

Amélioration de la détection des *Fusarium* spp. et du *Bipolaris sorokiniana* dans les semences par l'ajout de paraquat dans les milieux de culture

Increased detection of *Fusarium* spp. and *Bipolaris sorokiniana* in seed by the addition of paraquat in the culture medium

Stéphan Pouleur et Luc Couture

Volume 93, numéro 1, 2013

Reçu le 21-01-2013; accepté le 23-04-2013

URI : <https://id.erudit.org/iderudit/1018937ar>

DOI : <https://doi.org/10.7202/1018937ar>

[Aller au sommaire du numéro](#)

Éditeur(s)

Société de protection des plantes du Québec (SPPQ)

ISSN

1710-1603 (numérique)

[Découvrir la revue](#)

Citer cet article

Pouleur, S. & Couture, L. (2013). Amélioration de la détection des *Fusarium* spp. et du *Bipolaris sorokiniana* dans les semences par l'ajout de paraquat dans les milieux de culture. *Phytoprotection*, 93(1), 32–42.
<https://doi.org/10.7202/1018937ar>

Résumé de l'article

La germination des graines complique les analyses de l'état sanitaire des semences effectuées sur milieux de culture gélosés. Cette recherche visait à identifier un inhibiteur de la germination des semences inoffensif pour les *Fusarium* spp. et le *Bipolaris sorokiniana*, des champignons pathogènes qui diminuent le pouvoir germinatif et l'état sanitaire des semences. Dans des essais préliminaires, le NaCl a été écarté, alors que le paraquat a été retenu comme candidat le plus prometteur. Des doses de paraquat de 0 à 80 mg L⁻¹ ont été évaluées pour le recouvrement des *Fusarium* sur un milieu peptone-PCNB (pentachloronitrobenzène) et du *B. sorokiniana* sur un milieu PDA-bénomyl. Des lots de semences d'avoine, de blé et d'orge contaminés à différents degrés ont été utilisés. On a déterminé la contamination par ces champignons, la germination totale et la germination nuisible des graines après 7 j. Les doses de 40 mg L⁻¹ pour les *Fusarium* spp. et de 50 mg L⁻¹ pour le *B. sorokiniana* ont été retenues pour leur efficacité. On a aussi observé une diminution de divers contaminants importuns, dont des levures et des *Rhizopus* spp. L'ajout du paraquat aux deux milieux de culture apporte une nette amélioration technique pour la détection de ces champignons pathogènes dans les semences de céréales.

Amélioration de la détection des *Fusarium* spp. et du *Bipolaris sorokiniana* dans les semences par l'ajout de paraquat dans les milieux de culture

Stéphan Pouleur ✉ et Luc Couture

Reçu le 21-01-2013; accepté le 23-04-2013

PHYTOPROTECTION 93 : 32-42

La germination des graines complique les analyses de l'état sanitaire des semences effectuées sur milieux de culture gélosés. Cette recherche visait à identifier un inhibiteur de la germination des semences inoffensif pour les *Fusarium* spp. et le *Bipolaris sorokiniana*, des champignons pathogènes qui diminuent le pouvoir germinatif et l'état sanitaire des semences. Dans des essais préliminaires, le NaCl a été écarté, alors que le paraquat a été retenu comme candidat le plus prometteur. Des doses de paraquat de 0 à 80 mg L⁻¹ ont été évaluées pour le recouvrement des *Fusarium* sur un milieu peptone-PCNB (pentachloronitrobenzène) et du *B. sorokiniana* sur un milieu PDA-bénomyl. Des lots de semences d'avoine, de blé et d'orge contaminés à différents degrés ont été utilisés. On a déterminé la contamination par ces champignons, la germination totale et la germination nuisible des graines après 7 j. Les doses de 40 mg L⁻¹ pour les *Fusarium* spp. et de 50 mg L⁻¹ pour le *B. sorokiniana* ont été retenues pour leur efficacité. On a aussi observé une diminution de divers contaminants importuns, dont des levures et des *Rhizopus* spp. L'ajout du paraquat aux deux milieux de culture apporte une nette amélioration technique pour la détection de ces champignons pathogènes dans les semences de céréales.

Mots clés : *Bipolaris*, *Fusarium*, semences, céréales, état sanitaire, milieu de culture, germination

[Increased detection of *Fusarium* spp. and *Bipolaris sorokiniana* in seed by the addition of paraquat in the culture medium]

Seed germination complicates seed health tests performed on agar culture media. The objective of this research was to identify an inhibitor of seed germination that does not affect recovery of *Fusarium* spp. and *Bipolaris sorokiniana*, two fungal pathogens that reduce seed germination and seed health. During preliminary assays, NaCl was rejected while paraquat was identified as the best candidate. Paraquat doses ranging from 0 to 80 mg L⁻¹ were evaluated for the recovery of *Fusarium* spp. on peptone-PCNB (pentachloronitrobenzene) agar and for the recovery of *B. sorokiniana* on a PDA-benomyl medium. Seed lots of oat, wheat, and barley, infected at different degrees, were used for the trials. Contamination with both fungi as well as total and detrimental germinations were determined after 7 d. Doses of 40 mg L⁻¹ for *Fusarium* spp. and 50 mg L⁻¹ for *B. sorokiniana* detection were identified as the most efficient. We also noticed a reduction in some contaminants such as yeasts and *Rhizopus* spp. The addition of paraquat into culture media to detect these pathogens constitutes a significant improvement of the seed health testing techniques used in cereals.

Keywords: *Bipolaris*, cereals, culture media, *Fusarium*, germination, seed analysis, seed health.

INTRODUCTION

Les *Fusarium* spp. et le *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker sont des champignons pathogènes qui dégradent la qualité des semences de céréales et causent des pourritures de racines (Champion 1997; Bailey *et al.* 2004). L'état sanitaire ou le degré de contamination des graines par ces champignons est l'un des indicateurs de la qualité des lots de semences. Une des techniques standards utilisées pour détecter ces champignons consiste à placer des semences sur des milieux de culture gélosés et à observer le développement des champignons après une période d'incubation (Mathur et Kongsdal 2003). Lorsque des graines germent pendant ces tests, les racines brisent la gélose et déplacent les graines, ce qui rend l'observation plus difficile (Hagborg *et al.* 1950; Machado *et al.* 2004). De plus, les feuilles en développement ainsi que les racines peuvent transférer la contamination d'une graine à l'autre, faussant ainsi les résultats. La présence des feuilles de plantules jusque dans le couvercle des boîtes de Petri est une nuisance pour l'observation des résultats. Finalement, la germination des graines retarde la croissance des agents pathogènes et entraîne une sous-estimation du degré réel de contamination des semences. En effet, les plantules en croissance possèdent des mécanismes de résistance active qui les protègent contre les infections. Ainsi, lorsqu'on utilise des traitements qui endommagent ou tuent les graines ou les plantules, la détection des agents pathogènes s'en trouve améliorée à un degré équivalent à ce qu'on obtient avec des graines disséquées puis placées sur un milieu de culture (Limonard 1966).

