

Lutte alternative contre la moisissure des neiges (*Microdochium nivale*) dans le blé biologique

Heinz Krebs¹, Irene Bänziger¹, Robert J. Legro² et Susanne Vogelgsang¹

¹Station de recherche Agroscope Reckenholz-Tänikon ART, 8046 Zurich

²Incotec Holding BV, 1601BL Enkhuizen, Pays-Bas

Renseignements: Susanne Vogelgsang, e-mail: susanne.vogelgsang@art.admin.ch, tél. +41 44 377 72 29



Figure 1 | Infestation des grains par *Microdochium nivale*. Cet agent pathogène affecte la faculté germinative et par conséquent la qualité en cas d'utilisation comme semences. Gauche: grain sain; tous les autres: infectés. (Photo: ART)

Introduction

L'agent pathogène de la moisissure des neiges *Monographella nivalis* (anamorphe *Microdochium nivale*, *M. majus*) est très répandu dans les régions de cultures céréalières (Hoffmann et Schmutterer 1999) et fait partie des principaux pathogènes des semences rencontrés lors de la certification de ces dernières. Les semences contaminées ont une faculté germinative réduite. Après la levée, cela se traduit par des zones lacunaires dans les cultures, soit parce que les semences n'ont pas germé, soit parce que les plantules ont été trop faibles pour atteindre la surface du sol. De plus, les plantules malades sont raccourcies et rabougries (fig. 1); elles présentent

des colorations brunes à la base de la coléoptile. Dans les zones de cultures marquées par de fortes précipitations en été – notamment dans les parcelles de blé attaquées par l'oïdium ou la criocère des céréales – des nécroses de *M. nivale* sont observées sur la gaine foliaire et le limbe (fig. 2), ce qui peut affecter considérablement la surface d'assimilation et donc le rendement. Des peuplements de céréales raccourcis et à la végétation abondante favorisent le développement de l'agent pathogène. Les feuilles et les épis sont infestés par des ascospores véhiculées par le vent, qui se forment en périthèces sur la face inférieure des gaines foliaires, ou par des conidiospores disséminés par la pluie (Obst 1993). Des études sur la certification des semences ont montré que sur plu-



Figure 2 | Importantes lésions des feuilles de blé dues à *Microdochium nivale* dans du blé d'automne Siala en 2007. (Photo: ART)

sieurs années, la raison la plus fréquente des refus a été l'infestation par *M. nivale*.

Pour la production des semences biologiques, il est interdit d'utiliser des fongicides synthétiques. Le traitement à l'eau chaude (45 °C, 2 h) qui a donné de bons résultats contre *M. nivale*, contre le charbon et la carie du blé (Winter *et al.* 1998) ne s'est pas imposé dans la pratique en raison des coûts trop élevés du séchage après le traitement. Le produit de désinfection biologique Cerall® (bactérie du sol *Pseudomonas chlororaphis*) n'a qu'un effet partiel contre l'infestation des semences par *M. nivale* (Johnsson *et al.* 1996). ART a étudié l'efficacité de substances végétales contre *M. nivale* dans le blé, afin de contrôler plus efficacement cet agent pathogène dans les semences biologiques.

Matériel et méthodes

Dans le cadre d'essais *in vitro*, les chercheurs ont étudié l'efficacité de quatre substances d'origine végétale contre *M. nivale*: *Matricaria chamomilla*, *Thymus vulgaris*, *Filipendula ulmaria* et un produit «B» qui n'est pas désigné plus explicitement.

Dans une première phase d'essai, des extraits aqueux ont été préparés à partir des substances végétales et leur effet a été testé sur la germination des spores de *M. nivale*. La souche monospore utilisée (0327a, enregistrée au *Centraal bureau voor Schimmelcultures, CBS Fungal Biodiversity Centre* sous CBS 121295) a été incubée sur milieu PDA avec de la streptomycine, pendant 6 à 7 jours entre 18 à 20° C et 12 h de lumière NUV. Afin de tester la fonction inhibitrice sur la germination des spores, une suspension de 33 000 spores/ml a été produite. >

