

Obtention de laitues résistantes au chlorsulfuron par régénération de protoplastes irradiés aux UV

Marie Christine Chupeau¹, Yannick Bellec¹, Brigitte Maisonneuve², Yves Chupeau¹

Résumé. L'adaptation, à la laitue, de la mutagenèse par exposition aux UV de protoplastes a permis de sélectionner des colonies cellulaires résistantes au chlorsulfuron, puis de régénérer des plantes résistantes. L'analyse génétique des plantes a montré que les trois mutants régénérés possèdent la même mutation.

Mots clés : mutagenèse, protoplaste, laitue, culture *in vitro*, résistance au désherbant

Introduction

Les techniques de la biologie cellulaire, et notamment la fusion de protoplastes, permettent d'étendre les possibilités de croisements interspécifiques aux espèces qui se révèlent impossibles à croiser sexuellement (Chupeau et al., 1994).

Ces techniques de biologie cellulaire reposent très largement sur l'utilisation de marqueurs de sélection, tels les résistances aux antibiotiques obtenues par transfert de gènes (Chupeau et al., 1989). Cependant, le recours au transfert de gènes ainsi que les résistances aux antibiotiques sont assez largement contestés, ce qui a limité l'utilisation de la biologie cellulaire en amélioration des plantes tout spécialement à l'Inra.

Nous avons cherché à obtenir un marqueur de sélection par mutagenèse, technique dont l'utilisation en amélioration des plantes est désormais traditionnelle. Nous avons opté pour une mutation de l'acétolactase synthase, mutation bien connue sur de nombreuses plantes, qui confère la résistance aux sulfonylurées (Schloss et al., 1988).

1. Description du matériel et des méthodes

1.1. Le matériel végétal : obtention des protoplastes

Des plantes de laitue, cv Ardente, sont cultivées en salle climatisée en atmosphère humide (70% HR) et en jours courts : 8 h d'éclairage sous une intensité lumineuse faible ($70 \mu\text{E/s/m}^2$) fourni par des tubes fluorescents et des températures de 25° C jour et 17° C nuit. Dans ces conditions, les plantes sont étioilées (**Figure 1**) ce qui est propice à la préparation ménagée de protoplastes de feuilles.

Figure 1. Aspect étioilé des laitues cultivées en jours courts et faible intensité lumineuse.



¹ INRA, UMR1318 IJPB, Institut Jean Pierre Bourgin, F-78026 Versailles, France ✉ marie-christine.chupeau@versailles.inra.fr

² INRA, UR1052 GAFL, Génétique et Amélioration des Fruits et Légumes, F-84143 Montfavet, France

Les feuilles sont désinfectées par une solution d'isothiocyanate de chlore (Bayrochlor) obtenue par solubilisation d'une pastille dans 800 mL d'eau purifiée par osmose inverse additionnée d'un mouillant, le teepol, à 0,2%. Après trois rinçages par de l'eau stérile les feuilles sont dilacérées dans la solution GSG (Chupeau et al., 1989) de pression osmotique adaptée (glucose 2% + sorbitol 4,5% + glycine 1,5%) qui comporte également les macro-éléments de Gamborg dilués par 10 ainsi que du MES 3,5 mM. Les enzymes cellulolytiques sont ajoutées ensuite en mélange aux concentrations finales de : Macerozyme 0,02 % + cellulase Onozuka 0,1% + Driselase 0,05%. La pression osmotique finale du milieu de macération mesurée est de 580 mOsm.

De l'ordre de 1 g de feuilles sont dilacérées dans 10 mL de cette solution de « macération » pour un rendement optimal en protoplastes.

Les protoplastes de mésophylle sont obtenus après incubation dans ce mélange à 22° C pendant 16 h, donc pendant la nuit.

Les protoplastes sont purifiés par filtration sur des tamis stériles de maille de 140 µm, afin d'éliminer les débris de feuille non totalement digérés. Le filtrat de deux ou trois boîtes de macération est recueilli dans des tubes stériles de 30 mL. Les protoplastes en suspension sont lavés par trois centrifugations successives (70 g, 6 min) dans un milieu salin (KCl 2,5% + CaCl₂ 0,2% + MES 3,5 mM, pH 5,5).

