



HAL
open science

Application de l'immunofluorescence a la detection de Phoma exigua var. foveata, agent de la gangrene de la pomme de terre

L. Hingand, Sébastien Le Coz, Camille Kerlan, B. Jouan

► **To cite this version:**

L. Hingand, Sébastien Le Coz, Camille Kerlan, B. Jouan. Application de l'immunofluorescence a la detection de Phoma exigua var. foveata, agent de la gangrene de la pomme de terre. Agronomie, 1983, 3 (1), pp.51-56. hal-02728914

HAL Id: hal-02728914

<https://hal.inrae.fr/hal-02728914>

Submitted on 2 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Application de l'immunofluorescence à la détection de *Phoma exigua* var. *foveata*, agent de la gangrène de la pomme de terre

Lucien HINGAND, Sylvie LE COZ, Camille KERLAN & Bernard JOUAN

I.N.R.A., Station de Pathologie végétale, Centre de Recherches de Rennes, F 35650 Le Rheu.

RÉSUMÉ

*Immunologie des champignons,
Diagnostic sérologique.*

Un antisérum a été obtenu à partir des pycniospores de *Phoma exigua* var. *foveata* provenant d'une souche pure cultivée *in vitro* ; son titre, estimé en immunofluorescence, est de 1/4000^e. La technique d'immunofluorescence (I.F.) indirecte de NAIRN (1964) a été utilisée. Le sérum réagit spécifiquement avec la variété *foveata* et seulement avec les spores de cette variété. Il ne révèle ni le mycélium de cette variété, ni la forme voisine, *P. exigua* var. *exigua* ; il permet donc de différencier les deux formes lorsqu'il s'agit de spores. De même, aucune réaction n'a été observée en I.F. avec d'autres espèces appartenant ou non au genre *Phoma* (tabl. 1). La recherche de la variété *foveata*, principal agent responsable de la gangrène de la pomme de terre a été réalisée sur tubercules de façon simultanée par I.F. et par la technique classique d'isolement sur milieu gélosé après blessure des tubercules ; les deux méthodes donnent des résultats très voisins puisque 8 lots sont positifs en I.F. contre 7 par la technique d'isolement. Chaque préparation provenant d'un lot infecté présentait en moyenne 3 à 5 spores par champ du microscope au grossissement 500. L'application de l'I.F. à la détection de ce champignon sur pomme de terre paraît donc envisageable.

SUMMARY

*Immunology of fungi,
Serological diagnosis.*

Use of immunofluorescence for detection of Phoma exigua var. foveata, the cause of potato gangrene.

An antiserum against *Phoma exigua* var. *foveata* was prepared using pycniospores of the fungus produced in pure culture. The indirect fluorescence antibody technique of NAIRN (1964) was used. The serum had an estimated titre of 1/4000, by immunofluorescence, and was specific for the spores of the variety *foveata* ; it could be used to differentiate between the varieties *P. exigua* var. *exigua* and *P. exigua* var. *foveata*, the latter variety being mainly responsible for potato gangrene. No immunofluorescence reaction was noted with other species of *Phoma*.

A comparative study was carried out with the two varieties using immunofluorescence and the classical identification techniques of isolation on agar media after wound inoculation of tubers. A good correlation was obtained between the two identification techniques. Eight samples were positive in I.F. and seven with the isolation technique. Three to five spores were observed in each field of the microscope at magnification 500. Therefore the application of I.F. for the identification of this fungus appears to be useful and feasible.

I. INTRODUCTION

La gangrène de la pomme de terre est une maladie économiquement importante qui est due à un champignon : *Phoma exigua*. Deux variétés de cette espèce, *P. exigua* var. *foveata*, et *P. exigua* var. *exigua* peuvent provoquer des lésions sur tubercules, mais la variété *foveata*, quoique moins fréquente dans la nature, est responsable dans la pratique de la majorité des dégâts (JOUAN *et al.*, 1974).

