

Application de la technique des anticorps fluorescents à l'étude de la colonisation du système racinaire de *Trifolium alpinum* par une souche de *Rhizobium trifolii*

Mamadou GUEYE*

Mots-clés : Anticorps fluorescents — Écologie microbienne — *Rhizobium*.

Key words : Fluorescent antibodies — Microbial ecology — *Rhizobium*.

1. Introduction

L'écologie microbienne se préoccupe entre autres, d'identifier, de dénombrer et d'étudier la répartition des microorganismes dans un système donné. La technique de marquage de ces microorganismes par anticorps fluorescents est l'une des meilleures approches dont nous disposons pour résoudre de tels problèmes (SCHMIDT, 1973). Nous avons appliqué cette technique à l'étude de la colonisation d'un système racinaire, celui de *Trifolium alpinum*, légumineuse dotée de racines pivotantes très longues, caractéristique des sols alpins situés entre 1 600 et 2 500 m d'altitude.

2. Matériel et méthodes

2.1. SOUCHE DE *Rhizobium* ET ANTICORPS

La souche de *Rhizobium trifolii* utilisée, dénommée Alpl a été isolée par A. MOIROUD au laboratoire d'écologie microbienne de l'université Lyon 1. Nous avons préparé l'anticorps correspondant à partir d'une culture pure de *R. trifolium* Alpl en phase exponentielle. Nous avons marqué l'anticorps à l'isothiocyanate de fluorescéine selon la méthode de Cherry (GOLDMAN, 1968).

Un test de spécificité a montré que l'anticorps obtenu, dont le rapport molaire de conjugaison est de 10,63 et le titre de 1/2 560, ne présente pas de

réactions croisées avec : *Rhizobium trifolii* Alp2, *Rhizobium trifolii* Alp 13, *Rhizobium japonicum* USDA 135, *Rhizobium meliloti* Luz 1, *Rhizobium meliloti* Luz 2, 21 souches de bactéries non identifiées isolées des sols de Lyon et Montpellier, et 9 souches d'actinomycètes non identifiées isolées de la pelouse alpine.

2.2. GERMINATION ET INOCULATION DES GRAINES

Les graines ont été stérilisées par trempage dans H₂SO₄ concentré pendant 10 mn. Elles ont ensuite été mises à germer en 2 jours à 28 °C sur papier filtre imbibé du milieu nutritif qui renferme par litre : K₂SO₄ : 280 mg; MgSO₄, 7H₂O : 500 mg; KH₂PO₄ : 23 mg; K₂HPO₄, 3H₂O : 190 mg; CaSO₄ : 82 mg; CaCl₂ : 555 mg; EDTA : 6 mg; solution d'oligo-éléments : 3 ml; FeCl₃ 4 ‰ : 2 gouttes. Nous avons ensuite inoculé les plantules en les trempant plusieurs heures dans une suspension placée dans des boîtes de pétri.

2.3. CULTURE DES PLANTES DE *Trifolium alpinum*

Nous avons utilisé un dispositif voisin de celui décrit par PORTER (1966) consistant en sacs en plastique (180 × 90 mm) appelés pouches renfermant des papiers filtres (150 × 75 mm). Nous avons stérilisé ces sacs à l'oxyde de propylène, puis avons mis dans chacun d'eux 10 ml de milieu nutritif stérile. Enfin nous avons placé à la partie supérieure du sac une plantule déjà inoculée.

* Laboratoire d'Écologie Microbienne, Université Claude Bernard, Lyon 1, 69621 Villeurbanne, France.
Adresse actuelle : Laboratoire de microbiologie des sols, O.R.S.T.O.M., B.P. 1386 Dakar, Sénégal.

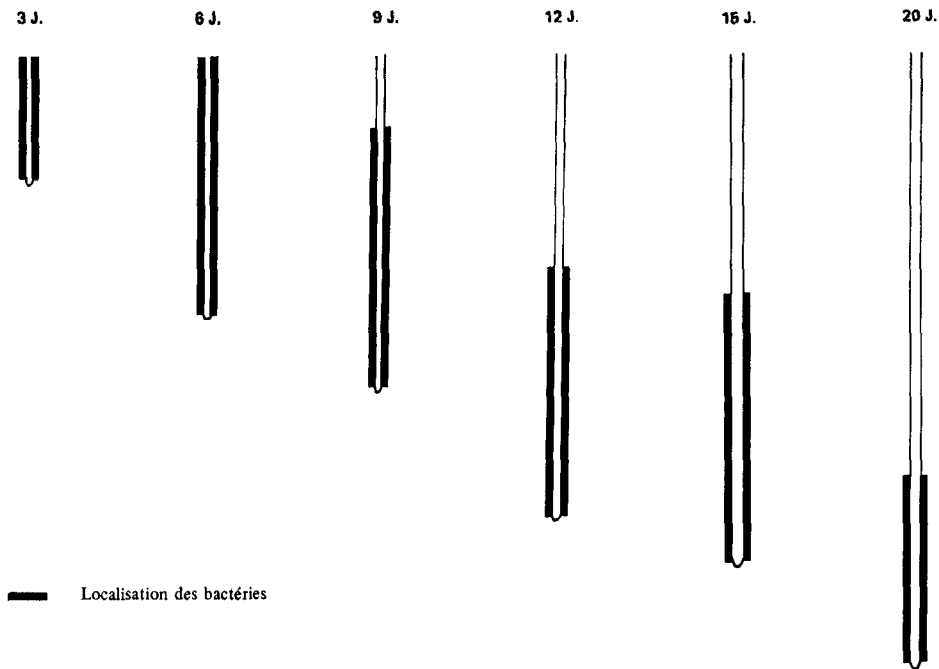


Fig. 1. — Colonisation du système racinaire de *Trifolium alpinum* par *Rhizobium trifolii* Alp 1.