L'avant-dernier culot de protoplastes repris par un volume donné (maximum 5 mL) permet de compter le nombre de protoplastes viables obtenus, de façon à pouvoir ajuster le volume de reprise par le milieu de culture après la troisième centrifugation afin de fixer leur concentration selon l'utilisation projetée.

1.2. Traitement mutagène

Sous une hotte à flux laminaire, dans une salle obscure, les protoplastes en culture ($5 \cdot 10^4$ /mL) dans 10 mL de milieu de culture en boîte de Petri (ϕ 9 cm) sont irradiés, couvercles retirés (Bourgin, 1978), par des rayons UV produits par des tubes Sylvania G30W à environ 750 ergs ($0,86 \text{ mW/cm}^2$ pendant 9 s).

Les boîtes de culture irradiées, comme les boîtes témoins, sont immédiatement placées dans une boîte opaque placée dans un placard à l'obscurité dans une salle de culture à 25° C et 70% HR.

1.3. Culture et dilutions

Le milieu de culture que nous avons élaboré pour les protoplastes de laitue est constitué des éléments suivants :

Composés	mg/L
Macro-éléments B	
KCl	750
CaCl ₂ , 2H ₂ O	740
MgSO ₄ , 7H ₂ O	185
KH ₂ PO ₄	20
Micro-éléments de Heller (1953) complémentés par	
MnCl ₂ , 4H ₂ O	200

Vitamines de Morel et Wetmore (1951)

Mannitol	80 000
Saccharose	20 000
Pourpre de bromocrésol	8
Acide 2N morpholinoéthanesulfonic	700

Après autoclavage à 115° C pendant 20 min, sont ajoutés stérilement :

Fer citrate ammoniacal (1%)	50
NH ₄ NO ₃	80
Acide naphtylacétique	1
Acide 2,4-Dichlorophénoxyacétique	0,5
Benzyladénine	1

Après une semaine à l'obscurité, les cultures sont diluées par 5 (2 mL de suspension de colonies cellulaires dans 8 mL du milieu de dilution).

Ce milieu de dilution comporte les éléments suivants :

Composés	mg/ L
Macro-éléments B, comme pour les protoplastes, additionné de NH ₄ NO ₃	80
Micro-éléments 1-3 (adaptés pour la laitue) :	
KI	0,8
H ₃ BO ₃	3
MnCl ₂ , 4H ₂ O	30
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	12
Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O	0,9
CuSO ₄ , 5H ₂ O	0,09
CoCl ₂ , 6H ₂ O	0,09
Mannitol	80 000
Saccharose	20 000
Pourpre de bromocrésol	8
Acide 2N morpholinoéthanesulfonic	700

Complémenté stérilement après autoclavage par :

Fer citrate ammoniacal (1%)	50
Acide naphtylacétique	0,1
Benzyladénine	0,3

Les cultures diluées sont placées à la lumière, en jours longs de 16 h (60 µE/s/m²) à 25° C. Après une dizaine de jours de culture à la lumière, les cultures sont diluées à nouveau dans le même milieu (3 mL de suspension dans 7 mL de milieu).

1.4. Sélection des mutants

Les différentes étapes de la sélection de mutants sont illustrées par la **Figure 2**. La sélection est effectuée une dizaine de jours après la seconde dilution, par ajout de 200 nM de chlorsulfuron : DPX 4189 = 1-(2-Chlorophenylsulfonyl)-3-(4-methoxy-6-méthyl-1,3,5-triazin-2-yl)urea, gracieusement fourni par Dupont de Nemours.

Ces boîtes de Petri sont scellées avec du Parafilm et remises à la lumière dans la salle de culture.

Après quelques semaines de culture sur milieu sélectif, les colonies résistantes (**Figure 2B**), qui poursuivent leur développement et qui apparaissent bien vertes, sont transplantées une à une à la pince sur un milieu de régénération que nous avons adapté aux colonies cellulaires de laitue.

