

## **EFFET DU DEXTROSE ET DE L'EXTRAIT DE LEVURE SUR L'INTERACTION ENTRE DEUX ESPÈCES DE RHIZOBIUM ET QUELQUES CHAMPIGNONS <sup>1</sup>**

H. ANTOUN \*, L.M. BORDELEAU \*\*, C. GAGNON \*\* et

R.A. LACHANCE \*

*Phytoprotection* **59** (2): 85-91 (1978)

### **RÉSUMÉ**

L'effet des concentrations du dextrose et de l'extrait de levure dans les milieux de cultures de la souche A2 de *Rhizobium meliloti* et de la souche TL3 de *R. trifolii*, sur leurs interactions avec un *Coniothyrium* sp. et le *Colletotrichum destructivum*, le *Fusarium oxysporum* et le *F. culmorum* a été étudié. L'inhibition de la croissance radiale des trois premiers champignons a augmenté avec l'augmentation de la concentration de dextrose et de l'extrait de levure indiquant que le carbone n'est pas le seul facteur critique. Des concentrations élevées d'extrait de levure (0.5 et 1%) inhibent le *C. destructivum* en absence du *Rhizobium* et cet effet a été éliminé par la présence de la souche TL3. Aucune inhibition significative n'a été obtenue avec le *F. culmorum* qui a été significativement stimulé par la présence du *Rhizobium* dans la plupart des milieux utilisés.

### **ABSTRACT**

The effect of different concentrations of dextrose and yeast extract present in culture media of strain A2 of *Rhizobium meliloti* and strain TL3 of *R. trifolii*, on their interactions with *Coniothyrium* sp, *Collectotrichum destructivum*, *Fusarium oxysporum* and *F. culmorum* was studied. Inhibition of the radial growth of the first three fungi increased with increasing concentrations of dextrose and yeast extract, indicating that the carbon source is not the limiting factor. High concentrations of yeast extract (0.5 and 1%) inhibited *C. destructivum* in the absence of *Rhizobium*. This effect was reversed by strain TL3. No significant inhibition was observed with *F. culmorum* which was significantly stimulated by the presence of *Rhizobium* in most of the media used.

\* Département de Phytologie, Université Laval, Sainte-Foy, Québec, G1K 7P4

\*\* Station de Recherches, Agriculture Canada, 2560 chemin Gomin, Sainte-Foy, Québec, G1V 2J3.

<sup>1</sup> Contribution no 120 de la Station de Recherches, Agriculture Canada, Sainte-Foy, Québec.

## INTRODUCTION

L'invasion des légumineuses par certains champignons phytopathogènes peut être empêchée ou retardée par la présence du *Rhizobium* (Johnston 1967, Mew et Howard 1969, Martin et Barnes 1975). Les réactions d'antagonismes observées *in vitro* entre le *Rhizobium* et les champignons ont été attribuées à la production de métabolites à propriétés antifongiques (Drapeau *et al.* 1973, Samtsevich et Samsonava 1974), ou à la compétition nutritive (Johnston 1967). Dans un travail précédent (Antoun *et al.* 1978b), aucune production de métabolites à propriétés antifongiques diffusibles dans l'agar n'a été observée chez 90 isolats de *Rhizobium* spp. D'autre part, comme les substances volatiles produites par le *Rhizobium* n'affectent pas la croissance radiale des champignons phytopathogènes (Antoun *et al.* 1977), les réactions d'antagonismes observées seraient donc uniquement attribuables à la compétition nutritive. En effet, nous avons aussi montré que l'antagonisme entre le *Rhizobium meliloti* Dangeard et le *Fusarium oxysporum* Schlecht est uniquement le résultat d'une compétition nutritive dans laquelle le carbone n'est pas le seul facteur critique (Antoun *et al.* 1978a). Le but de ce travail est d'étudier les effets de la variation de la concentration du dextrose (source de carbone) et de l'extrait de levure (source d'azote organique) dans le milieu de culture du *Rhizobium* sur son antagonisme envers quelques champignons.