Résumé

Lors des contrôles liés à la certification des semences, le blé biologique n'atteint souvent pas la faculté germinative nécessaire, généralement à cause d'une contamination trop importante par l'agent pathogène de la moisissure des neiges, *Microdochium nivale*. Un traitement à l'eau chaude pourrait permettre de lutter efficacement contre l'infestation des semences. Toutefois, ce procédé n'a pas pu s'imposer dans la pratique, car il entraîne des coûts élevés pour le séchage ultérieur. Le produit à base de bactéries Cerall® n'a qu'un effet partiel contre l'infestation des semences par *M. nivale*. Dans le cadre d'analyses de screening en laboratoire avec différents produits à base de végétaux, le produit «B» a eu un bon effet inhibiteur sur la croissance de mycélium de *M. nivale*. Plusieurs essais *in vivo* dans des chambres climatiques et en plein champ ont également confirmé l'effet significatif du traitement des semences avec la poudre du produit «B». Ce dernier a non seulement amélioré la levée des plantes, mais aussi réduit les pertes de rendement. L'enjeu consiste à développer la formule de manière à ce que le produit «B» puisse être employé dans les grandes installations d'enrobage.

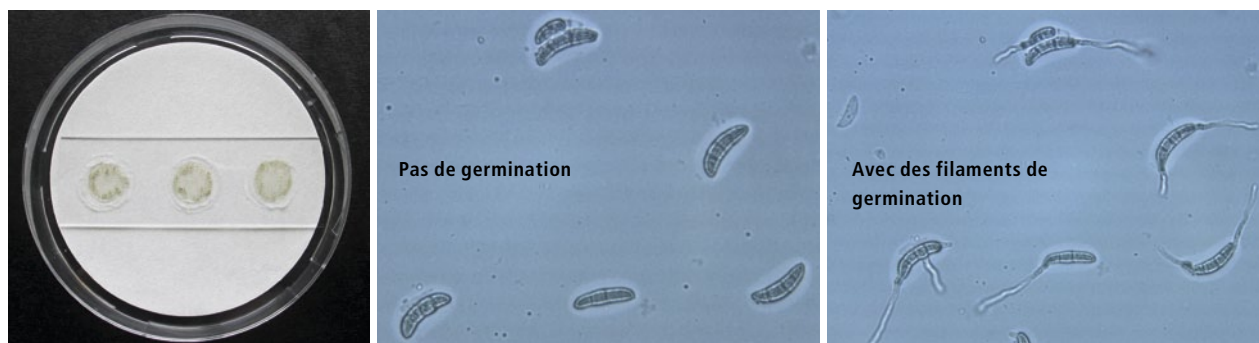


Figure 3 | Test de germination des spores: 15 μ l de substance à tester sont déposés sur chaque rondelle. Après une courte phase de séchage, on ajoute 15 μ l de suspension à base de spores de *Microdochium nivale*. Le taux de germination des spores est déterminé après 24 h (agrandissement 400 fois). (Photos: ART)

Les extraits ont été préparés en mélangeant 10 g de poudre végétale dans 100 ml d'eau déionisée pendant 3 heures à température ambiante. Les suspensions aqueuses ont ensuite été passées dans des filtres plissés (520 A $\frac{1}{2}$, d = 15 cm, Schleicher & Schuell GmbH) et leur fonction inhibitrice sur la germination des spores a été testée aux concentrations de 1 %, 0,5 % et 0,1 %. Le procédé comparatif par traitement chimique avec Pronto Plus® a été appliqué au dosage de 0,035 %.

Des gouttes des extraits à tester (15 μ l) ont été déposées sur trois rondelles d'agar (d = 1 cm) placées sur des lamelles porte-objet – dans le procédé témoin, 15 μ l d'eau stérile ont été utilisés.

Les lamelles porte-objet ont ensuite été placées dans des boîtes de Petri sur du papier filtre humidifié avec 2 ml d'eau stérile (n° 591, d = 85 mm de Schleicher &

Schuell GmbH; fig. 3). Puis, 15 μ l de suspension à base de spores ont été déposés à l'aide d'une pipette sur les rondelles sèches. Après une période d'incubation de 24 h à 10 °C, 70 % d'humidité relative et dans l'obscurité, le taux de germination de dix spores a été déterminé avec un agrandissement de 400 fois à trois endroits des rondelles.

Contrairement au test de germination des spores, dans le test de croissance du mycélium, c'est la poudre végétale qui a été examinée, et non ses extraits. Pour le milieu d'agar, 3,9 g de PDA ont été dissous dans 100 ml d'eau déionisée, dans des flacons Schott de 200 ml autoclavés à 121 °C pendant 20 minutes. Au sortir de l'autoclave, les flacons ont été plongés dans un bain d'eau chaude à 60 °C. Ensuite, 100 μ l de streptomycine et la quantité voulue de poudre à tester ont été ajoutés dans des conditions stériles. La suspension a finalement été versée dans cinq boîtes de Petri.