2.4. PRÉPARATIONS MICROSCOPIQUES

Une expérience préliminaire ayant montré que l'adsorption des cellules de *R. trifolii* Alp1 sur les racines demandait au moins 6 h, nous avons effectué les premiers prélèvements 6 h après le trempage, et les suivants tous les trois jours. Nous avons ensuite découpé les racines en segments de 1 cm placés entre deux lames pendant 3 jours à 4 °C jusqu'à ce qu'ils sèchent et adhèrent fortement à la lame. Après nous avons passé les lames à la flamme avant le marquage à l'anticorps fluorescent Alp 1. Pour atténuer l'auto-fluorescence racinaire, qui est très gênante, nous avons employé le violet cristal à 1 mg/ml comme contre-marqueur. Ce colorant donne des résultats meilleurs que la gélatine rhodamine isothiocyanate ou le bleu de méthylène.

3. Résultats et discussion

Les principaux résultats de cette expérience sont les suivants :

— les *Rhizobium trifolii* Alp 1 disparaissent de la partie basale de la racine au fur et à mesure que le système racinaire se développe;

— les *Rhizobium trifolii* Alp 1 sont présents dans la zone des poils absorbants et à proximité de la coiffe mais pas au niveau de la coiffe elle-même

comme l'indique la fig. 1. Ceci est conforme aux observations déjà faites par d'autres auteurs (SAMTSEVICH, 1965; ROVIRA et CAMPBELL, 1974; DAYAN *et al.*, 1977; DIEM *et al.*, 1978);

— contrairement à ce qui est admis souvent, il apparaît que seulement une partie de la racine est colonisée. Ce résultat confirme les observations de ROVIRA (1974) selon lesquels 4 à 10 % de la surface racinaire est occupée par les bactéries;

— l'auto-fluorescence racinaire apparaît au bout de la première semaine et augmente avec l'âge de la plante.

Nous tenons à faire remarquer enfin que l'emploi des pochettes en plastique, associé à la technique des anticorps fluorescents permet d'explorer facilement et rapidement la colonisation des racines par les microorganismes qui leur sont associés. Cependant, l'extrapolation au sol des résultats ainsi obtenus doit se faire avec prudence (SCHMIDT, communication personnelle).

REMERCIEMENTS

Nous remercions vivement M^{lle} A. M. GOUNOT et MM. R. BARDIN et A. MOIROUD du laboratoire d'écologie microbienne de l'université Lyon 1 pour leurs précieux conseils ainsi que tous leurs collaborateurs.

Manuscrit reçu au Service des Éditions le 23 août 1981

BIBLIOGRAPHIE

- BOWEN (G. D.), ROVIRA (A. D.), 1976. — Colonization of plant roots *Ann. Rev. Phytopathol.*, 14 : 121-144.
- CLEYET MAREL (J. C.), 1979. — Apport de l'immunofluorescence à la connaissance de l'écologie de *Rhizobium japonicum* dans le sol et la rhizosphère. *Thèse doctorat 3^e cycle. Université Lyon 1.*
- DIEM (H. G.), SCHMIDT (E. L.), DOMMERGUES (Y. R.), 1978. — The use of the fluorescent antibody technique to study the behaviour of *Beijerinckia* isolate in the rhizosphere and spermosphere of rice. *Ecol. Bull. (Stockholm)*, 26 : 312-318.
- DAYAN (E.), BANIN (A.), HENIS (Y.), 1977. Studies on the mucilaginous layer of Barley (*Hordeum vulgare*) roots. *Plant and Soil*, 47 : 171-191.
- GOLDMAN (M.), 1968. — Fluorescent antibody methods. *Academic Press New York.*
- HAMAD FARES (I.), 1976. — La fixation de l'azote dans la rhizosphère du riz. Réalisation d'un modèle gnotobiotique. *Thèse doctorat ès-sciences naturelles. Université Nancy 1.*
- PORTER (F. E.), NELSON (I. S.), WOLD (E. K.), 1966. — Plastic pouches. *Crops and Soils*, 18 : 10-11.
- ROVIRA (A. D.), NEWMAN (E. I.), BOWEN (H. G.), CAMPBELL (R.), 1974. — Quantitative assessment of the rhizoplane microflora by direct microscopy. *Soil. Biol. Biochem.*, 6 : 211-216.
- ROVIRA (A. D.), 1979. — Biology of soil root interface. In : *The soil root interface. Ed. J. L. HARLEY and R. SCOTT RUSSEL. Academic Press. London. New York. San Francisco.*
- SAMTSEVICH (S. A.), 1965. — Active excretions of plant roots and their significance. *Sov. Plant Physiol.*, 12 : 731-739.
- SCHMIDT (E. L.), 1973. — Fluorescent antibody technique for the study of microbial ecology. *Bull. Ecol. Res. Comm. (Stockholm)*, 17 : 67-76.