Pour lutter contre cette maladie, il est utile de mettre en œuvre des techniques fiables et spécifiques de détection de la variété *foveata* sur tubercules ou dans le sol. La méthode habituelle consiste à isoler le champignon sur milieu gélosé nutritif après blessure des tubercules (MALCOMSON &

GRAY, 1968 ; LOGAN & KHAN, 1969 ; ENTWHISTLE, 1970 ; MOOI & TICHELAAR, 1974 ; BANON, 1975 ; MCCracken & LOGAN, 1977 ; HIDE *et al.*, 1977). La variété *foveata* se reconnaît aisément en culture, car elle seule produit un pigment de nature anthraquinonique (BOEREMA, 1967 ; MOSCH, 1974). Cette technique est sensible, mais nécessite des moyens importants ; de plus elle est longue, car les échantillons doivent être impérativement conservés au froid pendant plusieurs semaines avant analyse.

Nous avons essayé de lui substituer une technique immunologique, l'immunofluorescence (I.F.), technique déjà mise en œuvre pour la recherche des microorganismes dans le sol ou la rhizosphère (VAN VUURDE & ELEBAAS, 1978), notamment des bactéries (HILL & GRAY, 1967 ; SCHMIDT *et*

al., 1968 ; ALLAN & KELMAN, 1977 ; VRUGGINK & DE BOER, 1978) mais également des champignons (SCHMIDT & BANKOLE, 1962 ; SCHMIDT *et al.*, 1974 ; CHOO *et al.*, 1970 ; WELVAERT *et al.*, 1979).

Le travail présenté ici décrit les résultats obtenus avec un sérum anti-*P. exigua* var. *foveata* dans la détection spécifique de ce champignon par immunofluorescence en cultures *in vitro* et sur tubercules de pomme de terre.

II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

A. Matériel

— *Phoma exigua* var. *foveata* : souche monospore issue d'un isolement réalisé en 1979 à partir de tubercules soumis aux tests de détection réalisés chaque année et conservés au congélateur sous forme lyophilisée.

— Pomme de terre : tubercules de pomme de terre de différentes variétés provenant de diverses régions de production en Bretagne (Pleyber-Christ, Pontivy).

B. Méthodes

1. Obtention de l'immunogène

La culture de *P. exigua* var. *foveata* est repiquée sur milieu V8 (jus de légumes commercial) et incubée pendant 10 jours à 20 °C sous lampe FLUORA à 350 nm. Elle fournit une quantité abondante de pycniospores dont on peut faciliter la libération par usage d'une sonde à ultra-sons et qui sont récoltées par lavage dans du tampon phosphate 0,125 M, pH 7,5. La suspension ainsi obtenue est filtrée sur verre fritté 100-160 µm et centrifugée à 3 000 g pendant 5 mn. Le culot contenant les spores est repris dans du tampon phosphate additionné de formol à 1 p. 100 afin de tuer les spores. Le formol est ensuite éliminé par 3 cycles de centrifugation à faible vitesse et la suspension destinée à l'immunisation ajustée à 15×10^6 spores/ml.

2. Processus d'immunisation

Le sérum anti-*P. exigua* var. *foveata* a été obtenu par immunisation d'une jeune lapine (Blanc d'Anjou) selon le schéma suivant :

— 4 injections d'1 ml par voie intraveineuse, tous les 2 jours.

— Après 8 jours, 3 rappels (également de 1 ml en intraveineuse) séparés par des intervalles de 3 jours.

Une semaine après la dernière injection, le sang est prélevé par ponction intracardiaque et le sérum récolté classiquement par centrifugation après coagulation du sang.

