

## Actinomycètes antagonistes de champignons et n'affectant pas le *Rhizobium meliloti*<sup>1</sup>

H. ANTOUN, L. M. BORDELEAU, C. GAGNON ET R. A. LACHANCE

Station de recherche, Agriculture Canada, 2560 chemin Gomin, Sainte-Foy (Qué.), Canada G1V 2J3

et

Département de Phytologie, Faculté des Sciences de l'Agriculture et de l'Alimentation, Université Laval, Sainte-Foy (Qué.), Canada G1K 7P4

Approuvé le 31 janvier 1978

ANTOUN, H., L. M. BORDELEAU, C. GAGNON ET R. A. LACHANCE. 1978. Actinomycètes antagonistes de champignons et n'affectant pas le *Rhizobium meliloti*. Can. J. Microbiol. 24: 558-562.

Les effets de 481 actinomycètes, isolés de sols agricoles supportant des cultures luxuriantes de luzerne ou de trèfle ont été étudiés sur deux souches efficaces A2 et S14 de *Rhizobium meliloti*. La souche A2 a été inhibée par 28% des isolats et la souche S14 par 31%. Aucune différence significative n'a été trouvée entre la résistance des deux souches d'actinomycètes. Les effets des 288 isolats n'ayant pas affecté le *R. meliloti* ont été étudiés sur six champignons. Le champignon le plus sensible aux actinomycètes a été le *Stemphylium sarcinaeforme* qui a été inhibé par 20% des isolats, et le plus résistant a été le *Fusarium culmorum* qui n'a été inhibé que par 6% des isolats. Treize isolats d'actinomycètes ont inhibé quatre à six champignons. Dans un sol de serre autoclavé, l'isolat 181, qui a inhibé les six champignons testés, a déterminé un abaissement significatif de la population du champignon phytopathogène *F. oxysporum* f. sp. *medicaginis*, et a éliminé l'effet inhibiteur de ce champignon sur la souche A2 de *R. meliloti*.

ANTOUN, H., L. M. BORDELEAU, C. GAGNON, and R. A. LACHANCE. 1978. Actinomycètes antagonistes de champignons et n'affectant pas le *Rhizobium meliloti*. Can. J. Microbiol. 24: 558-562.

The effects of 481 actinomycetes isolated from agricultural soils supporting good growth of alfalfa or clover on two efficient strains of *Rhizobium meliloti* A2 and S14 were studied. Strain A2 was inhibited by 28% of the isolates and strain S14 was inhibited by 31% of them. No significant difference was found between the resistance of both actinomycete strains. The effects of the 288 isolates not affecting *R. meliloti* on six fungi were also studied. The most sensitive fungus was *Stemphylium sarcinaeforme* inhibited by 20% of the isolates, while *Fusarium culmorum* was the most resistant fungus and was inhibited by only 6% of the isolates. Thirteen isolates inhibited four to six fungi. In an autoclaved greenhouse soil, isolate 181 which inhibited the six fungi tested significantly reduced the population of the phytopathogenic fungus *F. oxysporum* f. sp. *medicaginis* and eliminated the inhibitory effect showed by this fungus on strain A2 of *R. meliloti*.

### Introduction

La présence dans le sol d'une microflore antagoniste envers le *Rhizobium* peut être un des facteurs importants qui empêchent le bon établissement de certaines légumineuses (Foo et Varma 1976; Hattin et Louw 1966; Hely *et al.* 1957; Visona et Tardieux 1964). Ainsi, Patel (1974) a montré que dans les sols où l'inoculation avec des souches efficaces de *Rhizobium* ne donnait pas une nodulation satisfaisante, le pourcentage des actinomycètes présents, inhibant cette bactérie, était plus élevé que dans les sols sans problèmes d'inoculation. Par contre, Baker et Cook (1974) ont observé que sous certaines conditions écologiques, les actinomycètes peuvent être utilisés pour le contrôle biologique de certaines maladies fongiques.