Différentes stratégies ont été proposées pour réduire les inconvénients causés par la germination des graines durant les analyses de leur état sanitaire. Pour éviter le soulèvement des couvercles des boîtes de Petri par les plantules en croissance et le séchage du papier buvard qui entraîne un arrêt de la croissance des champignons, on place une bande élastique autour des boîtes (Mathur et Kongsdal 2003). Il en découle toutefois la formation indésirable de gouttelettes d'eau à l'intérieur de la boîte. Par la suite, avant de procéder à l'examen des graines, on élimine les feuilles des plantules sans déplacer les graines. Cette opération délicate demande toutefois beaucoup de temps. La congélation des semences, peu de temps après le début de l'incubation, peut servir à tuer les plantules en développement et ainsi faciliter la détection de champignons pathogènes (Limonard 1966). Cette technique fonctionne sur du papier buvard, mais elle est néfaste pour les milieux de culture gélosés; elle permet néanmoins souvent de récupérer plus de champignons qu'avec des milieux de culture gélosés, car les embryons tués par le gel serviraient de nutriments aux champignons (Fakhrunnisa et Ghaffar 2006). Des méthodes basées sur la restriction osmotique à l'aide de différents produits ont été évaluées pour inhiber la germination des semences. Chez le zinnia (*Zinnia* spp.), le mannitol sur papier buvard a amélioré la détection de deux espèces d'*Alternaria* par rapport à la congélation, alors qu'il a défavorisé la détection des *Fusarium* (Szopińska *et al.* 2012). Le chlorure de sodium (NaCl)

peut être utilisé pour inhiber la germination et faciliter la détection de champignons pathogènes chez les semences de haricot (*Phaseolus* spp.) et de riz (*Oryza* spp.) (Machado *et al.* 2008). Chez le blé (*Triticum* spp.), le NaCl et le mannitol n'affectent pas la détection du *B. sorokiniana*, alors qu'ils réduisent la détection des *Fusarium* (Celano *et al.* 2004). Ces produits ne semblent pas avoir été testés en milieux gélosés.

L'usage des herbicides comme inhibiteurs de la germination des semences, bien que non mentionné dans le manuel de l'ISTA (International Seed Testing Association) (Mathur et Kongsdal 2003), est une technique employée pour faciliter la détection des champignons dans les semences. Par exemple, l'herbicide 2,4-D est utilisé pour inhiber la germination des semences de haricot lors de l'évaluation de leur état sanitaire (Hagborg *et al.* 1950). Sur papier buvard, il facilite la détection de champignons pathogènes chez les semences de crucifères, mais il retarde la croissance de l'*Alternaria brassicicola* (Schweinitz, Wiltshire) (Neergaard 1979). Cet herbicide, actif surtout contre les dicotylédones en croissance, est incorporé à un milieu de culture gélosé pour inhiber la germination de l'orge (*Hordeum* spp.), une monocotylédone, lors de la détection du *Rhynchosporium secalis* (Oudem. J.J. Davis) (Champion 1997). En revanche, le 2,4-D inhibe certains *Fusarium*, dont le *F. graminearum* (Schwabe) (Bever et Slife 1948; Pakdaman *et al.* 2002), et le *B. sorokiniana* (Hsia et Christensen 1951). Lors de l'analyse de l'état sanitaire de semences de céréale, le 2,4-D, utilisé pour inhiber la germination, donne des résultats inférieurs et plus variables que la méthode de congélation (Limonard 1968). Cet herbicide offre donc peu de potentiel pour faciliter la détection de ces champignons dans les semences de céréales.

L'atrazine et ses dérivés ont été écartés dès le début des essais, car ils ralentissent la croissance de plusieurs *Fusarium* et de plusieurs espèces d'*Alternaria*, un genre apparenté au *Bipolaris* (Richardson 1970). Plus spécifiquement, le *F. graminearum* est inhibé par l'atrazine à partir de 50 mg L⁻¹ (Jeffery et Burgess 1990) alors que la croissance du *B. oryzae* ((Breda de Haan) Shoemaker), parent du *B. sorokiniana*, est fortement ralentie par des triazines (Elwy *et al.* 1989). De plus, lors d'un essai préliminaire, la simazine et la triazine n'ont pas suffisamment réduit la germination de semences de céréales pour être utilisables (résultats non présentés).

Le paraquat est un herbicide utilisé pour accélérer la sénescence des plantes en production agricole et en phytopathologie afin de favoriser la détection des infections latentes de champignons dans les tissus végétaux (Cerkauskas et Sinclair 1980; Gindrat et Pezet 1994; Mertely et Legard 2004). Même si cet herbicide empêche efficacement la germination de graines de blé et de seigle (*Secale* spp.) (Young *et al.* 1984), à notre connaissance, il n'a pas été utilisé pour inhiber la germination des semences lors de l'analyse de leur état sanitaire. Lorsqu'il est incorporé dans un milieu de culture gélosé à une dose de 100 mg L⁻¹, cet herbicide affecte peu la croissance du *Fusarium culmorum* ((W.G. Smith) Sacc.) et du *B. sorokiniana* en culture pure (Wilkinson et Lucas 1969a). En revanche, à cette même concentration, il inhibe complètement

un *Fusarium* spp. (Tan *et al.* 2002). Le paraquat est aussi beaucoup moins inhibiteur que le 2,4-D sur la croissance du mycélium du *F. pallidoroseum* ((Cooke) Sacc.) (Praveena *et al.* 2007). De plus, il inhibe le *Rhizopus stolonifer* ((Ehrenb.) Vuill.) (Wilkinson et Lucas 1969b), un champignon à croissance envahissante indésirable qui est présent sur les semences et qui contamine les boîtes de Petri lors de l'analyse de l'état sanitaire. Ces caractéristiques faisaient donc du paraquat un candidat prometteur pour favoriser la détection des *Fusarium* spp. et du *B. sorokiniana* chez les semences de céréales en empêchant leur germination. Toutefois, il était essentiel de vérifier cette hypothèse et aussi de déterminer la dose optimale d'herbicide à utiliser pour chacun des champignons visés, car une concentration trop élevée peut nuire au développement des champignons.

Actuellement, la méthode qui est encore la plus répandue pour résoudre le problème de la germination des semences de céréales demeure la congélation sur papier buvard (Hajihassani *et al.* 2012; Mobasser *et al.* 2012; Tekle *et al.* 2013). Par contre, cette méthode non sélective peut se révéler imprécise pour détecter les *Fusarium* spp. et le *B. sorokiniana* puisque ces champignons, qui sont des antagonistes les uns envers les autres (Scardaci et Webster 1981), sont fréquemment présents sur le même grain (Christensen et Stakman 1935). Selon Åkerstrand (1992), l'emploi de plusieurs milieux de culture est souvent nécessaire pour obtenir des résultats fiables lors de l'analyse de la mycoflore des grains. C'est pourquoi l'utilisation de milieux de culture sélectifs pour chacun de ces genres de champignon permettrait d'évaluer plus précisément la contamination des lots qu'avec la méthode sur papier buvard. L'objectif de cette recherche visait donc à identifier une substance et sa concentration optimale permettant d'inhiber la germination des semences de céréales sur des milieux de culture sélectifs sans nuire à ces champignons. Un essai préliminaire a permis d'éliminer le NaCl. Le paraquat s'est avéré très efficace tout en inhibant certains contaminants nuisibles. Une partie de cette recherche a été présentée lors d'une communication scientifique (Pouleur et Couture 2009).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Milieux de culture

Dans chaque milieu de culture, la fermeté de la gélose a été réduite pour faciliter la mise en place des graines dans les milieux, éliminer le fendillement et permettre un meilleur contact entre la graine et les matières actives du milieu, améliorant ainsi leur efficacité sélective. La concentration d'agar a donc été ajustée à 1 % pour le milieu peptone-PCNB et à 0,7 % pour le milieu PDA-bénomyl. Le milieu « eau gélosée » utilisé comme témoin a été préparé en ajoutant 10 g d'agar Difco L⁻¹ d'eau suivi d'une stérilisation à l'autoclave. Les inhibiteurs n'ont pas été stérilisés, mais ils ont été dilués dans l'eau stérile lorsque nécessaire.

Détection des *Fusarium* spp.