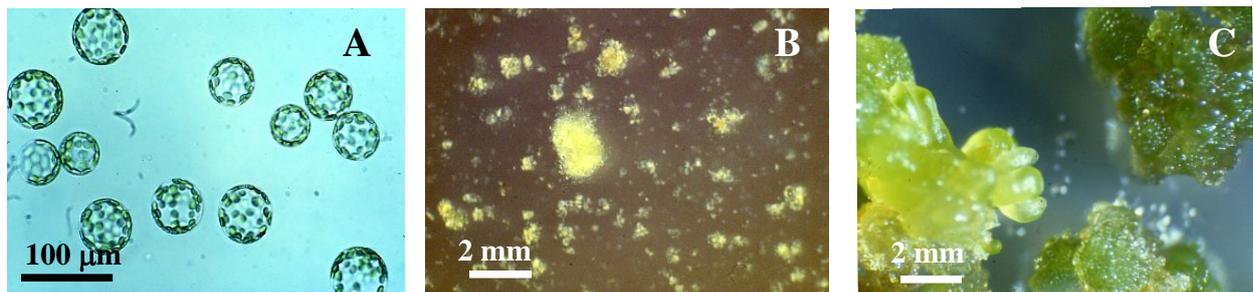


Figure 2. *Processus de sélection*

- A- *Protoplastes de laitue cv Ardente le jour de la mise en culture après irradiation aux UV.*
- B- *Colonie cellulaire résistante après 2 mois de sélection par 200 nM de DPX en milieu liquide.*
- C- *Aspect d'un bourgeon sur le milieu de régénération.*

Ce milieu de régénération est proche de celui utilisé pour les *Nicotiana* (R4M6, Bourgin et al., 1979) mais avec les micro-éléments 1-3, comme ci-dessus, à la place de ceux de Heller, et additionné de 100 mg/L d'adénosine. Il comporte également 50 nM de DPX 4189, afin de poursuivre la sélection.

Les bourgeons formés sur les colonies sélectionnées (**Figure 2C**) sont ensuite repiqués en tube sur le milieu de bouturage pour enracinement (Bourgin et al., 1979).

Les plantules racinées sont ensuite acclimatées en salle climatisée.

1.5. Analyse des descendance

Trois mutants indépendants régénérés (nommés ADPX, CDPX, DDPX) ont été hybridés manuellement avec une laitue beurre (cv Girelle ou cv Jessy). Des plantes hybrides résistantes ont été autofécondées jusqu'à l'obtention de lignées homozygotes pour la résistance au chlorsulfuron : F₆ (ADPX x Girelle), F₄ (CDPX x Jessy) et F₄ (DDPX x Jessy). Diverses familles F₃, récoltées sur des plantes F₂ hétérozygotes, ont été testées pour leur résistance au DPX 4189 afin de contrôler le déterminisme génétique des mutations.

Des croisements entre les lignées homozygotes F₅ (ADPX x Girelle) notée A, F₃ (CDPX x Jessy) notée C et F₃ (DDPX x Jessy) notée D, issues des trois mutants, ont été réalisés en serre insect-proof en vue d'une étude d'allélisme entre les trois mutants. Les plantes des trois F₁ ont été récoltées et les descendance F₂, codées F₂ (A x C), F₂ (A x D) et F₂ (D x C), ont été analysées pour leur résistance au chlorsulfuron.

Les tests de résistance sont réalisés en boîtes de Petri sur milieu gélosé additionné, après autoclavage, de 50 nM de DPX 4189. Les plantules sont observées 2 à 3 semaines après semis en chambre climatisée à 20° C / 16° C, 16 h d'éclairage.

2. Résultats et interprétation

2.1. Sélection de résistants au chlorsulfuron

Dans nos conditions, la macération de 1 g de feuille fournit de l'ordre de 2 à $2,5 \cdot 10^6$ protoplastes. Dans ce schéma de sélection, le traitement mutagène est effectué sur quatre boîtes de culture soit $2 \cdot 10^6$ protoplastes au total. Ce traitement aux UV est assez modéré (750 ergs) pour ne pas provoquer une trop forte mortalité immédiate, ce qui entraînerait de fortes chutes de rendement en colonies cellulaires. Dans ces conditions, de l'ordre de 10% des protoplastes initialement mis en culture et irradiés conduisent à la formation de colonies cellulaires. On peut donc considérer que ce sont $2 \cdot 10^5$ colonies dérivées de protoplastes qui sont soumises à la sélection par le DPX après la deuxième dilution des cultures.