Après refroidissement ou solidification du milieu de culture (dans une banque stérile), une rondelle de 0,5 cm colonisée par *M. nivale* a été déposée au milieu des plaques. Après une période d'incubation de 7 jours à 20 °C et dans l'obscurité, la croissance du mycélium a été déterminée sur deux diamètres (fig. 4). L'effet inhibiteur a été calculé par comparaison avec la croissance sur les plaques témoins.

Le produit «B» – le plus efficace des essais *in vitro* – a ensuite été appliqué *in vivo* sur des semences infestées par *M. nivale* dans un mélangeur Turbula® – (Willy A. Bachofen AG, Muttenz) et semé dans des bacs de semences. Les essais préliminaires ont montré qu'une application de poudre (2 g/100 g de semences) pouvait avoir un effet plus important qu'un traitement des semences avec l'extrait. L'adhésif employé – Organic Binder (A6.6041; OB) de l'entreprise Incotec – a été appliqué seul et en combinaison avec le produit «B». L'adhésif a été utilisé soit avant et après l'application de la poudre

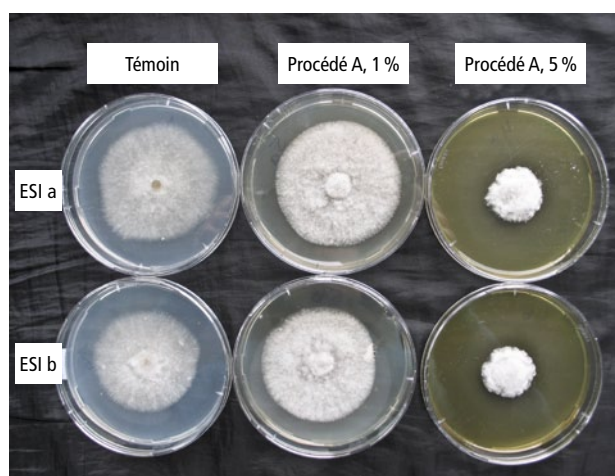


Figure 4 | Test d'incorporation dans l'agar effectué lors des essais préliminaires: inhibition du mycélium de *Microdochium nivale* en fonction de la concentration de la substance à tester mélangée au milieu de culture. ESI a et ESI b: Souches de spores spécifiques a et b. (Photo: ART)

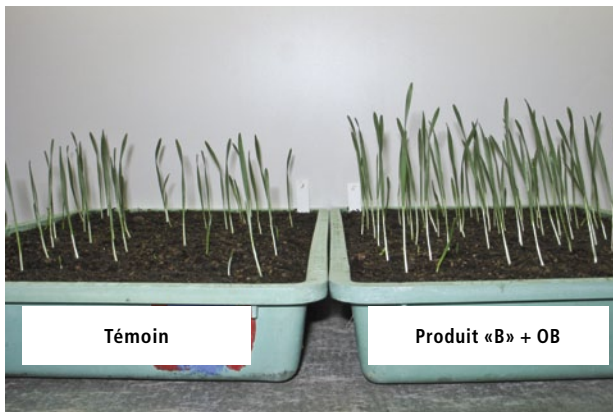


Figure 5 | Essais en chambre climatique: essai de semis avec des semences de blé infectées par *Microdochium nivale*. Produit «B» + OB: 2 g/100 g de semences + adhésif Organic binder (Incotec). (Photo: ART)

(enrobage) à une concentration de 50 %, soit en suspension – mélange de OB (40 %) et de poudre à tester. Les essais *in vivo* ont également permis de tester les traitements de semences de l'entreprise Incotec : le procédé avec l'adhésif (IncOB) à une concentration de 50 % et le procédé avec cet adhésif (50 %) combiné au produit «B». Deux autres procédés ont également été testés: un traitement à l'eau chaude et un traitement à base de Cerall®. Les bacs de semences ont d'abord été incubés pendant trois semaines dans des chambres climatiques à 5 °C, dans l'obscurité et avec une humidité de l'air élevée. Ils ont ensuite été exposés à la lumière blanche pendant deux autres semaines à 10 °C. A ce stade, les chercheurs ont déterminé le nombre de plantules dont le développement était normal ou anormal (fig. 5). Chaque procédé d'essai a été testé dans trois bacs de semences contenant 100 graines chacun.