Le milieu sélectif peptone-PCNB (Papavizas 1967) a été modifié et préparé de la façon suivante : par L d'eau distillée, 15 g de peptone (Bacto peptone 211677 de Difco); 1 g de KH₂PO₄; 0,5 g de MgSO₄·7H₂O; 1 g de bile de bœuf (Quebact QB-65-3518); et 10 g d'agar Difco ont été ajoutés. Après stérilisation à 121 °C pendant 20 min suivi d'un refroidissement à 50 °C, les inhibiteurs suivants ont été ajoutés : 50 mg de chlorotetracycline HCl (Sigma C-4881); 100 mg de sulfate de streptomycine (Sigma S-6501); et 500 mg de PCNB (667 mg de Terraclor à 75 % m.a. poudre mouillable; Crompton Co.).

Détection du *Bipolaris sorokiniana*

Un milieu gélosé a été élaboré en se basant sur le milieu de Stack (1977). Ce milieu, que nous avons appelé PDA-bénomyl, a été préparé comme suit : par L d'eau distillée, 3,9 g de PDA Difco et 5,5 g d'agar ont été ajoutés pour porter la concentration totale d'agar à 0,7 %. Après stérilisation et refroidissement à 50 °C, 10 mg de bénomyl (20 mg de Benlate WP, 50 % de m.a.; Dupont Canada, Inc.) et 100 mg de sulfate de streptomycine (Sigma S-6501) ont été ajoutés. Le Benlate sous forme de poudre mouillable a été ajouté directement au milieu. Nous avons ainsi utilisé 10 % de la concentration commerciale du milieu de pomme de terre glucosée (PDA Difco), car le *Bipolaris* sporule mieux et produit moins de mycélium sur un milieu pauvre (Stack 1977). Le bénomyl, qui ne nuit pas au *B. sorokiniana* (Edgington *et al.* 1971), est ajouté pour inhiber les *Fusarium* et autres champignons présents sur les semences qui pourraient se développer rapidement et masquer le *Bipolaris*.

Recherche d'inhibiteurs de germination

Méthodologie

La tolérance des microorganismes aux inhibiteurs de germination ou autres produits sélectifs peut être influencée par la composition du milieu de culture (Jeffery et Burgess 1990; Wilkinson et Lucas 1969a). Dans la présente recherche, les semences placées dans les milieux de culture constituent une source d'éléments nutritifs qui pourrait aussi affecter la tolérance des microorganismes aux inhibiteurs. C'est pourquoi, dans le but de développer rapidement une formulation efficace, nous avons choisi de tester les doses d'inhibiteurs de germination sur les semences et sur les champignons en même temps plutôt que de faire une présélection sur des cultures pures de champignon.

Des lots de semences de blé, d'orge et d'avoine (*Avena* spp.) contaminés à différents degrés par les champignons à l'étude ont été sélectionnés parmi des lots préalablement étudiés. L'identité des cultivars n'est pas présentée dans le but de respecter les ententes de confidentialité convenues avec les fournisseurs de ces lots. Comme les semences saines germent habituellement bien tandis que les semences contaminées peuvent ne pas germer, il fallait utiliser un éventail étendu de degrés de contamination pour évaluer l'effet des inhibiteurs à la fois sur la germination des semences et sur le développement des champignons pathogènes.

Les semences ont été enfoncées à la mi-hauteur à l'horizontal dans les milieux de culture gélosés. Dix graines par boîte de Petri ont été disposées à distance égale les unes des autres. De 30 à 40 graines par lot ont été utilisées lors des essais préliminaires; 50 graines ont été utilisées lors des essais subséquents de validation. Les boîtes de Petri ont été placées dans des sacs de plastique et positionnées à l'endroit à 25 °C dans l'obscurité. Après 7 j, la germination a été notée ainsi que le nombre de graines contaminées par les champignons recherchés. Dans le cas du milieu PDA-bénomyl, la contamination par les *Alternaria* a aussi été notée. Les grandes différences de taille et de forme entre les spores d'*Alternaria* et celles du *Bipolaris* permettent de les distinguer aisément à l'aide d'une loupe binoculaire.

Pour déterminer la dose optimale d'inhibiteurs, deux types de germination ont été notés. La germination totale, lorsque le coléoptile ou la racine atteint au moins la même longueur que la graine, et la germination nuisible, c'est-à-dire qui nuit ou retarde l'interprétation des résultats. On considère qu'un germe supérieur à 1 cm de longueur est nuisible. Cette approche permet d'utiliser des doses moins élevées d'inhibiteurs puisqu'on tolère un certain degré de croissance germinative.

Essais préliminaires avec le NaCl

Pour évaluer l'effet du NaCl sur les *Fusarium* et la germination des graines, des concentrations de 5 à 20 g L⁻¹ ont été ajoutées au milieu peptone-PCNB. Des semences ont été placées sur le milieu et la proportion de graines germées ainsi que la croissance des *Fusarium* ont été observées après 7 j d'incubation dans l'obscurité à 25 °C.

Pour évaluer le potentiel du NaCl à faciliter la détection du *B. sorokiniana*, un essai préliminaire a été réalisé en ajoutant des concentrations de NaCl de 0, 20, 30 et à 40 g L⁻¹ au milieu PDA-bénomyl. Des semences ont été placées sur le milieu et incubées dans l'obscurité à 25 °C. Après 7 j, le pourcentage de germination des graines a été noté et la croissance des colonies de *Bipolaris* a été comparée visuellement.

Validation du paraquat et détermination des doses optimales

Pour la détection des *Fusarium*, le milieu peptone-PCNB contenant des concentrations de paraquat de 0, 10, 20, 40 et 80 mg L⁻¹ m.a. a été évalué. L'herbicide Gramoxone (paraquat m.a. 200 g L⁻¹; Syngenta Canada Inc.) a été ajouté directement au milieu après l'autoclavage et un refroidissement à 50 °C. Le paraquat tolère la stérilisation à l'autoclave (Wilkinson et Lucas 1969a), mais il est plus pratique de l'incorporer aux milieux de culture après la stérilisation pour éviter des odeurs désagréables pendant l'autoclavage. Nous avons choisi deux lots de semences de blé, un d'orge et un d'avoine, tous contaminés à différents degrés par les *Fusarium*. Quarante graines par lot ont été prélevées au hasard et placées, tel que décrit précédemment, dans chacun des milieux contenant les différentes doses de paraquat ainsi que dans le milieu « eau gélosée ». Ce dernier milieu a été utilisé comme témoin, car il ne contient aucun inhibiteur et permet une bonne germination

des graines. La détection des *Fusarium* et la germination ont été déterminées après 7 j.

Pour valider la formulation finale, le milieu peptone-PCNB contenant 40 mg L⁻¹ de paraquat, dose retenue à l'étape précédente, a été comparé au milieu sans paraquat. Dans un essai comportant neuf lots de semences (trois de blé, trois d'orge et trois d'avoine) contaminés à différents degrés, l'effet des deux milieux sur la détection des *Fusarium*, sur la germination totale et sur la germination nuisible des grains a été évalué tel que décrit précédemment. Cinquante graines par lot ont été analysées sur les deux milieux et l'essai a été répété.

Pour la détection du *B. sorokiniana*, un essai a été réalisé sur le milieu PDA-bénomyl avec des doses de paraquat de 0, 10, 20, 40 et 80 mg L⁻¹. Deux lots d'orge et un lot de blé ont été utilisés. De 20 à 40 graines ont été analysées. Pour valider la formulation finale du milieu PDA-bénomyl contenant 50 mg L⁻¹ de paraquat, nous l'avons comparé au milieu sans paraquat. Dans un essai comportant neuf lots de semences (trois de blé, trois d'orge et trois d'avoine) contaminés à différents degrés, l'effet des deux milieux sur la détection du *Bipolaris* ainsi que sur la germination totale et la germination nuisible des graines a été évalué tel que décrit précédemment. Cinquante graines par lots ont été analysées sur les deux milieux.