Ce processus a permis d'obtenir quatre colonies cellulaires (A, B, C, D) considérées comme résistantes au chlorsulfuron, car bien développées et vertes après trois mois de sélection en milieu liquide. Toutes ces colonies ont régénéré des bourgeons qui ont conduit à des plantes acclimatées en salle climatisée.

Ce processus de mutagenèse appliqué aux protoplastes de laitue se révèle donc aussi efficace que pour les protoplastes de tabac (Bourgin, 1978) puisque la fréquence constatée de $2 \cdot 10^{-5}$ est parfaitement utilisable.

2.2. Analyse des descendance

Les mutations obtenues dans trois colonies (A, C, D) ont été transférées sans difficulté dans les variétés de laitue Girelle ou Jessy où elles s'expriment parfaitement (**Figure 3 et Tableau 1**) chez les lignées F₆ (ADPX5-2 x Girelle), F₄ (CDPX1a x Jessy) et F₄ (DDPX1a x Jessy).

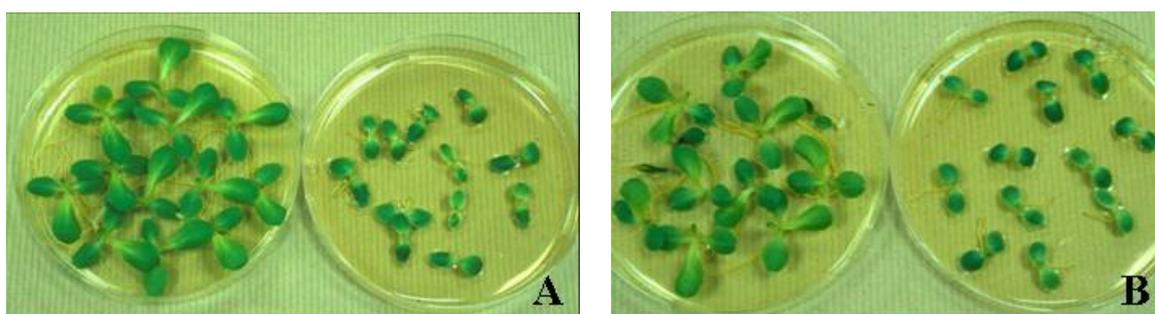


Figure 3. Test de résistance de descendance.

Plantules 11 jours après semis sur milieu gélosé avec 50nM de DPX 4189. Les méristèmes des plantes sensibles sont bloqués : racines courtes et non ramifiées, pas de feuilles vraies

A- F₆ (ADPX5-2 x Girelle), à gauche ; témoin sensible, Girelle, à droite

B- F₄ (CDPX1a x Jessy), à gauche ; témoin sensible, Jessy, à droite.

Les ségrégations de résistance obtenues sur des F₃ (ADPX5-2 x Girelle), (CDPX1a x Jessy) et (DDPX1a x Jessy) sont conformes à l'hypothèse de un gène dominant : 75% de plantes résistantes (**Tableau 1**).

Dans les tests de résistance des F₂ (A x C), (A x D) et (D x C), réalisés entre les descendance fixées des trois colonies, nous n'obtenons que des plantes résistantes au DPX 4189 sur plus de 100 plantules germées sur un milieu contenant 50 nM de l'agent sélectif (**Tableau 1**). Les trois mutations sont donc au même locus.