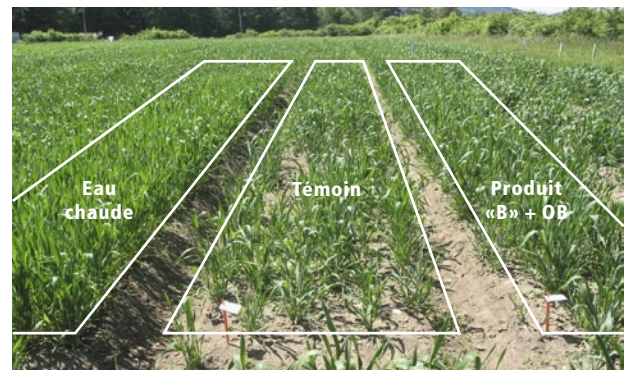


Figure 6 | Essai en plein champ sur de petites parcelles avec des semences de blé infectées par *Microdochium nivale* et différents traitements des semences: eau chaude = 45 °C 2 h, produit «B» + OB: 2 g /100 g de semences + adhésif: Organic Binder (Incotec). (Photo: ART)

Les mêmes traitements de semences ont été testés dans les conditions de terrain sur des petites parcelles de 10 m² avec quatre répétitions (fig. 6). Les essais en plein champ se sont concentrés sur la levée et le rendement en grains. Pour les essais en chambre climatique et en plein champ, les chercheurs ont utilisé un lot de blé d'automne Siala infesté à 35 % par *M. nivale*.

Résultats et discussion

Le test de germination des spores a permis d'identifier un effet dépendant de la dose, surtout avec le procédé employant le produit «B» (fig. 7). Les essais d'incorporation dans l'agar ont également montré des différences significatives entre les procédés. Pour la croissance du mycélium, l'efficacité des quatre substances testées dépendait du dosage (fig. 8). Comme

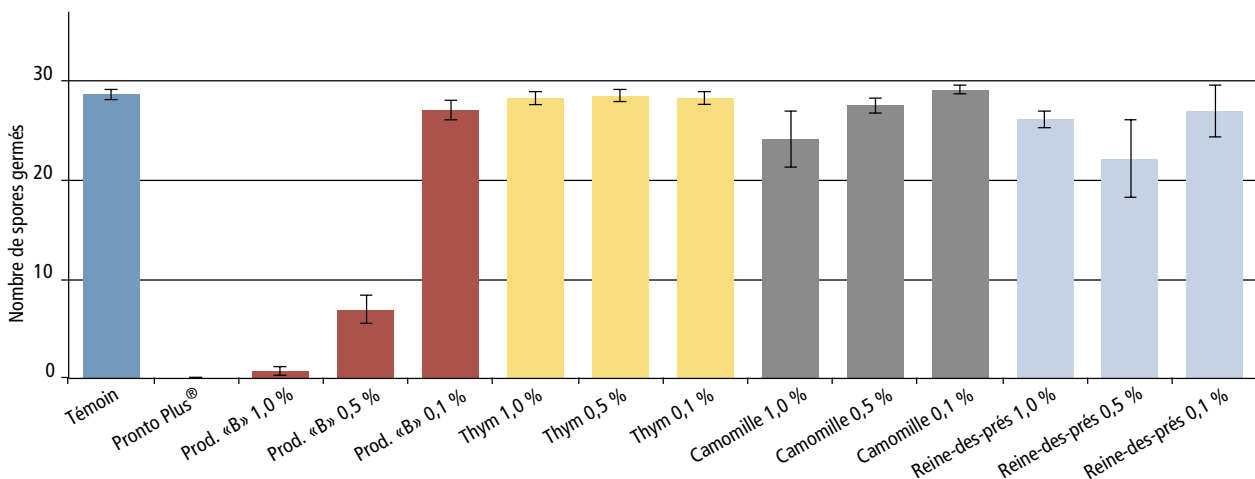


Figure 7 | Test de germination des spores: influence des extraits végétaux sur la germination de *Microdochium nivale*. Moyennes avec écarts-types.