Dans ce travail, des actinomycètes ont été isolés de sols agricoles supportant une bonne croissance de luzerne ou de trèfle, et une bonne nodulation. Cette dernière est due en partie au faible pourcentage de microorganismes antagonistes au *Rhizobium* et (ou) à la présence d'un troisième groupe de microorganismes réduisant considérablement la multiplication de ces antagonistes. L'effet des actinomycètes sur deux souches efficaces de *Rhizobium meliloti* Dangeard a été étudié. L'activité antifongique des actinomycètes n'affectant pas le *R. meliloti* a aussi été étudiée, afin de trouver des actinomycètes pouvant être utilisés dans un programme de contrôle biologique de certaines maladies fongiques chez la luzerne. Finalement, le comportement dans un sol de serre stérile, d'un actinomycète choisi, a été étudié en présence de *R. meliloti* et du champignon phytopathogène *Fusarium oxysporum* Schlecht. f. sp. *medicaginis* (Weimer) Snyder & Hansen.

<sup>1</sup>Contribution No 118 de la Station de recherche d'Agriculture Canada.

TABLEAU I. Quelques caractéristiques des échantillons de sols utilisés pour l'isolation des actinomycètes

| Echantillons de sols | Endroit d'échantillonnage | Cultures       | pH   | % de la matière organique |
|----------------------|---------------------------|----------------|------|---------------------------|
| SS                   | Sol de serres*            | —              | 6.26 | 5.04                      |
| SF1                  | Ste-Foy                   | Luzerne        | 4.87 | 6.18                      |
| SF2                  | "                         | "              | 5.06 | 6.05                      |
| SA1†                 | St.-Adelphe               | "              | 5.60 | 7.53                      |
| SA2                  | "                         | "              | 5.57 | 6.05                      |
| SAL                  | St.-Augustin              | "              | 6.40 | 4.57                      |
| SAT                  | "                         | Trèfle         | 5.87 | 4.22                      |
| SH1                  | St.-Hyacinthe             | Luzerne et mil | 6.69 | 4.84                      |
| SH2                  | "                         | " " "          | 6.63 | 2.62                      |
| SHL1                 | "                         | Luzerne        | 6.97 | 3.40                      |
| SHL2                 | "                         | "              | 7.04 | 9.75                      |

\*Ce sol ne présente aucun problème de nodulation des légumineuses.

†Les chiffres suivant les lettres indiquent que les échantillons proviennent d'un même champ mais de sites différents.

## Matériel et méthodes

### Isolation des actinomycètes

Les actinomycètes utilisés ont été isolés à partir de sols agricoles portant des cultures luxuriantes de luzerne ou de trèfle, au cours des mois de l'été 1976, dans différentes régions du Québec (tableau I). Les échantillons de sols ont été prélevés à une profondeur de 15 à 20 cm et ont été conservés à 4°C. L'isolement des actinomycètes a été fait en dedans de 1 semaine par suspensions-dilutions du sol dans un tampon phosphate, 0.01 M, pH 7.0, et étalement sur gélose à base d'amidon et de caséine (milieu SCA) ou de chitine additionnée de 50 µg/ml de cycloheximide (Sigma) tel que décrit par Parkinson *et al.* (1971). Les repiquages des actinomycètes choisis ont été effectués en tubes sur le milieu de Strzelczyk (1961).

### Rhizobium et champignons

L'efficacité des deux souches A2 et S14 de *R. meliloti* utilisées a été décrite précédemment (Bordeleau *et al.* 1977). Les champignons utilisés, qui sont des saprophytes et (ou) des pathogènes associés aux légumineuses cultivées au Québec, ont été *F. culmorum* (W. G. Smith) Sacc. (144), *F. graminearum* Schwabe (40), *F. oxysporum* Schlecht (109), *F. oxysporum* Schlecht f. sp. *medicaginis* (Weimer) Snyder & Hansen (115), *F. solani* (Mart) Sacc. (139), *Gliocladium roseum* (link) Bainier (141) et *Stemphylium sarcinaeforme* (Cav.) Wiltsh (142). Ces organismes proviennent de la collection de la Station de Recherche d'Agriculture Canada à Sainte-Foy.