## MATÉRIELS ET MÉTHODES

On a utilisé la souche A2 de *R. meliloti* et la souche TL3 de *R. trifolii* Dangeard ainsi que les champignons *Collectotrichum destructivum* O'Gara (no 239), *Coniothyrium* sp (no 25), *Fusarium culmorum* (W.G.Sm.) Sacc. (no 144) et *F. oxysporum* Schlecht (no 109). Ces organismes proviennent de la collection de la Station de Recherches d'Agriculture Canada à Sainte-Foy. Les milieux de cultures utilisés ont été les suivants : une gélose à base de dextrose et d'extrait de levure (milieu DEL) (Drapeau *et al.* 1973) ; un extrait de pomme de terre enrichi de dextrose (PDA, Difco). Les souches de *Rhizobium* ont été cultivées durant 4 jours dans des fioles Erlenmeyer de 250 ml, contenant 100 ml du milieu DEL sans agar, sur un agitateur rotatoire à 21°C. Les cellules ont été recueillies et lavées deux fois dans un tampon phosphate, 0.01 M, pH 7.0, par centrifugation à 8000 g durant 30 minutes à 4°C. Les cellules, resuspendues dans 100 ml du tampon phosphate, ont été utilisées comme inoculum. L'antagonisme entre le *Rhizobium* et les champignons a été testé par une technique de double couche d'agar, inspirée de celle de Neal (1971). Dans cette technique la première couche d'agar permet au *Rhizobium* de croître sans être affecté par le champignon, alors que la deuxième couche d'agar facilite la croissance du champignon. La première couche contenait 20 ml du milieu DEL, modifié soit en utilisant 2 g/l d'extrait de levure et 1, 5, 10 ou 15 g/l de dextrose, ou bien 10 g/l de dextrose et 0.5, 1, 5 ou 10 g/l d'extrait de levure. Cette couche a

été inoculée à 45°C avec 1 ml de l'inoculum et les témoins ont reçu 1 ml du tampon phosphate. Après 10 jours d'incubation à 21°C, la première couche a été recouverte d'une deuxième couche constituée de 10 ml de PDA additionné de 200 ug/ml de sulfate de streptomycine (Sigma), afin d'arrêter le développement de la bactérie. Des tests préliminaires ont établi que la streptomycine n'avait pas d'effets sur la croissance des champignons à l'étude. Pour permettre la diffusion des substances entre les deux couches de gélose, les boîtes de Petri ont été gardées une nuit à 4°C et ensuite inocuées avec une rondelle du champignon à tester (8 mm de diamètre) provenant de la périphérie d'une colonie active. Les diamètres des colonies de champignons ont été mesurés après une semaine d'incubation à 21°C à l'obscurité. Le diamètre a été mesuré sur deux axes perpendiculaires et tous les essais comprenaient cinq répétitions.

### RÉSULTATS

À tous les niveaux de dextrose la présence du *Rhizobium* a significativement diminué la croissance radiale du *C. destructivum* et du *Coniothyrium* sp. (Tableau 1). Cette inhibition s'est accentuée avec l'augmentation de la concentration de dextrose. Un comportement semblable a été observé avec l'extrait de levure jusqu'à une concentration de 0.5%. L'augmentation de la concentration de l'extrait de levure jusqu'à 1% diminue cet effet inhibiteur et à ce niveau la souche TL3 stimule significativement le *C. destructivum*. En l'absence du *Rhizobium*, l'augmentation de la concentration de dextrose tend à stimuler la croissance du *C. destructivum* et du *Coniothyrium* sp. alors que l'augmentation de la concentration de l'extrait de levure inhibe le *C. destructivum* et stimule le *Coniothyrium* sp. (Tableau 1). En présence de la souche A2, l'inhibition de la croissance radiale du *F. oxysporum* augmente avec l'augmentation de la concentration de dextrose et de l'extrait de levure dans le milieu de culture (Tableau 2). La souche TL3 n'a pas inhibé la croissance radiale du *F. oxysporum* selon un comportement spécial aux différents niveaux de dextrose, mais l'inhibition tend à diminuer avec l'augmentation de la concentration de l'extrait de levure. À une concentration de 1% le champignon a été significativement stimulé. Aucune inhibition significative n'a été observée avec le *F. culmorum*, au contraire le champignon a été stimulé à presque tous les niveaux de dextrose et d'extrait de levure par les deux souches de *Rhizobium*. En l'absence du *Rhizobium*, la croissance de *F. oxysporum* et du *F. culmorum* tend à augmenter avec l'augmentation des concentrations de dextrose et d'extrait de levure. La souche A2 a un pouvoir compétitif beaucoup plus élevé que la souche TL3, car les plus hautes inhibitions ont été obtenues avec cette souche (Tableaux 1 et 2).

