

**AFPP – ONZIÈME CONFÉRENCE INTERNATIONALE SUR LES MALADIES DES PLANTES
TOURS – 7 AU 9 DÉCEMBRE 2015**

**IMAGERIE MULTISPECTRALE : UNE NOUVELLE METHODE DE PHENOTYPAGE POUR EVALUER LA
RESISTANCE VARIETALE DU BLE TENDRE ET DU BLE DUR A LA FUSARIOSE DES EPIS**

V. CADOT⁽¹⁾, R. VADAINÉ⁽¹⁾, J.-P. MAIGNIEL⁽²⁾, D. DEMILLY⁽¹⁾

⁽¹⁾ GEVES - 25 Rue Georges Morel 49071 Beaucouzé Cedex, FRANCE
valerie.cadot@geves.fr

⁽²⁾ GEVES Domaine de l'Anjouère 49370 La Pouèze, FRANCE

RÉSUMÉ

Une nouvelle méthode de phénotypage par imagerie multispectrale sur grains a été mise au point par le GEVES pour évaluer la résistance variétale à la fusariose des épis, induite par *Fusarium graminearum*, sur blé tendre et blé dur, avec un algorithme spécifique à chaque espèce. Elle pourra remplacer les notations visuelles pour l'inscription CTPS des variétés au Catalogue français. En blé tendre d'hiver, le taux de grains fusariés mesurés par imagerie multispectrale sur 73 variétés est fortement corrélé avec le pourcentage d'épillets fusariés, estimé visuellement au champ ($R>0.87$) ainsi qu'avec les teneurs en Deoxynivalenol mesurées par HPLC-MS ($R=0.91$). En blé dur, une forte corrélation ($R=0.92$) a été également observée sur 10 variétés et des analyses complémentaires sont en cours pour valider la méthode sur un plus grand panel de variétés. Dans le cas d'un complexe *Microdochium-Fusarium graminearum*, les algorithmes devront être affinés et validés par qPCR.

Mots-clés : Fusariose sur grains– Blé – Phénotypage – Résistance – Imagerie multispectrale.

ABSTRACT

MULTISPECTRAL IMAGING: A NEW METHOD OF PHENOTYPING FOR THE CULTIVAR RESISTANCE OF COMMON WHEAT AND DURUM WHEAT TO *FUSARIUM* HEAD BLIGHT

A new method of phenotyping by multispectral imaging has been developed by GEVES to assess cultivar resistance to FHB induced by *Fusarium graminearum*, for soft wheat and durum wheat, with a specific algorithm for each species. It could replace the visual scorings for the CTPS registration of cultivars in the French Catalogue. For winter wheat, the rate of Fusarium Damaged Kernels (FDK) at maturity measured by multispectral imaging on 73 cultivars is strongly correlated with the percentage of scabbed spikelets, assessed visually in field ($R>0.87$), as well as Deoxynivalenol content, measured by LC/MS/MS ($R=0.91$). For durum wheat, high correlations ($R=0.92$) were also observed on 10 cultivars and complementary analyses are on going to validate the method over a greater range of varieties. In case of a complex *Microdochium-Fusarium graminearum*, algorithms will have to be refined and validated by qPCR.

Keywords: Fusarium Damaged Kernels – Multispectral imaging–Wheat – Phenotyping–Resistance.