Pour effectuer une validation additionnelle du milieu PDA-bénomyl avec herbicide, nous avons réalisé un autre essai comparatif avec 13 lots de semences de céréales prélevés au hasard. Cinquante graines par lot ont été placées sur le milieu de base et sur le milieu amélioré et ont été incubées tel que décrit précédemment. Après 7 j, le nombre de graines contaminées par le *Bipolaris* a été noté. Nous avons alors constaté que plusieurs boîtes de Petri étaient contaminées par du *Rhizopus* spp. provenant des semences. Ce champignon se développe rapidement en hauteur, allant jusqu'à masquer les colonies de *Bipolaris*. Cela entraîne le rejet des boîtes contaminées, diminuant ainsi la précision des analyses. C'est pourquoi nous avons noté le nombre de boîtes de Petri contaminées par ce champignon.

Analyses statistiques

Pour identifier la dose de paraquat à utiliser dans le peptone-PCNB, nous avons utilisé un dispositif factoriel comprenant quatre répétitions (boîtes de Petri), cinq doses d'herbicides et quatre lots de semences, pour un total de 80 boîtes de Petri. Les 20 boîtes du milieu témoin « eau gélosée » n'ont pas été considérées pour l'analyse statistique. Pour les essais de validation des milieux modifiés, l'expérience a été mise en place selon le même dispositif, mais il comprenait cette fois-ci cinq répétitions (boîtes de Petri), neuf lots de semences et deux doses d'herbicides, pour un total de 90 boîtes de Petri.

Les données recueillies ont été ramenées en pourcentage, puis une analyse de variance a été effectuée à l'aide de la procédure GLM du logiciel SAS (SAS Institute, Cary, NC, USA, 1999-2001). La normalité a été testée à l'aide de la procédure Univariate. Une transformation angulaire des données a été utilisée pour respecter les postulats de l'analyse de variance.

Le test de LSD a été utilisé pour comparer les moyennes des traitements lorsque le résultat de l'analyse de variance le justifiait. Par la suite, les moyennes détransformées ont été présentées dans les figures.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Essais avec le NaCl

Les essais préliminaires ont montré qu'aux doses de 5 et 10 g L⁻¹ de NaCl, les graines de blé ont germé facilement et la croissance des *Fusarium* n'a pas été affectée. En revanche, à 20 g L⁻¹, la germination a été totalement inhibée, mais la croissance des *Fusarium* a également été ralentie au point de nuire à leur détection (résultats non présentés). Le NaCl a donc été rejeté comme inhibiteur dans le milieu de détection des *Fusarium*.

La croissance et la sporulation du *B. sorokiniana* ont aussi été diminuées à la dose de 20 g L⁻¹ de NaCl, quantité minimale nécessaire pour inhiber la germination des semences (Fig. 1). Ces résultats semblent contradictoires avec ceux de Hervieux *et al.* (2002) qui ont montré que la croissance de l'*Helminthosporium solani* (Durieu & Mont.) est peu affectée par le NaCl. Les travaux de Hervieux *et al.* (2002) ont toutefois été réalisés sur des cultures pures et avec un milieu de culture exempt de fongicide ou de bactéricide, contrairement au nôtre qui contient du bénomyl et de la streptomycine. Il a été démontré qu'au minimum 22 g de NaCl L⁻¹ d'eau dans la solution ajoutée à un papier buvard étaient nécessaires pour inhiber la germination des graines de blé (Yildiz et Kasap 2007); toutefois, à cette concentration, le *Bipolaris* a été trop affecté pour pouvoir être détecté efficacement. Le NaCl a donc aussi été rejeté comme inhibiteur dans le milieu de détection du *B. sorokiniana*.

Essais avec le paraquat

Utilisation du paraquat pour la détection des *Fusarium* sur le milieu peptone-PCNB

La détection des *Fusarium* n'a pas été affectée par les doses de paraquat (Tableau 1 et Fig. 2A) alors que la germination nuisible a été pratiquement nulle et similaire avec toutes les doses de 10 mg L⁻¹ et plus (Fig. 2C). La germination totale a diminué avec l'augmentation de la dose (Fig. 2B). Cette différence entre les deux types de germination confirme la pertinence d'avoir choisi la germination nuisible pour sélectionner la dose optimale d'inhibiteur. Étant donné qu'il subsistait un peu de germination nuisible à 20 mg L⁻¹ et que les *Fusarium* n'ont pas été affectés jusqu'à la dose maximale, nous avons retenu celle de 40 mg L⁻¹. L'interaction significative Lot*Dose observée pour les deux types de germination (Tableau 1) n'a pas fait l'objet d'analyses statistiques détaillées pour en déterminer la cause étant donné la grande différence entre la valeur de F de l'effet de la dose et de celui de cette interaction. On peut cependant supposer que cette interaction provient du lot A28 qui n'a pas germé sur le milieu témoin sans paraquat (Fig. 2B, C).

Cet essai montre que pour détecter des champignons pathogènes dans les semences, il est essentiel d'utiliser un milieu de culture qui favorise la croissance des champignons puisque très peu de *Fusarium* se sont développés sur l'eau gélosée (Fig. 2A). L'absence d'éléments nutritifs dans l'eau gélosée n'a pas nui à la germination des semences (Fig. 2B), car celles-ci contiennent des réserves qui nourrissent la plantule. En revanche, le développement rapide des plantules et l'absence de nutriments défavorisent le développement des champignons et n'ont pas permis de les détecter (Fig. 2C).

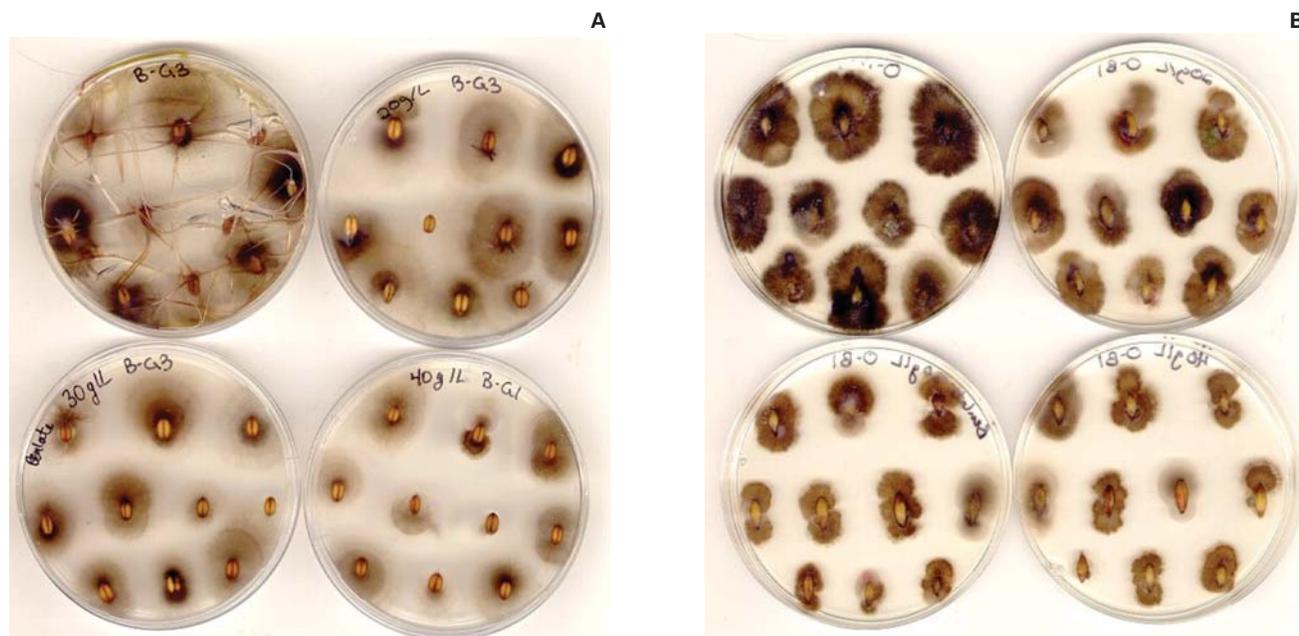


Figure 1. Effet du NaCl à différentes concentrations (0, 20, 30 et 40 g L⁻¹) sur le développement des colonies de *B. sorokiniana* et sur la germination de semences de blé (A) et d'orge (B). Partie B : Concentrations de NaCl dans le même ordre que pour la partie A. La forte contamination de l'orge a empêché toute germination.