### Tests d'antagonismes

L'antagonisme des actinomycètes vis-à-vis du *R. meliloti* et des champignons a été testé par la méthode des disques d'agar de Patel et Brown (1969). Des disques d'agar de 8 mm de diamètre ont été découpés dans des boîtes de Petri contenant les actinomycètes âgés de 1 semaine et croissant sur le milieu de Strzelczyk (1961) à 26°C. Les disques ont été posés sur la surface de plaques de gélose à base de mannitol et d'extrait de levure (Vincent 1970) massivement inoculées avec la souche de *Rhizobium* à tester. Pour les champignons, les disques d'actinomycètes ont été posés à 2 cm d'une colonie active du champignon à tester poussant sur de la gélose à base d'extrait de pommes de terre et enrichie de dextrose (PDA, Difco), additionnée de 1 g/l d'extrait de levure et 100 µg/ml de sulfate de streptomycine (Sigma). Quatre disques d'actinomycètes ont été utilisés par boîte et tous les essais ont été faits en duplicata. Les boîtes ont été gardées une nuit à 4°C pour permettre la diffusion des méta-

bolites et ensuite incubées à 26°C et observées quotidiennement pour la formation de zones d'inhibition.

### Interactions en sol autoclavé

Les interactions entre l'actinomycète 181, la souche A2 de *R. meliloti* et le *F. oxysporum* f. sp. *medicaginis* dans le sol autoclavé ont été étudiées par la méthode décrite par Patel et Brown (1969) modifiée comme suit. Le pH d'un sol de terre (pH 6.26, matière organique 5.04%), séché à l'air et tamisé à 2 mm, a été ajusté à 6.70 avec de la chaux dolomitique. Des quantités de sol équivalentes à 100 g de sol sec, ont été placées dans des fioles Erlenmeyer de 250 ml et l'humidité du sol a été ajustée à 25% en poids avec de l'eau distillée. Les fioles recouvertes d'un bûcher de 50 ml ont été autoclavées durant 1 h à 121°C, trois fois à intervalles de 24 h. L'humidité du sol a été ensuite réajustée à 25% avec du tampon phosphate, 0.01 M, pH 7.0, stérile et contenant les cellules lavées de l'inoculum homogénéisé. Les niveaux d'inoculation ont été respectivement  $6.5 \times 10^3$ ,  $20.8 \times 10^5$  et  $5.3 \times 10^5$  propagules par gramme de sol sec pour *R. meliloti*, pour l'actinomycète 181 et pour *F. oxysporum* f. sp. *medicaginis*. Après l'inoculation le sol a été bien mélangé et les fioles ont été incubées à 26°C. Tous les traitements ont été répétés trois fois. Toutes les semaines, l'humidité a été réajustée à 25% avec de l'eau distillée stérile. Aux jours 10, 17 et 40 après l'inoculation, des échantillons de 1.0 g de sol composés de trois ou quatre prélèvements dans chaque fiole ont été suspendus dans 100 ml de tampon phosphate peptoné ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.34 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1.21 g, peptone (Difco) 1.0 g, par litre d'eau distillée, pH 7.2). Après une agitation vigoureuse à 3000 rpm durant 15 min sur un agitateur mécanique (Lab-Line Junior orbit shaker), l'actinomycète et le champignon ont été dénombrés par suspensions-dilutions puis étalement sur le milieu SCA additionné de 50 µg/ml de cycloheximide pour l'actinomycète et le milieu au Rose bengal de Cooke (Difco) additionné de 20 µg/ml de sulfate de streptomycine pour le champignon. Pour le dénombrement du *Rhizobium*, 1 ml de la première dilution a été ajouté à 100 ml de tampon phosphate peptoné additionné de 50 µg/ml de cycloheximide et gardé durant 18 h à 4°C pour inhiber le champignon. La population du *Rhizobium* a ensuite été estimée par la méthode du nombre le plus probable de Weaver et Frederick (1972) dans des sachets en plastique en utilisant le *Medicago sativa* L. cv Saranac pour lequel les conditions de croissance ont été décrites précédemment (Bordeleau *et al.* 1977).