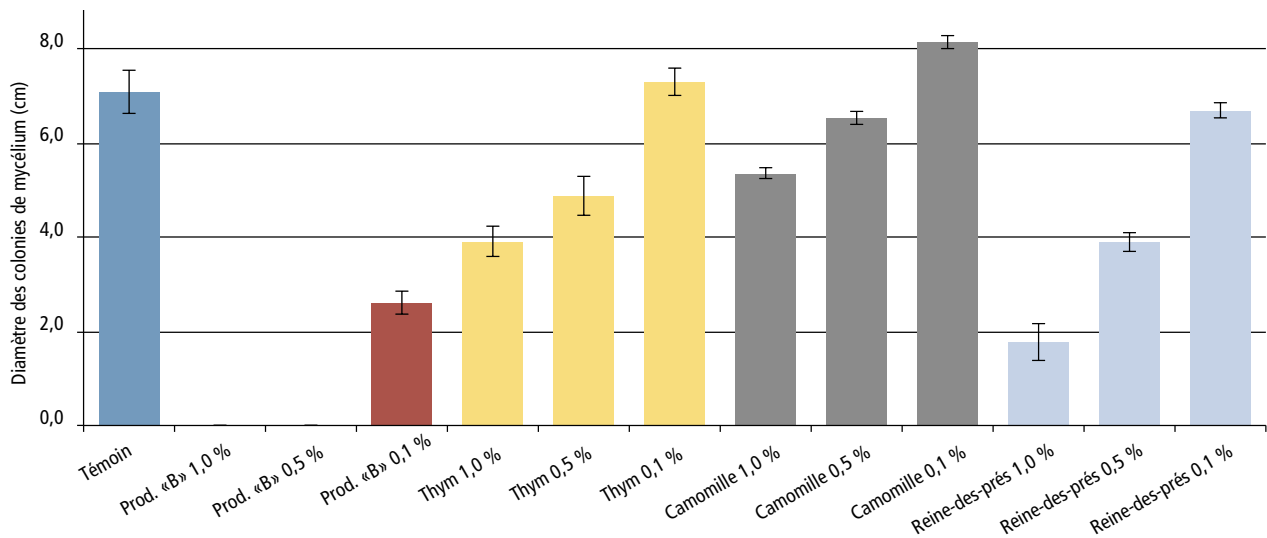


Figure 8 | Test de la croissance de mycélium (incorporation dans un milieu d'agar): influence de la poudre végétale sur la croissance de mycélium de *Microdochium nivale*. Moyennes avec écarts-types.

pour le test de germination des spores, c'est le produit «B» qui a exercé l'effet inhibiteur le plus important, et ce avec des dosages inférieurs à ceux des autres substances.

Dans l'essai de semis en chambre climatique, le nombre de plantes a presque doublé avec le procédé à eau chaude par rapport au témoin non traité et il a augmenté de 22 à 29 % avec le traitement au Cerall®. Dans les variantes avec le produit «B», la levée des plantes a été améliorée de 30 à 58 % (fig. 9).

Dans l'essai 2009 en plein champ, l'infestation des semences par *M. nivale* a eu des répercussions très mar-

quées. Des différences massives ont par exemple été observées entre les procédés (fig. 10) au niveau de la levée au champ. Le tallage a légèrement atténué les densités de peuplements dans les différentes variantes. Malgré tout, les différences de traitement étaient significatives pour le rendement en grains (fig. 11), sachant qu'ici aussi, la variante eau chaude a eu l'effet le plus important, avec 63 kg/a par rapport à la variante témoin (31 kg/a). La désinfection à base de Cerall® a permis d'obtenir un rendement de 36 kg/a et les variantes de traitement avec le produit «B» ont permis d'atteindre des rendements entre 41 et 44 kg/a.