3. Technique d'immunofluorescence

La technique d'I.F. indirecte (NAIRN, 1964) est la seule utilisée. Afin de retenir les spores de champignon, les lames de microscope supportant l'échantillon à étudier sont d'abord traitées par l'albumine bovine. Chaque lame reçoit, à 30 mn d'intervalle, 2 dépôts de 25 µl d'albumine bovine à 2 p. 100. Après séchage à 37 °C et déshydratation totale, chaque lame reçoit la suspension d'antigènes qui est également fixée par déshydratation à 37 °C, puis le sérum spécifique anti-*Phoma* et, après lavage par de l'eau physiologique tamponnée (BEHRING), le sérum fluorescent anti-globuline de lapin (BEHRING), auquel on ajoute du bleu Evans à 0,25 p. 100. Le fluorochrome conjugué aux globulines est de l'isothiocyanate de fluorescéine. Les préparations

sont lavées et montées dans de la glycérine tamponnée. Les observations sont réalisées au grossissement 500, au microscope à U.V. en lumière bleue, entre 450 et 495 nm (filtre 6 FITCH, filtre 8 BG-38, filtre d'arrêt U.V. W 156).

4. Titration des anticorps

Le titre du sérum est déterminé par immunofluorescence indirecte appliquée à une suspension de spores identique à celle préparée pour une immunisation. Des dilutions de l'antisérum comprises entre 1/200 et 1/5000 sont éprouvées par comparaison avec un sérum normal de lapin aux mêmes dilutions.

5. Méthodologie de l'analyse des tubercules de pomme de terre

La recherche de *P. exigua* var. *foveata* sur tubercules de pomme de terre est réalisée de deux façons, par isolement sur milieu gélosé après blessure selon la technique habituelle (TROUILLE, 1975) et par I.F. Les prélèvements destinés aux deux méthodes sont réalisés sur les mêmes tubercules, la partie apparemment saine des tubercules blessés étant analysée en I.F. Pour cette dernière technique, 5 demi-tubercules par lot étudié sont lavés par agitation dans 50 ml d'eau ; l'eau de lavage est ensuite filtrée sur tamis de nylon et centrifugée à 3 000 g pendant 5 mn ; le culot contenant les spores est remis en suspension dans 1 ml d'eau. Chaque préparation reçoit 50 µl de cette suspension. Un échantillon est considéré comme positif lorsqu'il renferme au moins une spore fluorescente. Cinq minutes suffisent à l'observation de chaque préparation.

III. RÉSULTATS

A. Titration des anticorps et contrôle de leur spécificité

En présence de l'immunsérum et jusqu'à la dilution 1/4000, les spores de *P. exigua* var. *foveata* apparaissent vert intense ; un début d'atténuation du marquage apparaît à la dilution 1/5000. En présence de sérum normal, quelle que soit sa dilution, les spores apparaissent rouges (Pl. 1, fig. 1), elles sont donc seulement colorées par le bleu Evans. De la même façon, les hyphes mycéliennes ne présentent pas cette fluorescence verte, que ce soit en présence du sérum anti-*Phoma* aux dilutions 1/100, 1/500, 1/1000, 1/2000 (Pl. 1, fig. 2) ou en présence de sérum normal de lapin. La coloration jaune intense de l'hyphes mycélienne et d'une des spores au centre de la figure 2 est vraisemblablement due à une altération ou à un stade particulier de différenciation de ces organes. Lors de l'observation au microscope, cet aspect brillant ne peut être confondu avec la fluorescence verte recherchée. Le fait que toutes les hyphes mycéliennes ne soient pas dans le même champ du microscope explique également que sur le cliché, elles soient différemment colorées.

L'immunsérum obtenu est également contrôlé aux dilutions 1/100, 1/500, 1/1000, 1/2000 contre des spores de *Phoma exigua* var. *exigua* et de divers *Phoma* isolés à partir de plusieurs plantes (lin, féverole, colza) ou à partir du sol. Aucune fluorescence n'a dans ce cas été observée (tabl. 1).

L'immunsérum contient donc bien des anticorps spécifiquement dirigés contre les spores de *P. exigua* var. *foveata*. Il permet de différencier cette espèce de *P. exigua* var. *exigua*, tout au moins lorsqu'il s'agit de spores résultant de cultures *in vitro* (pl. 1, fig. 3).