INTRODUCTION

La fusariose de l'épi (FHB), provoquée par un complexe d'espèces de *Fusarium* et de *Microdochium*, est une des maladies fongiques les plus dommageables. *Fusarium graminearum* mais aussi *F. culmorum* en représentent les principaux agents. FHB occasionne des pertes de rendement de l'ordre de 0.2t/ha et une dégradation de la qualité sanitaire des semences mais il pose également et essentiellement un problème en santé humaine et animale, par la présence de mycotoxines dans les grains, notamment le deoxynivalenol (DON), appartenant aux trichothécènes de type B. La commission européenne en 2007 a établi des seuils réglementaires pour protéger les consommateurs. En France, ces normes ont été dépassées de 5 à 10% lors des années à forte pression en fusariose (Source Arvalis). Le développement de variétés résistantes est le moyen le plus efficace de réduire les teneurs en DON et les pertes de rendement, tout en permettant une diminution des fongicides. Pour le blé tendre, le blé dur et le triticale, la réglementation CTPS, encourage le développement de variétés résistantes à la fusariose de l'épi, par l'octroi d'un bonus afin de faciliter leur inscription au Catalogue français et défavorise les variétés sensibles en délivrant un malus. Ainsi, l'effort de sélection en blé tendre en France a permis une élévation du niveau de résistance à la fusariose des variétés inscrites en France depuis 2008, avec une baisse significative des variétés sensibles au profit des variétés intermédiaires et résistantes (Cadot V. and Maigniel J.-P., 2013). Le GEVES, en charge du réseau d'essais CTPS d'évaluation de la résistance variétale aux bio-agresseurs des céréales à paille, utilisait jusqu'en 2014, pour l'évaluation de la résistance à la fusariose des épis, des notations visuelles au champ sur épis, en estimant le pourcentage d'épillet fusariés assimilé à une mesure de sévérité. Or ces notations sont basées sur de l'expertise et demande du temps et de la main d'œuvre hautement spécialisée pour identifier et quantifier les symptômes correctement. Quant à l'évaluation de la résistance à l'accumulation de la DON, la cotation de résistance blé tendre est actuellement fournie une année après l'inscription et seulement à titre informatif, en cumulant les essais du CTPS et de la post inscription, en utilisant l'HPLC-MS ; outil de référence précis mais onéreux.

La sévérité, classiquement utilisée pour la sélection de QTL de résistance, permet d'évaluer selon le mode d'infection, la résistance de type I, résistance à l'infection initiale, ou de type II, résistance à la transmission de l'infection sur l'épi. D'autres paramètres phénotypiques peuvent également être évalués pour décrire d'autres types de résistances : comme le pourcentage de grains fusariés présentant des symptômes rosés, blanchâtres, ou ridés pour définir la résistance de type III à l'infection des grains, ou le taux de DON pour la résistance de type V à l'accumulation de mycotoxines dans les grains (Schroeder & Christensen, 1963 ; Mesterhazy, 1995). De nombreux auteurs ont montré d'assez bonnes corrélations entre la sévérité sur épillets, le taux de grains fusariés et les teneurs en DON, allant de 0.5 à 0.9 (Paul *et al.*, 2005 ; Gilbert et Woods, 2006 ; Jin *et al.*, 2014). Le GEVES a souhaité étudier la possibilité de développer une nouvelle méthode de phénotypage de quantification des grains fusariés qui serait précise, répétable, rapide et pas onéreuse pour évaluer la résistance à la fusariose des épis, en remplacement des notations visuelles de la sévérité par expertise au champ sur épis.

Plusieurs méthodes de phénotypage, autres que les notations visuelles, ont récemment été décrites pour quantifier la résistance à la fusariose ou à la DON. Très peu d'études sur le phénotypage automatisé au champ sont recensées : citons l'imagerie RGB dans le visible sur blé tendre, mesurant le taux d'épillet fusariés (Serre *et al.*, 2015, soumis). Beaucoup d'études ont utilisé l'imagerie hyperspectrale dans le proche infra-rouge en laboratoire sur épis ou sur grains par exemple pour quantifier le taux de grains fusariés ou la teneur en DON sur avoine (Tekle *et al.*, 2015), pour repérer les grains anormaux en blé dur (vitreux, fusariés, baie jaune) (Serranti *et al.*, 2013), pour différencier *Fusarium subglutinans*, *F. proliferatum* et *F. verticillioides* sur grains de maïs (Williams *et al.*, 2012), pour une détection précoce de la fusariose sur épi (Bauriegel, *et al.*, 2011). Néanmoins, l'imagerie hyperspectrale n'est pas facilement utilisable à haut débit du fait de la grande quantité de données à acquérir et à traiter. La spectroscopie FT-NIR a également été développée pour prédire rapidement

la teneur en DON en blé dur (De Girolamo *et al.*, 2015). Quelques études ont utilisé l'imagerie multispectrale pour quantifier la fusariose : en blé dur, sur 10 grains de 6 variétés (Jaillais *et al.*, 2015), sur grains de maïs en ciblant des longueurs d'onde dans le visible et dans le proche infra-rouge (Oldenburg *et al.*, 2015) ; mais aucune étude par imagerie multispectrale n'a été validée en blé tendre sur de grands effectifs.

C'est pourquoi, l'objectif majeur du GEVES est de développer l'imagerie multispectrale pour évaluer la résistance variétale à la fusariose et approfondir les corrélations entre les différentes composantes de la résistance, notamment entre les grains fusariés (type III) et la teneur en DON (type V).

