

# Quantification de transcrits par RT-PCR *in situ* sur racines ligneuses : premiers résultats obtenus sur ectomycorhizes



Amenc L<sup>a</sup>, Plassard C<sup>a</sup>

<sup>a</sup> INRA, UMR Eco&sols, 2 place Viala 34060 Montpellier cedex 2

\* laurie.amenc@inra.fr



## Introduction

La RT-PCR *in situ* permet de localiser l'expression de gènes qui serait trop faible pour être révélée par Hybridation *in situ*. Couramment utilisée chez les légumineuses<sup>1</sup>, son application sur plante ligneuse comme le Pin maritime présente des difficultés à cause de composés phénoliques qui inhibent les enzymes RT et Taq polymérase. Notre hypothèse de travail est qu'il est possible de lever cette inhibition en apportant une protéine en excès (la sérum albumine de bœuf ou BSA) au cours des étapes de RT et de PCR.

## Matériel et méthodes



Le pin maritime est inoculé avec *Hebeloma cylindrosporum* et cultivé sur couche mince de sol déficient en phosphore<sup>2</sup> pendant 3 mois. Les mycorhizes sont prélevées et fixées avant d'être incluses en paraffine et coupées à 7 µm d'épaisseur<sup>3</sup> (Fig. 1).

La RT-PCR *in situ* est réalisée avec (Fig. 1) :

Des primers spécifiques

*HcPT2*<sup>4</sup> : gène codant pour un transporteur fongique de H<sup>+</sup>: phosphate

*HcTub*<sup>5</sup> : gène codant pour la tubuline d'*H. cylindrosporum*

L'ajout de BSA 1% lors des étapes

De linéarisation des ARNs

De Réverse Transcription

De PCR

Les transcrits sont révélés par l'ELF97<sup>6</sup>

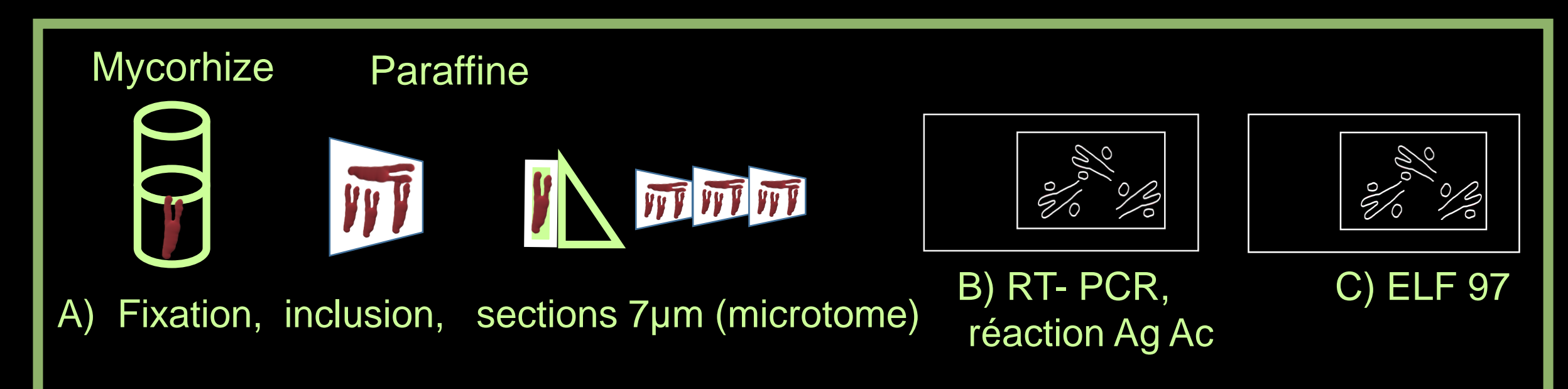


Figure 1: Obtention des coupes de mycorhizes

## Résultats

La figure 2 montre les images obtenues sans BSA (A-B) ou avec BSA 1% (C-D) ajoutée lors des étapes de RT et de PCR. Sans BSA, aucun signal (vert) n'est visible contrairement à l'ajout de BSA 1%.

On peut voir une expression localisée du gène de ménage *HcTub* (C) dans le champignon. Le gène codant pour le transporteur *HcPT2* (D) s'exprime à la fois dans le réseau de Hartig (rH) et les hyphes extra-racinaires (M).

