (M.A.L.) and Mc COWN (B.H.). 1982-1983.  
A comparison of source tissue for protoplast isolation from the woody plant species.  
*Plant Science Letters*, 281, 149-156.
- VASIL (V.) and VASIL (J.K.). 1980.  
Isolation and culture of cereals protoplasts.  
*Theor. Appl. Genet.*, 56, 97-99.