TABLEAU 2. Antagonisme des actinomycètes envers deux souches efficaces de *R. meliloti*

| Souches de<br><i>R. meliloti</i> | Actinomycètes        |                             |                            |                             |                     |
|----------------------------------|----------------------|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------|---------------------|
|                                  | No. total<br>testées | Faiblement<br>antagonistes* | Fortement<br>antagonistes† | No. total<br>d'antagonistes | %<br>d'antagonistes |
| A2                               | 481                  | 68                          | 66                         | 134                         | 27.85               |
| S14                              | 481                  | 74                          | 74                         | 148                         | 30.76               |

\*Zone d'inhibition  $\leq 15$  mm de diamètre.†Zone d'inhibition  $> 15$  mm de diamètre.

### Résultats

Parmi les 481 isolats d'actinomycètes testés, 28 et 31% ont inhibé respectivement les souches efficaces A2 et S14 de *R. meliloti* (tableau 2).

L'effet antifongique des 288 isolats d'actinomycètes qui n'ont pas affecté le *R. meliloti* a ensuite été étudié avec six champignons. Le champignon le plus sensible à la présence des actinomycètes a été le *S. sarcinaeforme* inhibé par 20% des isolats, alors que le moins affecté a été le *F. culmorum* qui n'a été inhibé que par 6% des isolats (tableau 3). Treize isolats ont inhibé de quatre à six champignons et ont été retenus; parmi eux, l'isolat 181 a inhibé les six champignons et a été utilisé dans l'étude des interactions dans le sol autoclavé.

Après 10 jours d'incubation à 26°C, la croissance du *R. meliloti* dans le sol n'a pas été affectée par la présence du *F. oxysporum* f. sp. *medicaginis*, mais a été considérablement ralentie par l'actinomycète et par le mélange actinomycète champignon (tableau 4). Un effet inhibiteur du *F. oxysporum* f. sp. *medicaginis* sur le *R. meliloti*, qui augmente avec le temps, s'est révélé à partir du 17ième jour. Cet effet a été éliminé ou réduit par la présence de l'actinomycète qui, seul ou avec le champignon, a nettement stimulé le *R. meliloti* après 17 jours (tableau 4). D'autre part, les deux autres microorganismes séparément ou ensemble, ont toujours réduit la population de l'actinomycète. Le traitement *Rhizobium-Fusarium* a eu l'effet le plus marqué, alors que le *Fusarium* seul a exercé le plus faible antagonisme (tableau 5). La présence du *R. meliloti* n'a pas affectée le *F. oxysporum* f. sp. *medicaginis* après 10 et 17 jours et a légèrement stimulé le champignon après 40 jours (tableau 6). Par contre, en présence de l'actinomycète et du mélange actinomycète *Rhizobium*, la population du champignon a toujours été réduite.

### Discussion

Patel (1974) a montré que dans les sols où il y a un problème d'inoculation, le pourcentage d'actinomycètes antagonistes du *Rhizobium* pouvait atteindre 70%. Le nombre d'actinomycètes qui inhi-

TABLEAU 3. Effets antifongiques des actinomycètes n'affectant pas le *R. meliloti*

| Champignons             | Actinomycètes<br>antagonistes |       |
|-------------------------|-------------------------------|-------|
|                         | No.                           | %     |
| <i>F. culmorum</i>      | 17                            | 5.90  |
| <i>F. graminearum</i>   | 35                            | 12.15 |
| <i>F. oxysporum</i>     | 22                            | 7.63  |
| <i>F. solani</i>        | 22                            | 7.63  |
| <i>G. roseum</i>        | 27                            | 9.37  |
| <i>S. sarcinaeforme</i> | 58                            | 20.13 |

bent les deux souches efficaces de *R. meliloti* étant relativement bas, il apparaît donc que dans les sols utilisés les actinomycètes ne représentent pas un problème pour l'établissement du *Rhizobium*. Aucune différence significative n'a été trouvée entre la résistance des deux souches à l'effet des actinomycètes. En effet, ces souches semblent avoir le même comportement en présence des actinomycètes, car avec les deux souches le nombre d'actinomycètes fortement antagonistes est égal à celui des actinomycètes faiblement antagonistes (tableau 2).