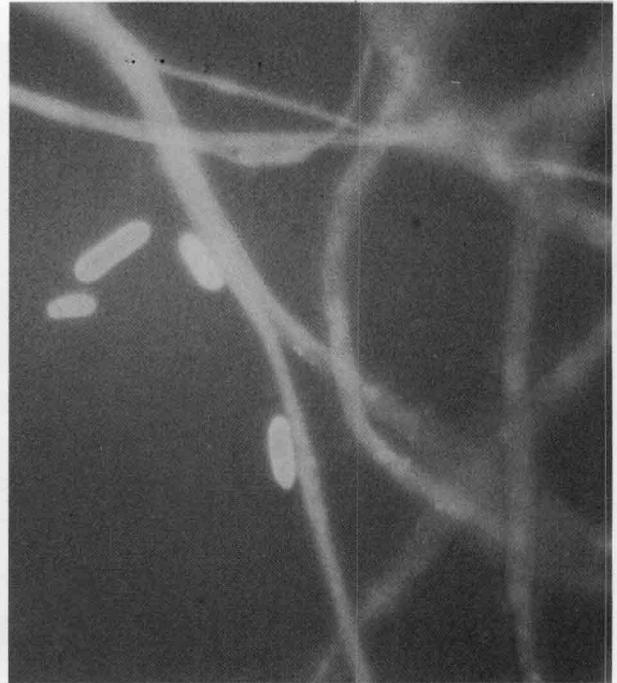


Planche 1

Observations en immunofluorescence de :

1 : culture de *Phoma exigua* var. *fovcata*. sérum de lapin dilué au 1/500. Spores non fluorescentes.

2 : Culture de *Phoma exigua* var. *fovcata*. Immunsérum anti-*Phoma exigua* var. *fovcata* dilué au 1/2000. Seules les spores présentent une fluorescence vert intense.

3 : Mélange de spores de *Phoma exigua* var. *fovcata* et *Phoma exigua* var. *exigua*. Immunsérum anti-*Phoma exigua* var. *fovcata* au 1/1000. Une seule spore est de type *fovcata*.

4 : Eau de lavage de tubercules de pomme de terre. Immunsérum anti-*Phoma exigua* var. *fovcata* dilué au 1/1000.

Echelle : le trait représente 10 microns.

Fluorescent antibody technique for observation of :

1 : Culture of *Phoma exigua* var. *fovcata*. Rabbit normal serum diluted 1/500. No fluorescent spores.

2 : Culture of *Phoma exigua* var. *fovcata*. Homologous antiserum diluted 1/2000. Only spores are highly fluorescent.

3 : Mixture of spores of *P. exigua* var. *fovcata* and *P. exigua* var. *exigua*. Antiserum against *P. exigua* var. *fovcata* diluted 1/1000. A single spore of *P. exigua* var. *fovcata*.

4 : Rinsing water from potato tubers. Antiserum against *P. exigua* var. *fovcata* diluted 1/1000.

Scale : the bar represents 10 μ m.

TABLEAU 1
 Contrôle de la spécificité de l'antisérum.
 Checking of antiserum specificity.

N° souche de la collection	Origine de l'isolement	Réaction en I.F.	Identification
3	Pomme de terre	+	<i>Phoma exigua</i> var. <i>foveata</i>
5	—	+	—
6	—	+	—
(H)7	—	+	—
15	—	+	—
16	—	+	—
18	—	+	—
20	—	+	—
25	—	+	—
36	—	+	—
8	—	—	<i>Phoma exigua</i> var. <i>exigua</i>
10	—	—	—
12	—	—	—
24	—	—	—
28	—	—	—
29	—	—	—
34	—	—	—
37	Féverole	—	<i>Phoma</i> sp.
19	Lin	—	<i>Phoma linicola</i>
38	Sol	—	<i>Phoma eupyrena</i>
974	Colza	—	<i>Phoma lingam</i>

(H)7 = Souche immunogène.
 (H)7 = Immunogenic strain.