### DISCUSSION ET CONCLUSION

En faisant varier la concentration du dextrose et de l'extrait de levure dans le milieu de culture, on observe des changements dans la croissance radiale des

TABLEAU I — EFFET DU DEXTROSE ET DE L'EXTRAIT DE LEVURE SUR L'INTERACTION DES SOUCHES DE *Rhizobium* AVEC LE *C. destructivum* ET LE *Coniothyrium* SP.

|                   |      | Croissance radiale des champignons en mm |                   |         |                         |                  |        |
|-------------------|------|------------------------------------------|-------------------|---------|-------------------------|------------------|--------|
|                   |      | <i>C. destructivum</i>                   |                   |         | <i>Coniothyrium</i> sp. |                  |        |
|                   |      | <i>Rhizobium</i>                         |                   |         | <i>Rhizobium</i>        |                  |        |
|                   | %    | A <sub>2</sub>                           | TL <sub>3</sub>   | Témoins | A <sub>2</sub>          | TL <sub>3</sub>  | Témoïn |
| Dextrose          | 0,1  | 31,75a*<br>(24,50)**                     | 31,60a<br>(24,86) | 42,05   | 29,25<br>(30,44)        | 40,55<br>( 3,57) | 42,05  |
|                   | 0,5  | 28,85a<br>(36,67)                        | 29,35a<br>(35,57) | 45,55   | 31,50<br>(24,37)        | 39,15<br>( 6,01) | 41,65  |
|                   | 1,0  | 30,75<br>(31,90)                         | 27,50<br>(39,10)  | 45,15   | 32,75<br>(27,71)        | 36,05<br>(20,42) | 45,30  |
|                   | 1,5  | 27,85a<br>(40,43)                        | 28,85a<br>(38,29) | 46,75   | 31,90<br>(27,67)        | 34,50<br>(21,77) | 44,10  |
| Extrait de levure | 0,05 | 39,40<br>(24,89)                         | 30,35<br>(42,14)  | 52,45   | 41,45<br>( 5,26)        | 35,10<br>(19,78) | 43,75  |
|                   | 0,1  | 28,15a<br>(43,70)                        | 28,30a<br>(43,40) | 50,00   | 39,10<br>(10,94)        | 36,20<br>(17,54) | 43,90  |
|                   | 0,5  | 26,45<br>(43,37)                         | 29,10<br>(37,69)  | 46,70   | 29,30<br>(37,13)        | 35,65<br>(23,50) | 46,60  |
|                   | 1,0  | 25,40<br>(33,51)                         | 52,25             | 38,20   | 32,50<br>(28,02)        | 35,55<br>(21,27) | 45,15  |

\* Deux moyennes non reliées par la même lettre sont significativement différentes à P = 0,05.

\*\* Les valeurs entre parenthèses indiquent le pourcentage d'inhibition.