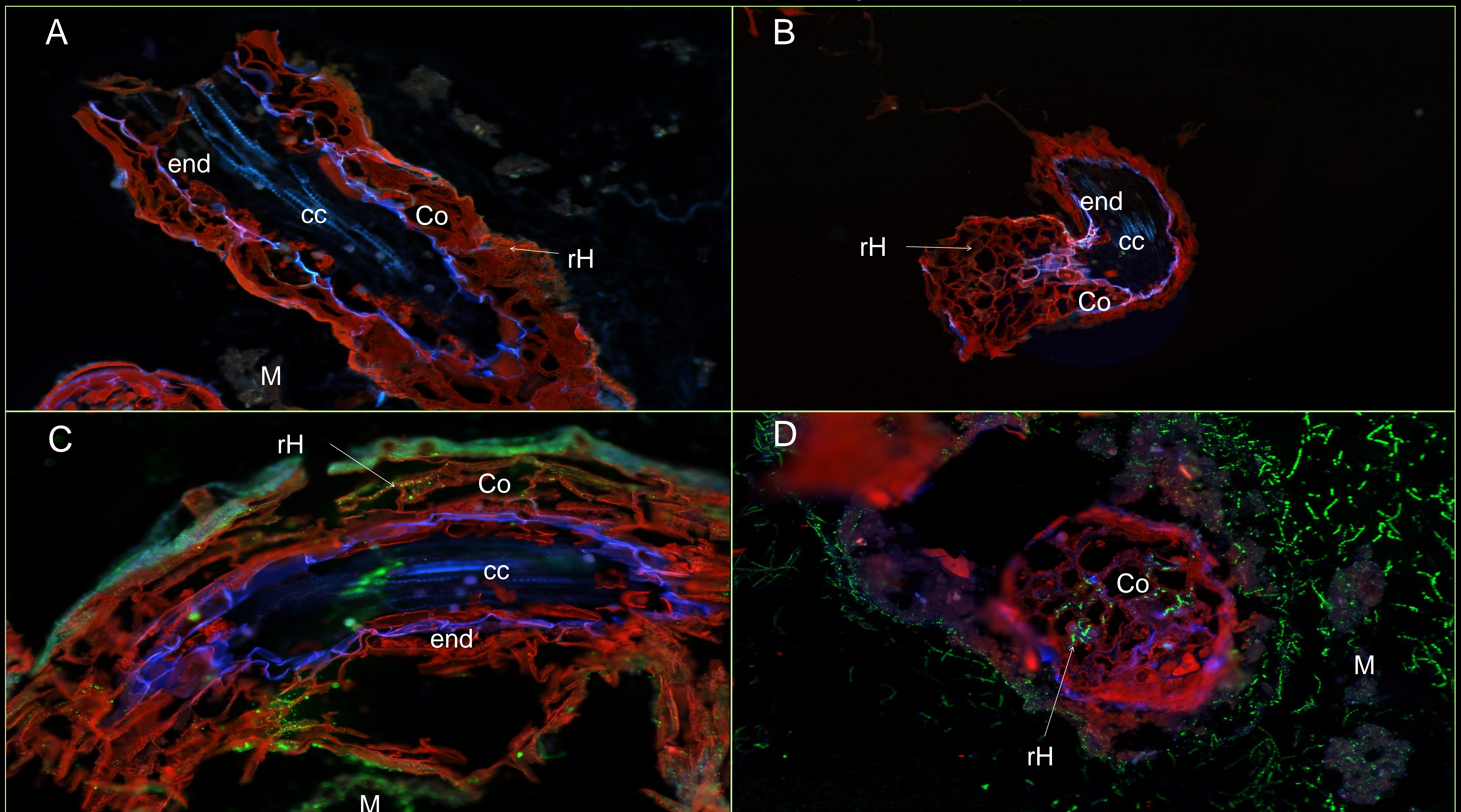


Figure 2: Localisation des transcrits (en vert) du gène de la tubuline (*HcTub*) (A-C) ou du gène codant pour le transporteur *HcPT2* (B-D) de *H. cylindrosporum* dans des coupes transversales de racines de pin mycorhizées, avec BSA (C-D) ou sans BSA (A-B)

## Conclusion

L'apport de BSA nous a permis de lever l'inhibition des tanins et des polyphénols particulièrement actifs à haute température. Nous avons pu révéler l'expression des gènes fongiques de *H. cylindrosporum* dans l'organe symbiotique entre le pin maritime et le champignon