Tableau 1. Analyse de variance des essais de doses de paraquat dans les milieux de culture.

Source	Degré de liberté	Carré moyen	Valeur de F	Carré moyen	Valeur de F	Carré moyen	Valeur de F
Effet de la concentration du paraquat sur les <i>Fusarium</i> et la germination (Fig. 2)							
		Détection des <i>Fusarium</i>		Germination totale		Germination nuisible	
Lot	3	1,749	50,68 **	1,274	50,44 **	0,255	9,33 **
Dose	4	0,075	2,11	1,219	71,18 **	0,920	51,81 **
Lot * Dose	12	0,025	0,69	0,136	7,92 **	0,142	8,01 **
Erreur	48	0,036	---	0,017	---	0,018	---
Effet de la concentration du paraquat sur les <i>Fusarium</i> et la germination (Fig. 3)							
		Détection des <i>Fusarium</i>		Germination totale		Germination nuisible	
Lot	8	0,962	24,30 **	1,087	30,04 **	0,377	18,69 **
Dose	1	0,003	0,12	2,317	82,05 **	6,944	360,96 **
Lot * Dose	8	0,015	0,63	0,088	3,12 **	0,374	19,46 **
Erreur	36	0,024	---	0,028	---	0,019	---
Effet de la concentration du paraquat sur les <i>Fusarium</i> et la germination (Fig. 4)							
		Détection des <i>Fusarium</i>		Germination totale		Germination nuisible	
Lot	8	1,080	37,79 **	0,690	28,59 **	0,338	17,26 **
Dose	1	0,015	0,54	3,984	212,35 **	6,817	372,57 **
Lot * Dose	8	0,023	0,83	0,080	4,26 **	0,218	11,93 **
Erreur	36	0,028	---	0,019	---	0,018	---
Effet de la concentration du paraquat sur le <i>Bipolaris</i> et la germination (Fig. 6)							
		Détection des <i>Bipolaris</i>		Germination totale		Germination nuisible	
Lot	8	0,612	13,17 **	0,261	23,41 **	0,213	18,95 **
Dose	1	0,027	0,85	3,439	331,78 **	2,827	274,15 **
Lot * Dose	8	0,020	0,63	0,261	25,16 **	0,213	20,62 **
Erreur	36	0,032	---	0,010	---	0,010	---

** La différence est significative à $P < 0,01$.

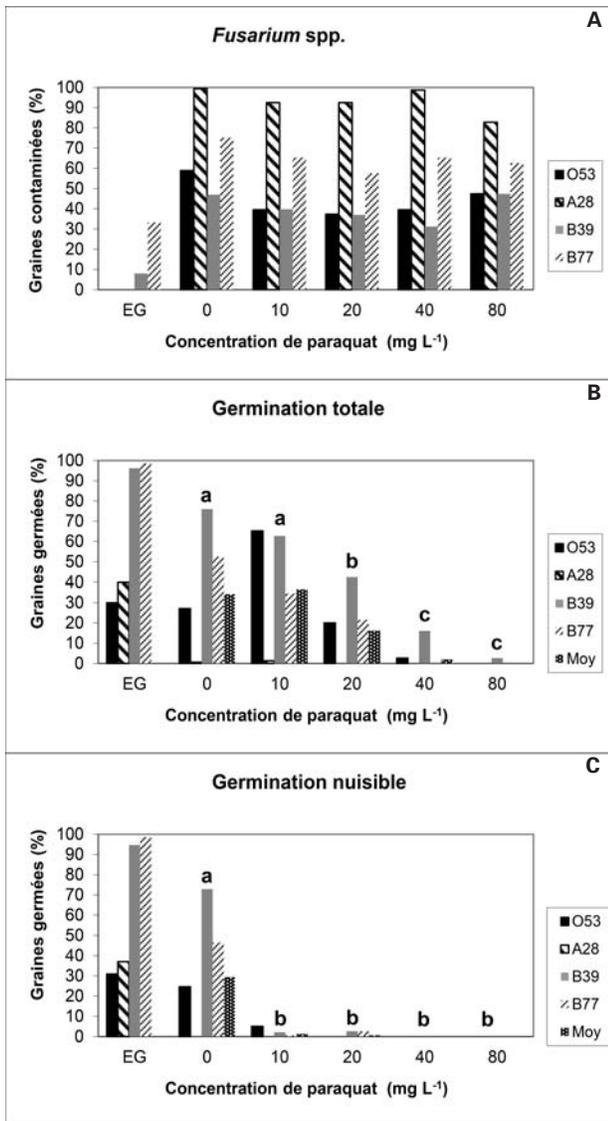


Figure 2. Effet de la concentration de paraquat dans le milieu peptone-PCNB sur la détection des *Fusarium* spp. (A), sur la germination totale (B) et sur la germination nuisible (C) de semences d'orge (O53), d'avoine (A28) et de blé (B39 et B77). Pour chaque graphique, les colonnes surmontées de la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de LSD à $P < 0,05$. EG = milieu « eau gélosée ».