TABLEAU 2 — EFFET DU DEXTROSE ET DE L'EXTRAIT DE LEVURE SUR L'INTERACTION DES SOUCHES DE *Rhizobium* AVEC LE *F. oxysporum* ET LE *F. culmorum*.

|                   |      | Croissance radiale des champignons en mm |                   |        |                    |                 |        |
|-------------------|------|------------------------------------------|-------------------|--------|--------------------|-----------------|--------|
|                   |      | <i>F. oxysporum</i>                      |                   |        | <i>F. culmorum</i> |                 |        |
|                   |      | <i>Rhizobium</i>                         |                   |        | <i>Rhizobium</i>   |                 |        |
|                   | %    | A <sub>2</sub>                           | TL <sub>3</sub>   | Témoin | A <sub>2</sub>     | TL <sub>3</sub> | Témoin |
| Dextrose          | 0,1  | 37,95a*<br>(11,44)**                     | 36,55a<br>(14,71) | 42,85  | 33,60              | 36,95           | 26,45  |
|                   | 0,5  | 31,80<br>(26,14)                         | 40,65<br>( 5,58)  | 43,05  | 32,50a             | 34,30a          | 25,50  |
|                   | 1,0  | 29,65<br>(30,65)                         | 38,00<br>(11,12)  | 42,75  | 32,05a             | 31,10a          | 29,70  |
|                   | 1,5  | 28,45<br>(35,57)                         | 40,55<br>( 8,16)  | 44,15  | 33,50a             | 34,85a          | 28,55  |
| Extrait de levure | 0,05 | 31,75<br>(27,10)                         | 40,10<br>( 7,93)  | 43,55  | 33,05              | 36,45           | 27,90  |
|                   | 0,1  | 35,50<br>(22,83)                         | 40,70<br>(11,53)  | 46,00  | 33,60a             | 34,75a          | 31,30  |
|                   | 0,5  | 30,20<br>(34,21)                         | 44,85a<br>( 2,29) | 45,90a | 33,70a<br>( 1,61)  | 45,00           | 34,25a |
|                   | 1,0  | 34,00<br>(35,67)                         | 55,20             | 52,85  | 57,10ab            | 63,75b          | 50,65a |

\* Deux moyennes non reliées par la même lettre sont significativement différentes à P = 0,05.

\*\* Les valeurs entre parenthèses indiquent le pourcentage d'inhibition.

champignons. Ainsi, à des niveaux élevés de dextrose le *Rhizobium* immobilise l'azote organique et augmente l'inhibition des champignons. Cet effet est éliminé à des niveaux élevés d'extrait de levure. Ces résultats sont semblables à ceux obtenus par Marshall et Alexander (1960). Ces auteurs ont montré qu'en milieu liquide, l'inhibition du *F. oxysporum* Schlecht f. sp. *cubense* (E.F. Sm.) Snyder & Hansen par *Agrobacterium radiobacter* Conn. est liée à un rapport C/N élevé ; cette inhibition était éliminée lorsque ce rapport était bas. En utilisant l'urée comme source d'azote, Johnston (1967) a observé que l'antagonisme entre le *F. roseum* var. *avenaceum* (Fr.) Sacc. et le *R. meliloti* diminue avec l'augmentation de la concentration du glucose et a conclu que la source de carbone est le facteur critique dans cet antagonisme. En utilisant l'extrait de levure comme source d'azote, l'inhibition des champignons augmente avec l'augmentation de la source de carbone indiquant que le carbone n'est pas le seul facteur critique. Ceci confirme nos observations précédentes faites avec le *R. meliloti* et le *F. oxysporum* (Antoun *et al.* 1978a). D'autre part, Finstein et Alexander (1962) ont montré que dans un sol stérile la compétition pour le carbone était plus importante que celle pour l'azote chez certaines bactéries du sol et le *F. oxysporum* f. sp. *cubense*. Lorsque l'effet du carbone était éliminé, d'autres éléments comme l'azote et le phosphore devenaient des facteurs critiques. L'inhibition des champignons s'est aussi accentuée avec l'augmentation de la concentration d'extrait de levure jusqu'à 0.5% (et 1% avec le *F. oxysporum* et la souche A2). L'extrait de levure pourrait favoriser la croissance du *Rhizobium* qui utiliserait le dextrose rapidement et le transformerait en polysaccharides extracellulaires aux dépens des champignons. Ces polysaccharides extracellulaires qui contiennent 77% et 50% de glucose chez le *R. meliloti* et le *R. trifolii* respectivement (Vincent 1977), pourraient aussi élever le rapport C/N provoquant l'immobilisation de l'azote organique par le *Rhizobium*. En l'absence du *Rhizobium* le *C. destructivum* a été inhibé par des concentrations élevées d'extrait de levure (Tableau 1). Cet effet a été éliminé par la présence de la souche TL3.