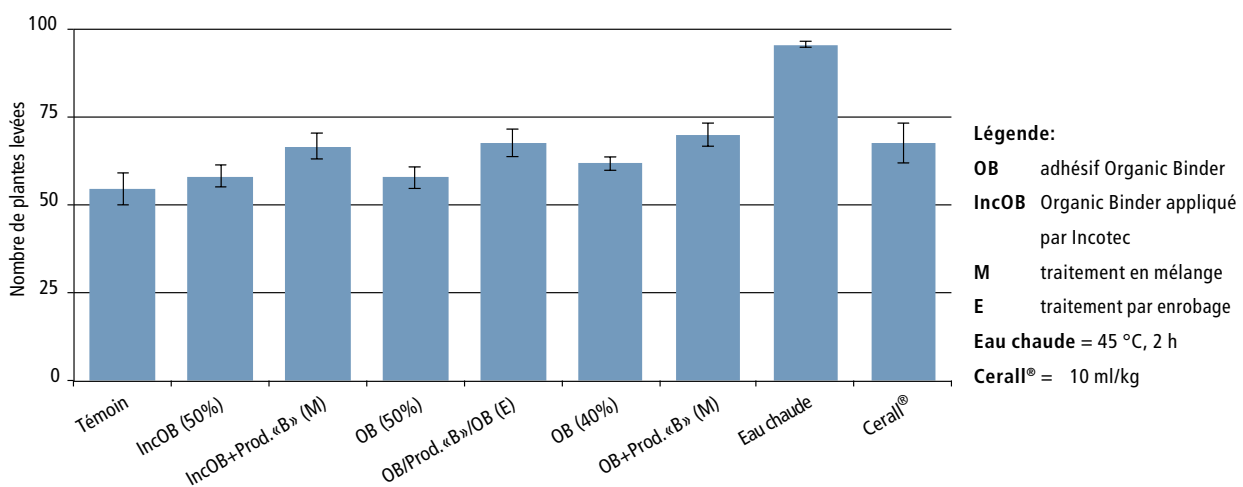


Figure 9 | Effet du produit «B» sur les semences de blé infestées par *Microdochium nivale* dans un essai de semis en chambre climatique: moyennes des plantes levées et écart-type de deux essais avec trois répétitions comprenant chacune 100 graines.

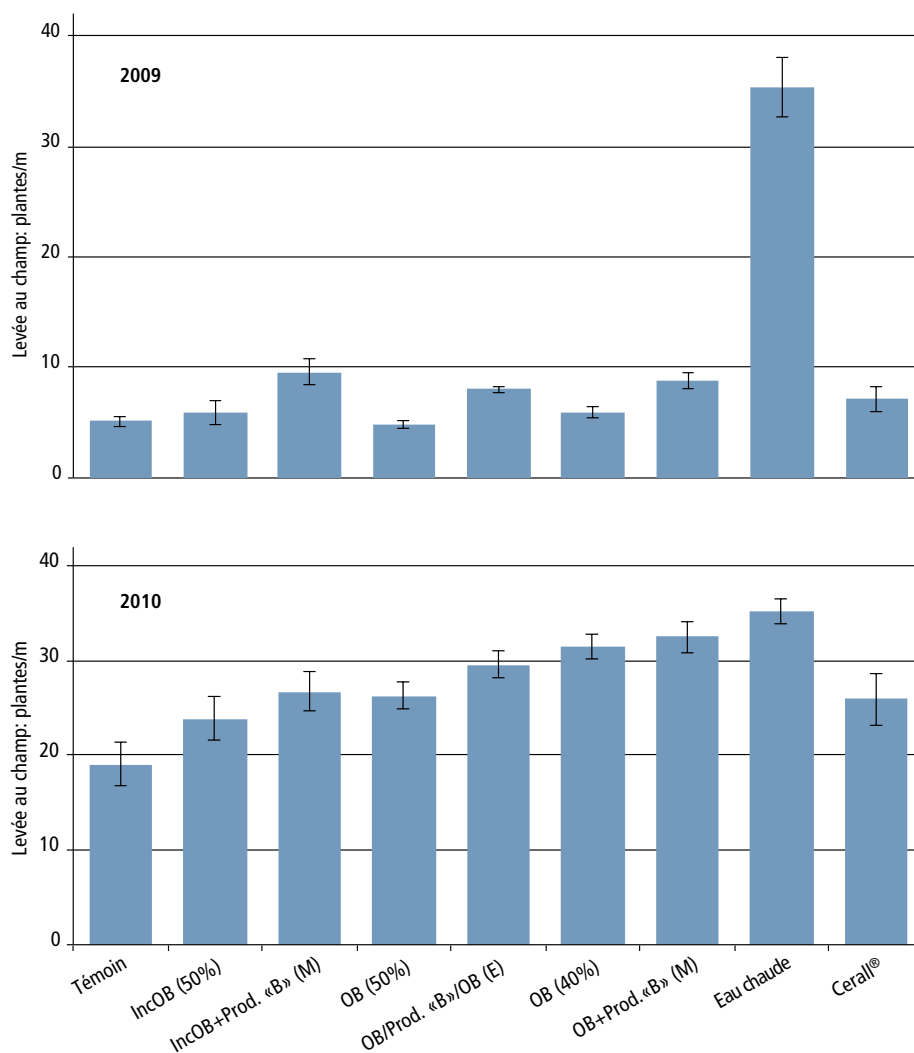


Figure 10 | Effet du produit «B» sur les semences de blé contaminées par *Microdochium nivale* dans les essais en plein champ des années 2009 (semis 10.11.2008) et 2010 (semis: 21.10.2009). Levée au champ: plantes par mètre courant. Moyennes et écart-types de quatre répétitions. Description du procédé (cf. fig. 9).