B. Recherche du champignon sur tubercules de pomme de terre

La comparaison entre détection par I.F. et par isolement classique sur milieu nutritif gélosé est réalisée sur 13 lots de tubercules, dont 2 lots témoins, l'un présumé sain et l'autre provenant de plants de pomme de terre contaminés artificiellement (tabl. 2).

On observe une bonne concordance entre les résultats fournis par chacune des 2 techniques, 8 lots étant positifs en

I.F. contre 7 par la technique d'isolement ; il est vraisemblable que celle-ci soit en défaut dans le cas du lot n° B-186 (tabl. 2). En effet, lors de la mise en culture, le développement de la colonie de *P. exigua* var. *foveata* peut être inhibé par celui de *P. exigua* var. *exigua*. Il est donc probable que le lot n° B-186 est très fortement infecté par cette forme de *Phoma*.

De la même façon que l'on considère un échantillon positif en isolement lorsqu'une seule colonie se développe, nous considérons en I.F. que l'observation d'une spore fluorescente suffit pour affirmer la présence de *P. exigua* var. *foveata*. En fait, nous observons très fréquemment 3 à 5 spores par champ du microscope ($\times 500$) lorsque le lot est infecté (pl. 1, fig. 4).

De plus, pour certains lots, les préparations observées en I.F. révèlent des spores de morphologie identique à celles de *P. exigua* var. *foveata*, mais non marquées à la fluorescéine ; il s'agit vraisemblablement de spores de *P. exigua* var. *exigua*, ainsi que le confirment les résultats des isolements et les travaux actuellement en cours avec un sérum spécifique de la variété *exigua*.

IV. DISCUSSION

Trois espèces ou variétés de *Phoma* sont inféodées à la pomme de terre : *P. exigua* Desm. (*P. exigua* var. *exigua*), *P. exigua* var. *foveata* (Foister) Boerema, *P. eupyrena* Sacc. (LOGAN & KHAN, 1969). Ce dernier se distingue de *P. exigua* par ses caractéristiques morphologiques et biochimiques. Par contre, *P. exigua* var. *exigua* et *P. exigua* var. *foveata* sont morphologiquement identiques ; ils se différencient par leurs caractéristiques culturales sur milieu nutritif gélosé, par leurs températures optimales et maximales de germination et de croissance et par la production pour la variété *foveata* d'un pigment anthraquinonique. BOEREMA (1967) considère que ces 2 formes peuvent être rattachées à la même espèce, l'espèce tellurique ubiquiste *P. exigua*, mais que l'agent principal de la gangrène diffère suffisamment pour en faire une variété distincte, *P. exigua* var. *foveata*.

TABLEAU 2

Détection de *Phoma exigua* var. *foveata* sur tubercules de pomme de terre blessés, par I.F. et par isolement sur milieu de culture.
 Detection of *Phoma exigua* var. *foveata* on wounded potato tubers by I.F. and isolation on selective agar media.

Lot	Origine	Présence de spores de <i>Phoma exigua</i> var. <i>foveata</i> en IF	Souches isolées
B-183	Pleyber-Christ	+	<i>Phoma exigua</i> var. <i>exigua</i> et var. <i>foveata</i>
B-180	—	+	<i>Phoma exigua</i> var. <i>foveata</i>
B-186	—	+	<i>Phoma exigua</i> var. <i>exigua</i>
B-176	—	+	<i>Phoma exigua</i> var. <i>foveata</i>
B-51	—	+	<i>Phoma exigua</i> var. <i>exigua</i> et var. <i>foveata</i>
L-160	Pontivy	+	<i>Phoma exigua</i> var. <i>foveata</i>
L-154	—	+	<i>Phoma exigua</i> var. <i>foveata</i>
B-173	Pleyber-Christ	néant	<i>Phoma exigua</i> var. <i>exigua</i>
L-157	Pontivy	—	—
L-152	—	—	—
L-155	—	—	—
Témoin infecté artificiellement	Rennes	+	<i>Phoma exigua</i> var. <i>foveata</i>
Témoin d'aspect sain	—	—	Néant