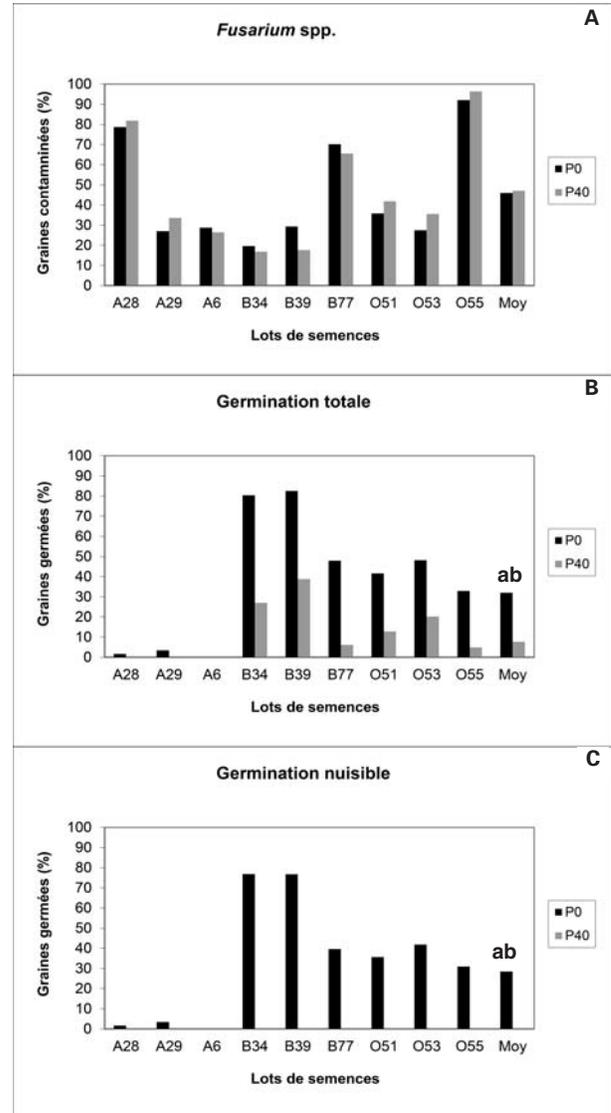
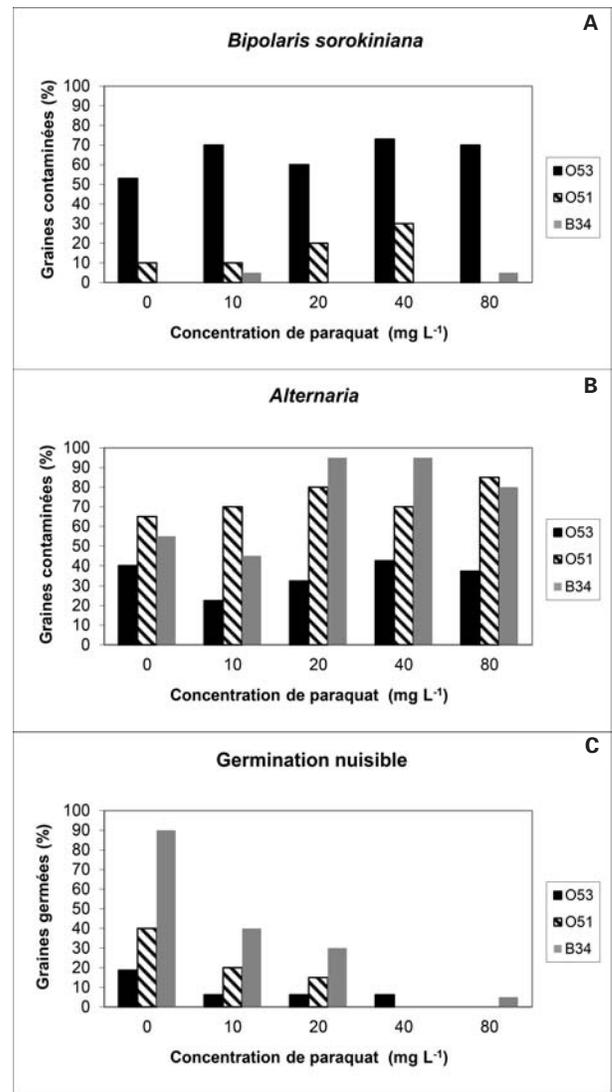
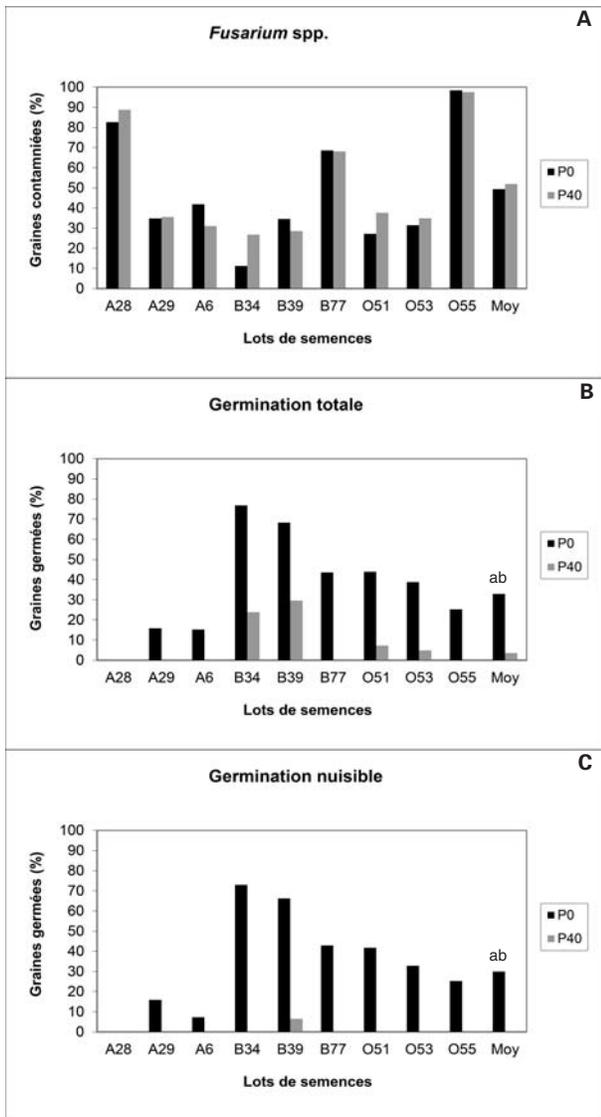


Figure 3. Effet de l'ajout du paraquat (40 mg L⁻¹) au milieu peptone-PCNB sur la détection des *Fusarium* spp. (A), sur la germination totale (B) et sur la germination nuisible (C) de semences d'avoine (A28, A29, A6), de blé (B34, B39, B77) et d'orge (O51, O53, O55). Essai 1. Pour chaque graphique, les colonnes des moyennes (Moy.) surmontées de la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de LSD à $P < 0,05$.



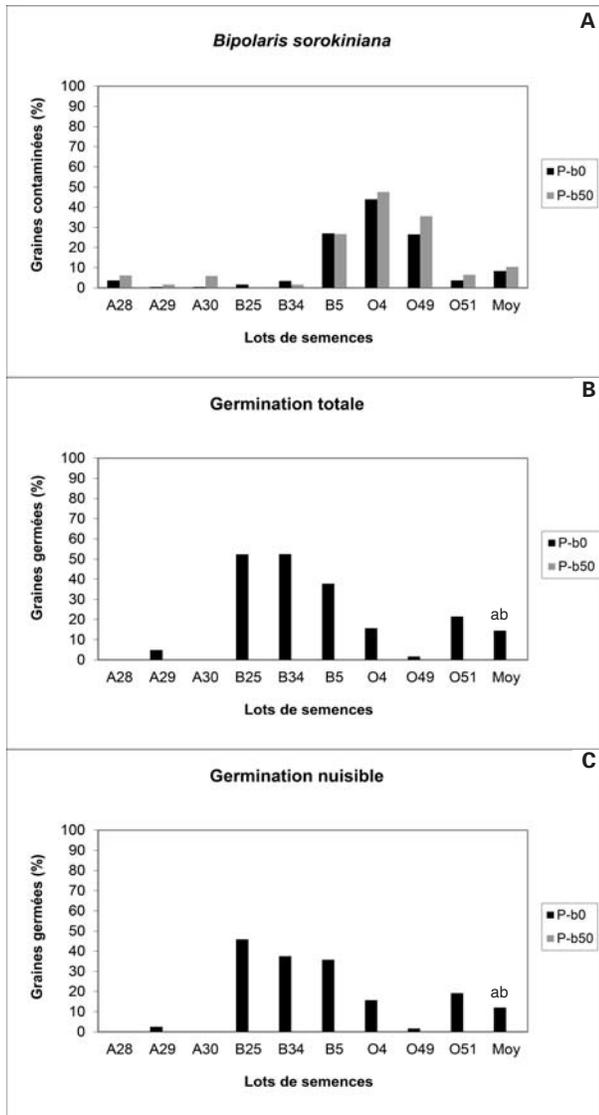


Figure 6. Effet de l'ajout du paraquat (50 mg L^{-1} , P-b50) au milieu PDA-bénomyl (P-b0) sur la détection du *B. sorokiniana* (A), sur la germination totale (B) et sur la germination nuisible (C) de semences d'avoine (A28, A29, A30), de blé (B25, B34, B5) et d'orge (O4, O49, O51). Pour chaque graphique, les colonnes des moyennes (Moy.) surmontées de la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de LSD à $P < 0,05$.