Comparativement au *F. oxysporum*, le *F. culmorum* n'a pas été significativement inhibé par le *Rhizobium*. Ceci est semblable aux observations faites par Martin et Barnes (1975) qui ont montré que plusieurs isolats de *Fusarium* spp. ont donné des réactions allant de la neutralité à une très grande inhibition en présence des souches de *R. meliloti*.

Sous les conditions expérimentales utilisées, il semblerait donc que l'antagonisme entre les deux souches de *Rhizobium* et les champignons utilisés soit le résultat d'une compétition nutritive dans laquelle plusieurs facteurs sont critiques.

#### REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient mademoiselle E. Imbeault pour son aide technique. Une partie de ce projet a été financé par le C.R.E.S.A.Q., octroi no LA-73-553 à R.A. Lachance. H. Antoun est boursier du Ministère de l'Éducation du Québec.

## RÉFÉRENCES

- ANTOUN, H., L.M. BORDELEAU et C. GAGNON. 1977. Effet des substances volatiles produites par *Rhizobium* sur la croissance radiale de quelques champignons phytopathogènes. *Phytoprotection* **58**: (2-3): 92-95.
- ANTOUN, H., L.M. BORDELEAU et C. GAGNON. 1978a. Antagonisme entre *Rhizobium meliloti* et *Fusarium oxysporum* en relation avec l'efficacité symbiotique. *Can. J. Plant Sci.* **58**: 75-78.
- ANTOUN, H., L.M. BORDELEAU et C. GAGNON. 1978b. Absence de la production de métabolites à activité antifongique chez *Rhizobium* spp. *Phytoprotection* **59**: 40-42.
- DRAPEAU, R., J.A. FORTIN et C. GAGNON. 1973. Antifungal activity of *Rhizobium*. *Can. J. Bot.* **51**: 681-682.
- FINSTEIN, M.S. et M. ALEXANDER. 1962. Competition for carbon and nitrogen between *Fusarium* and bacteria. *Soil Science* **94**: 334-339.
- JOHNSTON, H.W. 1967. Potential of the *Rhizobium-Fusarium* interactions on the incidence of alfalfa root rot. *Ph.D. Thesis, University of Rhode Island.*
- MARSHALL, K.C. et M. ALEXANDER. 1960. Competition between soil bacteria and *Fusarium*. *Plant & Soil* **12**: 143-153.
- MARTIN, M.E. et G.L. BARNES. 1975. Interactions of *Rhizobium meliloti* and two genera of fungi associated with root and crown rot of alfalfa. *Proc. Am. Phytopathol. Soc.* **2**: 138.
- MEW, T.W. et F.L. HOWARD. 1969. Root rot of soybean (*Glycine max*) in relation to antagonism of *Rhizobium japonicum* and *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology* **59**: 401.
- NEAL, J.L., Jr. 1971. A simple method for enumeration of antibiotic-producing microorganisms in the rhizosphere. *Can. J. Microbiol.* **17**: 1143-1145.
- SAMTSEVICH, S.A. et A.S. SAMSONOVA. 1974. Antibiotic properties of metabolites of rhizobia with respect to the pathogen of Lupine root rot. *Vyesti Akad. Navuk BSSR. Ser. Biyal Navuk* 1: 48-50. In *Biol. Abstr.* **59**: 244 (no 22930).
- VINCENT, J.M. 1977. *Rhizobium: General microbiology*. Dans: Hardy, R.W.F. et W.S. Silver, éditeurs. *A Treatise on dinitrogen fixation. Section III: Biology*. John Wiley & Sons, N.Y. 675 pp.

(Accepté pour publication le 23 décembre 1977).