Dans l'essai en plein champ 2010, la levée des plantes et le rendement étaient en général nettement meilleurs et les différences moins marquées entre les procédés. Les meilleures variantes de traitements avec le produit «B» ont été presque aussi efficaces que le traitement à l'eau chaude (fig. 10 et 11) et à nouveau plus efficaces que la désinfection à base de Cerall®. Ces bons résultats sont en partie dus aux conditions de levée plus favorables, car cet essai a été semé trois semaines plus tôt que l'année précédente. D'autres études ont montré que les effets négatifs de l'infestation des semences par *M. nivale* sont moindres lorsque la levée a lieu par températures élevées que par basses températures (Haigh *et al.* 2008).

Dans les variantes de traitement avec le produit «B», aucune différence n'a été relevée entre les différentes applications de l'adhésif. Une application séparée de l'adhésif et du produit «B» en poudre (enrobage) ne s'est pas avérée plus avantageuse que l'application de la suspension composée du mélange de l'adhésif et du produit «B». Dans l'essai 2010 en plein champ, une levée significativement meilleure et un rendement plus élevé ont été observés par rapport à l'essai de 2009, même avec les variantes à base de l'adhésif sans produit «B». Ces résultats pourraient être attribués au «priming» dû à l'absorption d'humidité par les semences. C'est la raison pour laquelle l'essai en plein champ sera réalisé une autre fois.

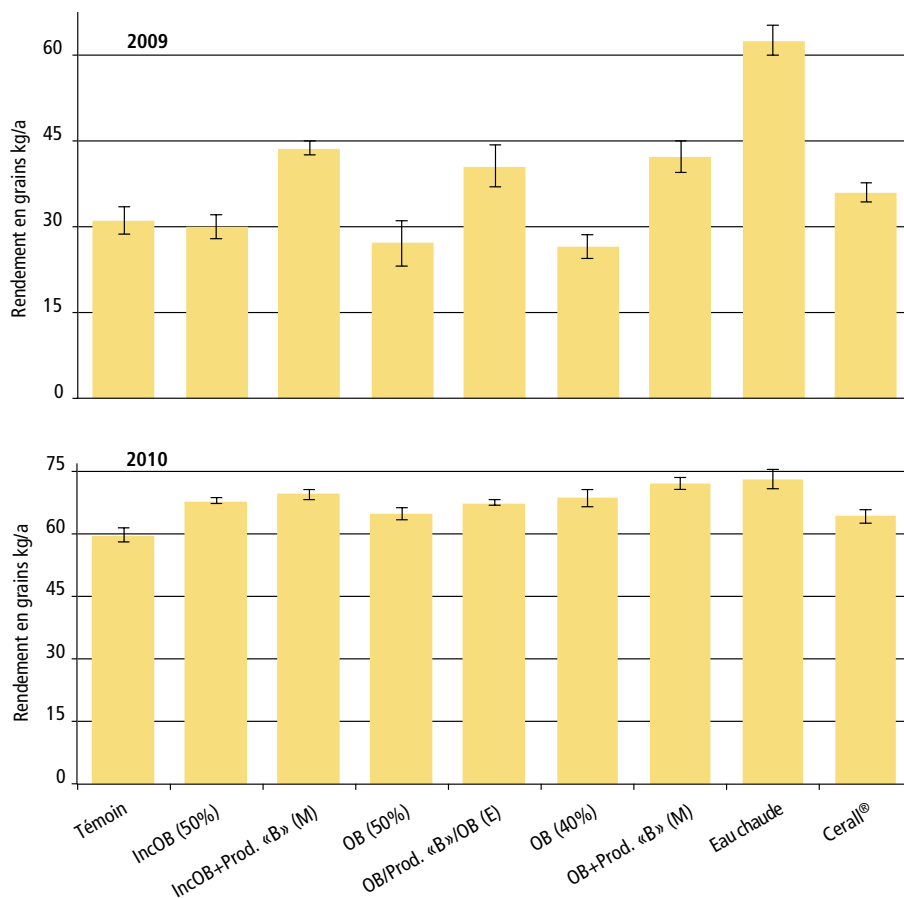


Figure 11 | Effet du produit «B» sur le rendement en grains de semences de blé contaminées par *Microdochium nivale* dans les essais en plein champ des années 2009 et 2010 – Moyennes de quatre répétitions et écart-types. Pour une meilleure visibilité, les échelles dans les illustrations sont différentes. Description du procédé (cf. fig. 9).

