

## **Solution d'obtention de protoplastes**

Réf. PROT1.

### **COMPOSITION :**

- Sachet OP1 (conserver à -20°C) :  
0.5g de Cellulase  
0.5g d' Hemicellulase  
0.1g de pectinase
- Sachet OP2 (conserver à température ambiante) : 10g de Mannitol
- Sachet OP3 (conserver à température ambiante) : 1.39g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$
- Sachet OP4 (conserver à température ambiante) : 1.34g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$

### **MATERIEL NECESSAIRE :**

Feuille de poireau bien verte, lame en verre, lamelles.

### **PROTOPLASTES :**

Les protoplastes sont des cellules végétales sans paroi, gorgées de chloroplastes, que l'on obtient par digestion de la paroi pectocellulosique.

Pour ce faire, deux types d'enzymes sont nécessaires :

- Pectinase (hydrolyse de la pectine)
- Cellulase (hydrolyse de la cellulose)

Le tampon phosphate permet d'établir une solution de pH=6 afin de stimuler l'activité des enzymes tout en préservant l'intégrité des cellules.

Le Mannitol est utilisé à forte concentration (milieu hypertonique) afin de plasmolyser de manière irréversible les cellules : le Mannitol ne rentre pas dans les cellules, cela permet d'éviter l'éclatement par entrée d'eau en absence de paroi.

### **PREPARATION DE LA SOLUTION :**

Ajouter 50ml d'eau déminéralisée au contenu du sachet OP3 → **Solution A**

Ajouter 25ml d'eau déminéralisée au contenu du sachet OP4 → **Solution B**

Dans 90ml d'eau déminéralisée, ajouter le contenu des sachets OP1 et OP2 puis compléter avec 8.8ml de la **solution A** et 1.2ml de la **solution B**.

Vous obtenez 100ml de solution prête à l'emploi. Celle-ci se conserve bien au congélateur.

**NB :** Pour obtenir une grande quantité de protoplastes, il est possible de concentrer 2 fois la solution en enzymes :

- 45ml d'eau déminéralisée
- + 4.4ml de la **solution A**
- + 0.6ml de la **solution B**
- + La moitié du sachet OP2
- + Sachet OP1

**MANIPULATION :**

Verser la solution dans des boîtes de pétri (DIAMETRE 55mm) jusqu'à obtenir 2mm d'épaisseur.

Découper des fragments de feuille de poireau bien verte de  $1\text{cm}^2$ , enlever l'épiderme (coté terne...) à l'aide d'une petite pince pointue puis déposer les fragments immédiatement coté épiderme enlevé sur le mélange enzymatique. Continuer jusqu'à recouvrir entièrement la surface.

Incuber 1h30 à 37°C ou 3h00 à 25°C. Après incubation, il est possible de conserver la boîte avec les fragments de feuille, le lendemain matin la quantité de protoplastes est très importante.

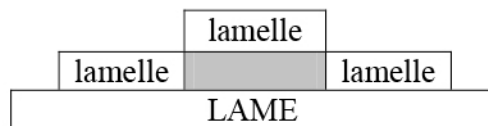
**OBSERVATION :**

Il est nécessaire afin de conserver l'intégrité des protoplastes de fabriquer une chambre d'incubation composée de une lame en verre et trois lamelles :

1) Sur une lame en verre, disposer deux lamelles de la façon suivante : lamelle



2) Déposer une goutte de la solution d'incubation entre les deux lamelles puis recouvrir d'une autre lamelle sans effectuer de pression :



3) Observer au grossissement X400.

**Note :** L'épaisseur des lamelles par rapport à la lame n'est pas proportionnelle...