L'étude réalisée ici n'avait pas a priori d'objectif taxonomique, même si elle a révélé qu'il existe une certaine variation sérologique entre les 2 formes de *P. exigua* ou encore entre *P. exigua* et *P. lingam*. Il semble également que chez une même variété et pour une même culture, spores et mycélium possèdent des motifs antigéniques différents. Ces résultats doivent bien sûr être vérifiés par des techniques plus appropriées à ce type d'étude, immunoelectrophorèse ou immunodiffusion en milieu gélosé. Ils sont cependant à rapprocher d'autres observations mettant en évidence des variations sérologiques entre hyphes jeunes et hyphes différenciés, entre mycélium et conidies (MARCHANT & SMITH, 1968). Ils rejoignent également ceux obtenus par d'autres auteurs (MALAJCZUK *et al.*, 1975 ; HOLLAND & CHOO, 1970) quant à l'importance du choix de l'immunogène et les répercussions qu'il peut entraîner sur la spécificité du sérum. En effet, de précédents essais réalisés à partir de cultures mycéliennes ne nous avaient permis d'obtenir que des sérums de titre très faible. L'utilisation de pycniospores comme immunogène semble être un des éléments qui a permis l'obtention d'un sérum suffisamment spécifique pour permettre de différencier tout au moins au niveau des spores, les 2 formes de *P. exigua*.

L'utilisation pratique de cet antisérum paraît dès maintenant envisageable ; l'application de l'immunofluorescence à la détection du champignon sur tubercules constituerait en effet une alternative particulièrement avantageuse face à la technique lourde et fastidieuse d'isolement sur milieu nutritif ou encore en comparaison de la technique peu pratique

d'identification par chromatographie (MOSCH & MOOI, 1975).

Les premiers résultats obtenus mettent en évidence une bonne corrélation entre I.F. et isolement classique ; ils demandent cependant à être confirmés sur un plus grand nombre d'échantillons ; il convient d'envisager la mise au point d'une méthodologie d'analyse des tubercules prenant en compte une automatisation possible et une quantification éventuelle des résultats. Le moment où la détection en I.F. est effectuée (tubercules à la récolte ou après conservation), la quantité de tubercules par lot à analyser sont également des paramètres à étudier. Enfin, il convient de ne pas abandonner l'éventuelle possibilité de mise en évidence par voie sérologique de mycélium sur tubercules, cette forme du champignon étant peut-être plus répandue que les spores à la surface de ces organes.

Le développement des techniques immunologiques, leur application à la détection des pathogènes les plus variés (virus, mycoplasmes, bactéries, champignons), leur relative facilité de mise en œuvre en comparaison des moyens de détection classiques, joints à l'importance économique de la maladie permettent de penser que le travail entrepris ici doit être poursuivi dans la perspective d'une utilisation à grande échelle des tests sérologiques (I.F. ou immunoenzymologie) pour la recherche et l'étude des principaux microorganismes pathogènes sur tubercules de pomme de terre.

Reçu le 27 avril 1982.