Conclusions

- Les semences de blé biologique sont souvent tellement contaminées par l'agent pathogène de la moisissure des neiges *M. nivale* qu'elles n'atteignent plus la faculté germinative nécessaire à la certification.
- Un traitement à l'eau chaude permet de combattre efficacement l'infestation par *M. nivale*. Mais du fait des coûts de séchage élevés, ce procédé n'a pas pu s'imposer dans la pratique.
- Le produit bactérien Cerall® n'a qu'une efficacité partielle sur l'infestation des semences par *M. nivale*.
- Testée *in vitro*, la substance végétale appelée produit «B» inhibait à la fois la germination des spores et la croissance du mycélium de *M. nivale*.
- Des essais avec des applications du produit «B» en poudre (enrobage ou suspension) sur les semences en chambre climatique et en plein champ ont démontré un effet significatif contre *M. nivale*. Au champ, la levée des plantes et le rendement étaient substantiellement plus importants que dans la variante témoin non traitée.
- Avec une formule améliorée, ce produit pourrait offrir une alternative de lutte réaliste pour le traitement des semences de blé biologique dans la pratique. ■

Riassunto**Lotta alternativa a *Microdochium nivale* nel frumento bio**

All'atto della certificazione delle sementi di frumento bio, spesso, non viene raggiunta la germinabilità richiesta. Non è raro che ciò sia dovuto a una forte infestazione di *Microdochium nivale*. Un trattamento a base di acqua calda permetterebbe di combattere efficacemente l'infestazione. Tuttavia, nella pratica questa procedura non è applicabile a causa dell'elevato dispendio energetico correlato all'essiccazione. Il prodotto biologico Cerall® per la concia delle sementi ha soltanto un'azione parziale contro *M. nivale*. Nello screening di laboratorio con diversi prodotti su base vegetale, un preparato («B») ha dato un risultato positivo in termini di azione inibitoria rispetto alla crescita miceliare di *M. nivale*. Anche in diversi esperimenti *in vivo* nella camera climatizzata e in altri sul campo è stato possibile dimostrare l'azione significativa di un trattamento delle sementi a base di preparato «B» in polvere, che ha determinato una migliore levata delle piante nonché una minore perdita di resa. La sfida sta nello sviluppare la formulazione cosicché il preparato «B» possa essere impiegato nei grandi impianti per la concia delle sementi.

Bibliographie

- Haigh I. M., Jenkinson P. & Hare M. C., 2008. The effect of a mixture of seed-borne *Microdochium nivale* var. *majus* and *Microdochium nivale* var. *nivale* infection on *Fusarium* seedling blight severity and subsequent stem colonisation and growth of winter wheat in pot experiments, *European Journal of Plant Pathology* **124** (1), 65–73.
- Hoffmann G. M. & Schmutterer H., 1999. Parasitäre Krankheiten und Schädlinge an Nutzpflanzen, 2. Auflage, Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart, 675 p.
- Johnsson L., Hökeberg M. & Gerhardson B., 1996. Performance of the *Pseudomonas chlororaphis* biocontrol agent MA 342 against cereal seed-borne diseases in field experiments, *European Journal of Plant Pathology* **104** (7), 701–711.
- Obst A., 1993. Krankheiten und Schädlinge des Getreides, Verlag Th. Mann, Gelsenkirchen-Buer, 184 p.
- Winter W., Bänziger I., Rügger A. & Krebs H., 1998. Weizensaatgut: Praxiserfahrung mit Warmwasserbehandlung. *Agrarforschung* **5** (3), 125–128.

Summary**Alternative control of snow mold (*Microdochium nivale*) in organic wheat**

For certification of organic wheat seed, the required germination capacity is often not achieved. This is frequently due to excessively high infestation with the snow mould pathogen *Microdochium nivale*. A warm-water treatment effectively controls infestation of seed. However, due to the high costs for redrying, this method has not caught on in practice. Dressing with the bacterial product Cerall® is only partially successful in controlling seed infestation with *M. nivale*. In a laboratory screening with various plant-based products, the preparation «B» showed a good inhibitory effect on the mycelial growth of *M. nivale*. Moreover, in several *in vivo* experiments in the climate chamber and in the field, the treatment of seed with powder from the preparation «B» demonstrated significant effects. The compound not only improved seedling emergence, but reduced also yield losses. The challenge is to develop the formulation to a point where the preparation «B» can be used as a product in large-scale dressing.

Key words: organic disease control, seed borne diseases, seedling blight, snow mould.