Lors des deux essais de validation de la dose (Tableau 1 et Figs. 3A et 4A) chez neuf lots de semences, l'ajout du paraquat n'a pas affecté la récupération des *Fusarium* alors que la germination nuisible a été presque complètement éliminée pour tous les lots (Figs. 3C et 4C). L'amorce de germination chez certains lots, représentée par la germination totale (Figs. 3B et 4B), montre que le paraquat n'a pas complètement inhibé la germination, mais qu'il l'a suffisamment réduite pour la rendre non nuisible. Pour les deux types de germination, il existe une interaction entre les milieux et les lots de semences (Tableau 1, sections sur Figs. 3 et 4). Étant donné la grande différence entre la valeur de F de l'interaction et l'effet des milieux (doses), nous avons jugé inutile de faire une analyse statistique plus poussée. On peut supposer que cette interaction a été provoquée par les trois lots dont les deux types de germination étaient déjà presque nuls sur le milieu sans herbicide (Figs. 3A, 3B, 4A et 4B). Les analyses de l'état sanitaire montrent aussi que les lots de semences étaient contaminés à des degrés différents par les *Fusarium* (Figs. 3A et 4A). Le développement des levures autour des graines a aussi été réduit par l'herbicide. Pour les 450 graines analysées sur chacun des deux milieux de culture, la proportion de graines présentant une croissance de levure est passée de 18 % à 9 % avec l'ajout d'herbicide dans le premier essai, et de 21 % à 5 % dans le deuxième essai (résultats non présentés). L'inhibition des levures est un avantage pour la détection des champignons pathogènes, car elles retardent le développement de leur mycélium.

Ces deux essais confirment que le milieu de culture peptone-PCNB amélioré par l'ajout de paraquat à 40 mg L^{-1} est plus efficace et plus facile à utiliser que le même milieu sans paraquat pour déterminer la proportion de graines contaminées par des *Fusarium* spp.

Utilisation du paraquat pour la détection du *Bipolaris sorokiniana* et des *Alternaria* spp. sur milieu PDA-bénomyl

Chez les trois lots de semences, aucune dose de paraquat n'a affecté la détection du *B. sorokiniana* et de l'*Alternaria* (Fig. 5A, B) alors que la germination nuisible a été réduite à un niveau négligeable à partir de 40 mg L^{-1} (Fig. 5C). Aucune analyse statistique n'a été effectuée, car les résultats ont permis de faire ressortir facilement une dose de paraquat qui se démarquait. Comme aucune réduction de croissance n'a été observée chez le *Bipolaris* à la plus forte dose de paraquat et que seulement quelques graines ont réussi à germer à 40 mg L^{-1} , nous avons convenu que la dose de 50 mg L^{-1} était adéquate pour réduire à un seuil acceptable la germination nuisible des deux céréales testées sans affecter la détection du *B. sorokiniana*. De plus, l'absence d'inhibition observée chez l'*Alternaria* à toutes les doses de paraquat constitue un avantage supplémentaire de ce milieu puisqu'une simple observation à la loupe binoculaire suffit à le distinguer facilement du *Bipolaris*.

L'analyse de variance de l'essai de validation du PDA-bénomyl avec le paraquat à 50 mg L^{-1} sur neuf lots de semences montre que l'ajout de l'herbicide n'a pas nui à la détection du *Bipolaris* (Tableau 1 et

Fig. 6A). La germination totale et la germination nuisible ont été complètement inhibées (Fig. 6B, C). Pour les deux types de germination, il existe une interaction entre les milieux et les lots de semences (Tableau 1). Étant donné la grande différence entre la valeur de F de l'interaction et l'effet des milieux (doses), nous avons encore une fois jugé inutile de faire une analyse statistique plus poussée. On peut supposer que cette interaction a été provoquée par les lots dont la germination était déjà nulle sur le milieu sans herbicide.

Durant ces essais, nous avons remarqué que les spores de *Bipolaris* produites sur le milieu PDA-bénomyl avec ou sans paraquat étaient plus ovales que celles produites sur les milieux non sélectifs habituellement utilisés pour ce champignon. Cette particularité n'empêche toutefois pas de le reconnaître facilement.

Lors d'un essai comparatif entre le PDA-bénomyl avec et sans paraquat effectué avec 13 lots de semences, le développement du *Rhizopus* spp. a entraîné le rejet de 8 des 65 boîtes de Petri sur le milieu de base, alors qu'aucune boîte du milieu amendé avec le paraquat n'a été rejetée à cause de ce contaminant (résultats non présentés). Le rejet des boîtes de Petri entraîne une perte de précision des analyses de contamination. L'effet inhibiteur du paraquat sur le *Rhizopus* était déjà connu (Wilkinson et Lucas 1969a, 1969b); toutefois, à notre connaissance, cet herbicide n'a jamais été utilisé pour faciliter la détection des champignons dans les semences. L'inhibition du *Rhizopus* constitue donc un avantage additionnel de l'ajout de cet herbicide.

Le remplacement de la congélation sur buvard par des méthodes sans congélation pourrait être utile pour les pays en voie de développement étant donné la rareté des congélateurs dans les laboratoires d'analyse de semence (Bimaldeep 2010; Shetty et Shetty 1988). Le temps de travail requis pour exécuter l'étape de la congélation est un autre inconvénient de cette méthode (Machado *et al.* 2004). De plus, les milieux de culture sélectifs semblent plus fiables que les méthodes sur papier buvard pour récupérer des champignons (Narayanasamy 2011), alors que les milieux gélosés sont parfois plus sensibles pour détecter certains champignons (Gutiérrez *et al.* 2010). Des milieux sélectifs qui empêchent également la germination pourraient donc avoir leur utilité pour l'analyse de l'état sanitaire des semences.

L'approche mise au point dans la présente recherche qui consiste à ajouter l'herbicide paraquat pour empêcher la germination des semences de céréales lors des tests pour détecter les *Fusarium* spp. et le *Bipolaris* dans les semences facilite de beaucoup la lecture des résultats et constitue une nette amélioration par rapport aux milieux de base. Ces milieux modifiés semblent répondre à un besoin dans le domaine de l'analyse des semences. La diminution de la concentration d'agar dans ces milieux gélosés constitue aussi une amélioration importante puisqu'elle facilite le placement des graines, évite le fendillement de la gélose et permet de maintenir les graines en place durant l'incubation. Ces nouvelles compositions de milieux de culture peuvent donc être utilisées avantageusement pour

évaluer l'état sanitaire des semences de céréales. Nous avons par ailleurs constaté que ces milieux pouvaient aussi convenir pour analyser l'état sanitaire de semences traitées avec des fongicides.

REMERCIEMENTS

Nous remercions Lucie Lévesque, Kathie Lavoie et Richard Lemay pour leur excellente assistance technique. Nous soulignons également le travail de laboratoire réalisé par Marie-Ève Collin, Gabrielle Petitclerc et Maude St-Onge lors de leurs stages techniques au sein de notre équipe. Nous remercions aussi les Drs Christine Juge et Roger Lalonde pour leurs commentaires avisés lors de la révision de ce manuscrit ainsi que Bernard Gagnon pour ses précieux conseils sur la préparation des analyses statistiques.