Les réactions d'antagonisme qu'exercent les actinomycètes sur les champignons peuvent provenir de la production directe d'un antibiotique ou d'un enzyme dégradant (Baker et Cook 1974), ou de la production de substances volatiles inhibant les champignons (Gupta et Tandon 1977). Ces réactions ne peuvent pas être attribuées à la compétition nutritive, car les actinomycètes ont généralement un très faible pouvoir compétitif (Baker et Cook 1974). Des résultats préliminaires indiquent que l'actinomycète 181 produit une substance antifongique qui n'affecte pas le *R. meliloti* en culture pure. L'effet inhibiteur de cette substance s'est manifesté sur le *F. oxysporum* f. sp. *medicaginis* dans un sol autoclavé (tableau 6). Cet effet a augmenté avec le temps et avec l'accroissement de la population de l'actinomycète (tableau 5). Durant les 10 premiers jours, l'actinomycète a retardé la croissance du *R. meliloti* (tableau 4). Ceci est probablement dû à la production d'un facteur inconnu

TABLEAU 4. Effets de l'actinomycète 181 et du *F. oxysporum* f. sp. *medicaginis* sur la croissance du *R. meliloti* dans le sol autoclavé

| Traitements   | Propagules $\times 10^5$ /g de sol sec |        |       |
|---|--|--------|-------|
|   | Incubation en jours                    |        |       |
|   | 10                                     | 17     | 40    |
| Actinomycète 181  | 811.0                                  | 2295.7 | 99.1  |
| <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>medicaginis</i>                       | 2472.7                                 | 403.7  | 3.5   |
| Actinomycète 181<br>+ <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>medicaginis</i> | 300.3                                  | 2900.0 | 53.3  |
| Témoin ( <i>R. meliloti</i> seul)                                   | 2316.7                                 | 1519.0 | 414.4 |

TABLEAU 5. Effets du *F. oxysporum* f. sp. *medicaginis* et du *R. meliloti* sur la croissance de l'actinomycète 181 dans le sol autoclavé

| Traitements   | Propagules $\times 10^5$ /g de sol sec |       |        |
|---|--|-------|--------|
|   | Incubation en jours                    |       |        |
|   | 10                                     | 17    | 40     |
| <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>medicaginis</i>                         | 267.9                                  | 912.1 | 1595.1 |
| <i>R. meliloti</i>  | 276.1                                  | 635.7 | 1072.8 |
| <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>medicaginis</i><br>+ <i>R. meliloti</i> | 102.0                                  | 189.1 | 508.9  |
| Témoin (actinomycète seul)  | 520.9                                  | 962.0 | 2071.2 |

TABLEAU 6. Effet de l'actinomycète 181 et du *R. meliloti* sur la croissance du *F. oxysporum* f. sp. *medicaginis* dans le sol autoclavé

| Traitements   | Propagules $\times 10^5$ /g de sol sec |      |      |
|---|--|------|------|
|   | Incubation en jours                    |      |      |
|   | 10                                     | 17   | 40   |
| Actinomycète 181  | 45.3                                   | 18.1 | 8.0  |
| <i>R. meliloti</i>  | 80.7                                   | 64.0 | 74.3 |
| Actinomycète 181<br>+ <i>R. meliloti</i>                        | 36.4                                   | 13.9 | 5.6  |
| Témoin ( <i>F. oxysporum</i> f. sp.<br><i>medicaginis</i> seul) | 83.4                                   | 62.6 | 65.3 |

qui retarde la croissance de la bactérie et dont l'effet disparaît avec le temps. Cependant, malgré ce ralentissement, la population de *R. meliloti* a réussi à se multiplier 12 500 fois environ en présence de l'actinomycète. Les actinomycètes ont une action importante dans le sol résultant en partie de leur aptitude à dégrader les substances organiques non biodégradables par les bactéries, ainsi que leur aptitude à produire des substances probiotiques (Dommergues et Mangenot 1970). Ces deux aptitudes peuvent expliquer la réaction de synergisme qu'exerce l'actinomycète sur *R. meliloti* après 17 jours (tableau 4). L'effet inhibiteur du *F. oxysporum* f. sp. *medicaginis* sur le *R. meliloti* résulte