Tableau 1. Test de descendance de trois mutants (A, C, D).
Résistance au DPX 4189 chez des F₃ en ségrégation, des F₂ entre mutants ainsi que les génotypes parentaux

Matériel végétal	Germination sur 50nM de DPX		Ségrégation		
	Nb de plantes		testée ⁽²⁾	khi ²	P (%)
	résistantes	sensibles			
Ardente	0	10			
Girelle	0	12			
Jessy	0	12			
Lignées fixées descendant de chaque mutant					
F ₆ (ADPX5-2 x Girelle)	48	0			
F ₄ (CDPX1a x Jessy)	45	0			
F ₄ (DDPX1a x Jessy)	46	0			
Familles F ₃ en ségrégation (cumul de 4 ou 10 descendance pour chaque mutant)					
F ₃ (ADPX5-2 x Girelle)1-x	103	46	3 : 1	2,7	9,78
F ₃ (CDPX1a x Jessy)1-x	44	17	3 : 1	0,3	60,48
F ₃ (DDPX1a x Jessy)1-x	63	30	3 : 1	2,6	10,60
Test d'allélisme entre mutations ⁽¹⁾					
F ₂ (A x C)	138	0	15 : 1	9,2	0,24
F ₂ (A x D)	140	0	15 : 1	9,3	0,22
F ₂ (D x C)	114	0	15 : 1	9,6	0,58

(1) A = F₅ (ADPX5-2 x Girelle), C = F₃ (CDPX1a x Jessy), D = F₃ (DDPX1a x Jessy)

(2) Ségrégation testée correspondant à un gène dominant pour les F₃ et 2 gènes dominants indépendants pour les F₂ inter-mutants

Conclusion et perspectives

Cette méthode de mutagenèse est donc efficace sur laitue pour cribler des mutants sélectionnables *in vitro*. Elle ne nécessite pas de manipulation d'agent chimique mutagène, donc toxique, et est facile à mettre en œuvre puisqu'il suffit d'utiliser les tubes UV montés dans les hottes de culture *in vitro* pour la stérilisation de l'enceinte. Elle est très efficace si on dispose d'un bon test *in vitro* puisque toutes les plantes régénérées sont des mutants utilisables comme marqueurs.

Il serait ainsi envisageable, avec des marqueurs non dangereux pour l'environnement, de créer des lignées utilisables pour produire des hybrides interspécifiques par fusion de protoplastes. Cela offrirait la possibilité de tenter de transférer des gènes d'espèces du pool tertiaire vers la laitue, comme la résistance au TSWV de *L. perennis*, sans utilisation de transgènes comme la résistance à la kanamycine (Maisonneuve *et al*, 1995).

Cette technique adaptée d'une Solanacée à une Astéracée pourrait être étendue à d'autres espèces pour lesquelles la technique de production de protoplastes est maîtrisée.

Remerciements

Les auteurs remercient Eric Martin pour son assistance technique dans la production des autofécondations en serre.

Références bibliographiques

Bourgin JP (1978) Valine resistant plants from *in vitro* selected tobacco Cells. *Mol Gen Genet* **161**, 225-230.

Bourgin JP, Chupeau Y, Missonnier C (1979) Plant regeneration from mesophyll, protoplasts of different *Nicotiana* species. *Physiol Plant* **45**, 288-292.

Chupeau MC, Bellini C, Guerche P, Maisonneuve B, Vastra G, Chupeau Y (1989) Transgenic plants of lettuce (*Lactuca sativa*) obtained through electroporation of protoplasts. *Bio/Technol* **7**, 503-507.

Chupeau MC, Maisonneuve B, Bellec Y, Chupeau Y (1994) A *lactuca* universal hybridizer and its use in creation of fertile interspecific somatic hybrids. *Mol Gen Genet* **245**, 139-145.

Heller R (1953) Recherches sur la nutrition des tissus végétaux cultivés *in vitro*. *Ann Sci Nat Bot Biol Vég* **14**, 1-223.

Maisonneuve B, Chupeau MC, Bellec Y, Chupeau Y (1995) Sexual and somatic hybridization in the genus *Lactuca*. *Euphytica* **85**, 281-285.

Morel G, Wetmore RH (1951) Fern callus culture. *Am J Bot* **38**, 141-143.

Schloss JV, Ciskanik LM, Van Dyk DE (1988) Origin of the herbicide binding site of acetolactate synthase. *Nature* **331**, 360-362.