Accepté le 26 août 1982.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Allan E., Kelman A., 1977. Immunofluorescent stain procedures for detection and identification of *Erwinia carotovora* var. *atroseptica*. *Phytopathology*, **67**, 1305-1312.
- Banon E., 1975. Selective isolation of *Phoma exigua* var. *foveata* and other species of *Phoma* from soil. *Abstr. Conf. Papers, 6th triennial Conf. E.A.P.R.*, 34-35.
- Boerema G. M., 1967. The *Phoma* organisms causing gangrene of potatoes. *Neth. J. Pl. Path.*, **73**, 190-192.
- Choo Y. Sen, Holland A., 1970. Direct and indirect fluorescent antibody staining of *Ophiobolus graminis* Sacc., in culture and in the rhizosphere of cereal plants. *Antonie van Leeuwenhoek*, **36**, 549-554.
- Entwhistle A. R., 1970. *A biological study of Phoma exigua*. Thesis, the Queen's University of Belfast.
- Hide G. A., Griffith R. L., Adams M., 1977. Methods of measuring the prevalence of *Phoma exigua* on potatoes and in soil. *Ann. appl. Biol.*, **87**, 7-15.
- Hill I. R., Gray T. R. G., 1967. Application of the fluorescent antibody technique to an ecological study of bacteria in soil. *J. Bacteriol.*, **93** (6), 1888-1896.
- Holland A. A., Choo Y. Sen, 1970. Immunoelectrophoretic characteristics of *Ophiobolus graminis* Sacc. as an aid in classification and determination. *Antonie van Leeuwenhoek*, **36**, 541-548.
- Jouan B., Lemaire J. M., Lemarchand E., Sanson M. T., 1974. Mise au point sur la gangrène de la pomme de terre (*Phoma exigua* var. *exigua* et var. *foveata*). *Sci. agron.*, Rennes, 97-110.
- Logan C., Khan A. A., 1969. Comparative studies of *Phoma* spp. associated with potato gangrene in Northern Ireland. *Trans. br. mycol. Soc.*, **52** (1), 9-17.
- Malajczuk N., McComb A. J., Parker C. A., 1975. An immunofluorescence technique for detecting *Phytophthora cinnamomi* Rands. *Aust. J. Bot.*, **23**, 289-309.
- Malcomson J. F., Gray E. G., 1968. Factors affecting the occurrence of gangrene (*Phoma exigua*) in potatoes. *Ann. appl. Biol.*, **62**, 77-87.
- Marchant R., Smith D. G., 1968. A serological investigation of hyphal growth in *Fusarium culmorum*. *Archiv. für Mikrobiologie*, **63**, 85-94.
- McCracken A. R., Logan C., 1977. A selective medium for the isolation of *Phoma exigua* var. *foveata* from soil. *Record Agric. Res.*, **25**, 71-77.
- Mooi J. C., Tichelaar G. M., 1974. Potato gangrene. *Annu. Rep. Inst. Phytopathol. Res., Wageningen 1973*, 24-25.
- Mosch W. H. M., 1974. Chemical identification of gangrene. *Annu. Rep. Inst. Phytopathol. Res., Wageningen 1973*, 30.
- Mosch W. H. M., Mooi J. C., 1975. A chemical method to identify tuber rot in potato caused by *Phoma exigua* var. *foveata*. *Neth. J. Plant Pathol.*, **81** (21), 86-88.
- Nairn R. C., 1964. *Fluorescent protein tracing*, 2nd E. J. Livingstone Edit., 335 p. Edimbourg/London.
- Schmidt E. L., Bankole R. O., 1962. Detection of *Aspergillus flavus* in soil by immunofluorescent staining. *Science*, **136**, 776-777.
- Schmidt E. L., Bankole R. O., Bohlool B. B., 1968. Fluorescent antibody approach to study of *Rhizobia* in soil. *J. Bacteriol.*, **95** (6), 1987-1992.
- Schmidt E. L., Biesbrock J. A., Bohlool B. B., Marx D. H., 1974. Study of mycorrhizae by means of fluorescent antibody. *Can. J. Microbiol.*, **20**, 137-139.
- Trouille C., 1975. *Contribution à l'étude de la gangrène de la pomme de terre*. Mémoire de fin d'études, Rennes, 1975.
- Van Vuurde J. W. L., Elebaas P. F. M., 1978. Use of fluorochromes for direct observation of microorganisms associated with wheat roots. *Can. J. Microbiol.*, **24**, 1272-1275.
- Vruggink M., De Boer S. M., 1978. Detection of *Erwinia carotovora* var. *atroseptica* in potato tubers with immunofluorescence following induction of decay. *Potato Res.*, **21**, 225-229.
- Welvaert W., Samyn G., Poppe J., 1979. Serological detection of *Agaricus bisporus* Quelet and its artificial fructification from isolates of roots of *Platanus acerifolia* W. *Med. Fac. Landbou. Rijksuniv. Cent.*, **44** (1), 469-476.