probablement de la production d'un antibiotique (Chhonkar et Subba-Rao 1966). L'actinomycète a éliminé cet effet par inhibition directe du champignon et peut-être aussi par la dégradation de l'antibiotique. Nos résultats indiquent que l'actinomycète 181 peut être bénéfiquement utilisé dans un programme de contrôle biologique de certains champignons pathogènes chez la luzerne ou comme agent protecteur du *Rhizobium* dans les inoculants et dans les sols où la nodulation ne réussit pas. Les effets de l'introduction de cet organisme dans la rhizosphère de la luzerne, sur son rendement et sur la propagation du *F. oxysporum* f. sp. *medicaginis* sont présentement à l'étude.

### Remerciements

Les auteurs remercient L. Dupuis 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.

- BAKER, K. F., et J. R. COOK. 1974. Biological control of plant pathogens. W. H. Freeman and Company, San Francisco.
- BORDELEAU, L. M., H. ANTOUN et R. A. LACHANCE. 1977. Effets des souches de *Rhizobium meliloti* et des coupes successives de la luzerne (*Medicago sativa*) sur la fixation symbiotique d'azote. Can. J. Plant Sci. 57: 433-439.
- CHHONKAR, P. K., et N. S. SUBBA-RAO. 1966. Fungi associated

- with legume root nodules and their effect on rhizobia. *Can. J. Microbiol.* **12**: 1253-1261.
- DOMMARGUES, Y., et F. MANGENOT. 1970. *Ecologie microbienne du sol*. Masson et Cie, Paris.
- FOO, E. L., et A. K. VARMA. 1976. Inhibitory effect of *Streptomyces antibioticus* and other microorganisms on *Rhizobium*. *Folia Microbiol.* **21**: 315-319.
- GUPTA, R. C., et R. N. TANDON. 1977. Growth inhibition of fungi by volatiles from *streptomyces*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **68**: 438-439.
- HATTINGH, M. J., et H. A. LOUW. 1966. The antagonistic effects of soil microorganisms isolated from the root region of clovers on *Rhizobium trifolii*. *S. Afr. J. Agric. Sci.* **9**: 239-252.
- HELY, F. W., F. J. BERGERSEN et J. BROCKWELL. 1957. Microbial antagonism in the rhizosphere as a factor in the failure of inoculation of subterranean clover. *Aust. J. Agric. Res.* **8**: 24-44.
- PARKINSON, D., T. R. G. GRAY et S. T. WILLIAMS. 1971. *Methods for studying the ecology of soil micro-organisms*. I.B.P. Handbook, No. 19. Blackwell Scientific Publications, Oxford and Edinburgh.
- PATEL, J. J. 1974. Antagonism of actinomycetes against rhizobia. *Plant Soil*, **41**: 395-402.
- PATEL, J. J., et M. E. BROWN. 1969. Interactions of *Azotobacter* with rhizosphere and root-surface microflora. *Plant Soil*, **31**: 273-281.
- STRZELCZYK, E. 1961. Studies on the interactions of plant and free-living nitrogen-fixing microorganisms. II. Development of antagonists of *Azotobacter* in the rhizosphere of plants at different stages of growth in two soils. *Can. J. Microbiol.* **7**: 507-513.
- VINCENT, J. M. 1970. *A manual for the practical study of root-nodule bacteria*. I.B.P. Handbook, No. 15, Blackwell Scientific Publications, Oxford and Edinburgh.
- VISONA, L., et P. TARDIEUX. 1964. Antagonistes des *Rhizobium* dans la rhizosphère du trèfle et de la luzerne. *Ann. Inst. Pasteur, Paris*, **107**: 297-302.
- WEAVER, R. W., et L. R. FREDERICK. 1972. A new technique for most-probable-number counts of rhizobia. *Plant Soil*, **36**: 219-222.