RÉFÉRENCES

- Åkerstrand, K. 1992. Influence of medium on grain mycoflora observed by direct plating. Pages 341-343 in R.A. Samson, A.D. Hocking, J.I. Pitt et A.D. King (eds.), Modern methods in food mycology. Proceedings of the Second International Workshop on Standardisation of Methods for the Mycological Examination of Foods, August 20-24, 1990, Baarn, The Netherlands.
- Bailey, K.L., L. Couture, B.D. Gossen, R.K. Gugel et R.A.A. Morrill. 2004. Maladies des grandes cultures au Canada. Société canadienne de phytopathologie, Winnipeg, Canada.
- Bever, W.M., et F.W. Slife. 1948. Effect of 2,4-D in culture medium on the growth of three pathogenic fungi. *Phytopathology* 38 : 1037-1038.
- Bimaldeep, K. 2010. Development and evaluation of methods for the detection of seed borne fungi in rice. *Int. J. Educ. Admin.* 2 : 123-130.
- Celano, M.M., J.C. Machado, D.S. Jaccoud-Filho et R.M. Guimarães. 2004. Potentiality of the water restriction technique in health testing and in studies on the interaction of *Bipolaris sorokiniana* and wheat seeds. Page 107 in 27th International Seed Testing Association Congress – Seed Symposium, Budapest, Hungary, May 17-19 2004. International Seed Testing Association, Basserdorf, Switzerland.
- Cerkauskas, R.F., et J.B. Sinclair. 1980. Use of paraquat to aid detection of fungi in soybean tissues. *Phytopathology* 70 : 1036-1038.
- Champion, R. 1997. Identifier les champignons transmis par les semences. Institut national de la recherche agronomique, Paris, France.
- Christensen, J.J., et E.C. Stakman. 1935. Relation of *Fusarium* and *Helminthosporium* in barley seed to seedling blight and yield. *Phytopathology* 25 : 309-327.
- Edgington, L.V., K.L. Khew et G.L. Barron. 1971. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. *Phytopathology* 61 : 42-44.
- Elwy, E.E.A., M. Osman, T.M.A. Abdel Rahman et I.M.K. Ismail. 1989. Effect of the triazine herbicides Goltix and Igran on germination and growth of *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium oxysporum*, *Helminthosporium oryzae*, and *Verticillium agaricinum*. *Can. J. Bot.* 67 : 737-741.
- Fakhrunnisa, M.H.H., et A. Ghaffar. 2006. Seed-borne mycoflora of wheat, sorghum and barley. *Pakistan J. Bot.* 38 : 185-192.
- Gindrat, D., et R. Pezet. 1994. Le paraquat, un outil pour la révélation rapide d'infections fongiques latentes et de champignons endophytes. *J. Phytopathol.* 141 : 86-98.

- Gutiérrez, S.A., M.A. Carmona et E.M. Reis. 2010.** Methods for detection of *Alternaria padwickii* in rice seeds. *J. Phytopathol.* 158: 523-526.
- Hagborg, W.A.F., G.M. Warner et N.A. Phillips. 1950.** Use of 2,4-D as an inhibitor of germination in routine examinations of beans for seed-borne infection. *Science* 111 : 91.
- Hajihassani, M., A. Hajihassani et S. Khaghani. 2012.** Incidence and distribution of seed-borne fungi associated with wheat in Markazi Province, Iran. *Afr. J. Biotech.* 11 : 6290-6295.
- Hervieux, V., E.S. Yaganza, J. Arul et R.J. Tweddell. 2002.** Effect of organic and inorganic salts on the development of *Helminthosporium solani*, the causal agent of potato silver scurf. *Plant Dis.* 86 : 1014-1018.
- Hsia, Y.-T., et J.J. Christensen. 1951.** Effect of 2,4-D on seedling blight of wheat caused by *Helminthosporium sativum*. *Phytopathology* 41: 1011-1020.
- Jeffery, S., et L.W. Burgess. 1990.** Growth of *Fusarium graminearum* Schwabe group 1 on media amended with atrazine, chlorsulfuron or glyphosate in relation to temperature and osmotic potential. *Soil Biol. Biochem.* 22 : 665-670.
- Limonard, T. 1966.** A modified blotter test for seed health. *Neth. J. Plant Pathol.* 72 : 319-321.
- Limonard, T. 1968.** Ecological aspects of seed health testing. *Proc. Int. Seed Test. Ass.* 33 : 343-513.
- Machado, J.C., W.M. Coutinho, R.M. Guimarães, M.G.G.C. Vieira et D.F. Ferreira. 2008.** Use of osmotic solutes to control seed germination of rice and common bean in seed health blotter tests. *Seed Sci. Technol.* 36 : 66-75.
- Machado, J.C., R.M. Guimaraes, M.G.G.C. Vieira, R.M. Souza et E.A. Pozza. 2004.** Use of water restriction technique in seed pathology. *Seed Testing Int.* 128 : 14-18.
- Mathur, S.B., et O. Kongsdal. 2003.** Common laboratory seed health testing methods for detecting fungi. Danish Government Institute of Seed Pathology for Developing Countries. International Seed Testing Association, Bassersdorf, Switzerland.
- Mertely, J.C., et D.E. Legard. 2004.** Detection, isolation, and pathogenicity of *Colletotrichum* spp. from strawberry petioles. *Plant Dis.* 88 : 407-412.
- Mobasser, S., M.R. Jazayeri, F. Khazaei et L. Sadeghi. 2012.** Wheat seed contamination with seed-borne diseases in cold climatic zone of Iran. *Int. J. Plant Product.* 6 : 337-352.
- Narayanasamy, P. 2011.** Detection of fungal pathogens in plants. Pages 5-199 in *Microbial plant pathogens-detection and disease diagnosis*, Vol. 1: Fungal pathogens. Springer, London, UK.
- Neergaard, P. 1979.** Seed pathology. 2 Vols. Macmillan Press Ltd., London, UK.
- Pakdaman, B.S., H. Khabbaz, E.M. Goltapeh et H.A. Afshari. 2002.** In vitro studies on the effects of sugar beet fields prevalent herbicides on the beneficial and deleterious fungal species. *Pakistan J. Plant Pathol.* 1 : 23-24.
- Papavizas, G.C. 1967.** Evaluation of various media and antimicrobial agents for isolation of *Fusarium* from soils. *Phytopathology* 57 : 848-852.
- Pouleur, S., et L. Couture. 2009.** Utilisation de l'herbicide paraquat pour faciliter la détection du *Bipolaris sorokiniana* et des *Fusarium* spp. dans les semences de céréales. *Phytoprotection* 90 : 75.
- Praveena, R., A. Naseema et S. George. 2007.** Effect of herbicides on *Fusarium pallidoroseum* – a potential biocontrol agent of water hyacinth [*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms]. *J. Trop. Agric.* 45 : 55-57.
- Richardson, L.T. 1970.** Effects of atrazine on growth response of soil fungi. *Can. J. Plant. Sci.* 50 : 594-596.
- Scardaci, S.C., et R.K. Webster. 1981.** Antagonism between the cereal root rot pathogens *Fusarium graminearum* and *Bipolaris sorokiniana*. *Plant Dis.* 65 : 965-967.
- Shetty, S.A., et H.S. Shetty. 1988.** Development and evaluation of methods for the detection of seed-borne fungi in rice. *Seed Sci. Technol.* 16 : 693-698.
- Stack, R.W. 1977.** A simple selective medium for isolation of *Cochliobolus sativus* from diseased cereal crowns and roots. *Plant Dis. Rep.* 61 : 521-522.
- Szopińska, D., K. Tylkowska, C.H.J. Deng et Y. Gao. 2012.** Comparison of modified blotter and agar incubation methods for detecting fungi in *Zinnia elegans* seeds. *Seed Sci. Technol.* 40 : 32-42.
- Tan, W.Z., Q.J. Li et L. Qing. 2002.** Biological control of alligatorweed (*Alternanthera philoxeroides*) with a *Fusarium* sp. *BioControl* 47 : 463-479.
- Tekle, S., H. Skinnes et Å. Bjørnstad. 2013.** The germination problem of oat seed lots affected by *Fusarium* head blight. *Eur. J. Plant Pathol.* 135 : 147-158.
- Wilkinson, V., et R.L. Lucas. 1969a.** Effects of herbicides on the growth of soil fungi. *New Phytol.* 68 : 709-719.
- Wilkinson, V., et R.L. Lucas. 1969b.** 'Gramoxone' W: its effects on spores and mycelia of *Rhizopus stolonifer*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 53 : 297-299.
- Yildiz, M., et E. Kasap. 2007.** Comparison of germination responses of cultivated wheat (*Triticum*) and its wild relative (*Aegilops*) species under salinity, temperature and light. *Acta Agron. Hung.* 55 : 407-415.
- Young, F.L., D.R. Gealy et L.A. Morrow. 1984.** Effect of herbicides on germination and growth of four grass weeds. *Weed Sci.* 32 : 489-493.