MATÉRIEL ET MÉTHODE

CHOIX DU MATERIEL VEGETAL

- Lors de la première année d'étude, un nombre restreint de variétés a été étudié pour la mise au point des algorithmes visant à détecter les grains fusariés, de manière à faire une étude fine des corrélations entre grains et épillets fusariés, avec des variétés couvrant la gamme sensibilité à la fusariose. Pour le blé tendre, 5 témoins CTPS ont été étudiés en 2013, ciblé sur un seul groupe de précocité d'épiaison, « assez précoce ». En blé dur, 10 variétés ont été sélectionnées en 2014, intégrant 4 témoins CTPS.
- Lors de la deuxième année d'expérimentation, un grand panel de variétés a été choisi, afin de se placer dans les conditions de routine d'évaluation CTPS de la résistance à la fusariose. En blé tendre, 73 variétés, de différentes précocités, ont été évaluées en 2014 par imagerie multispectrale et par notation visuelle, incluant 22 témoins du CTPS et les variétés en étude pour l'inscription au Catalogue français. Pour le blé dur, la deuxième année d'expérimentation ayant eu lieu en 2015, les résultats ne sont pas encore disponibles.

METHODE DE NOTATION AU CHAMP PAR EXPERTISE DE LA FUSARIOSE

- L'évaluation de la résistance à la fusariose en plein champ du blé tendre et du blé dur a été réalisée en suivant le protocole CTPS pour l'inscription des variétés au catalogue français, dans le cadre des études VATE (Valeur Agronomique, Technologique et Environnementale). En blé tendre, sur les 7 essais fusariose du CTPS, 2 essais du GEVES de l'Anjouère (49) ont été étudiés par imagerie multispectrale.
- En année 1 (2013), ce fut l'essai inoculé par pulvérisation conidienne au moment de la floraison, avec un mélange de *Fusarium graminearum* (souche MTK 004, chémotype 15 aDON) et *F. culmorum* (souche R964, chémotype DON), à une concentration, $c = 2 \cdot 10^5$ sp/ml, sur 5 témoins CTPS.
- En année 2 (2014), ce fut l'essai contaminé par cannes de maïs porteuses de *Fusarium graminearum*, sur 73 variétés.
- Le dispositif expérimental CTPS comprend 3 répétitions de 1 ligne de 1.5 m par variété, pour l'essai par inoculation et 2 lignes pour l'essai cannes de maïs, qui est récolté pour les analyses de DON.
- Dans cette étude, la notation visuelle du pourcentage d'épillets fusariés a été réalisée à 360°C jour après floraison en année 1 et à 610°C jour en année 2 ; ce qui correspond environ à 60% d'attaque des témoins sensibles. Alors qu'en première année, des comptages visuels du taux d'épillets fusariés et de grains fusariés en végétation et à maturité ont été réalisés pour comparaison avec l'imagerie multispectrale, en deuxième année, des estimations d'épillets fusariés ont uniquement été réalisées, en se plaçant dans les conditions de notation du CTPS.
- En blé dur, sur les 5 essais fusariose du CTPS, seul l'essai de l'Anjouère par cannes de maïs a été étudié en première année d'étude (2014) sur 10 variétés. Le dispositif et la méthode de notation sont les mêmes qu'en blé tendre. La notation a été effectuée à 500°C jour après floraison.
- Pour le blé tendre et le blé dur, les épis notés visuellement ont été récoltés à maturité, sur 2 répétitions/variété de 25 épis en année 1, et 3 répétitions en année 2 pour réaliser les mesures d'imagerie multispectrale.

METHODE DE QUANTIFICATION DE LA FUSARIOSE SUR GRAINS PAR IMAGERIE MULTISPECTRALE

Principe de l'imagerie multispectrale

Le principe de l'imagerie multispectrale est d'acquérir l'image d'un échantillon dans plusieurs bandes spectrales, pouvant aller de l'ultraviolet (<400 nm) à l'infrarouge (>800nm). A la différence de l'imagerie dans le visible, utilisant seulement des bandes spectrales correspondant au rouge, vert et bleu (RGB), l'imagerie multispectrale permet une définition beaucoup plus précise de la lumière réfléchie, en apportant des nuances de couleur et des informations invisibles à l'œil nu. Il est possible d'établir la signature spectrale du caractère recherché à partir d'échantillons d'apprentissage et d'utiliser l'algorithme développé sur ce caractère pour d'autres images multispectrales provenant d'autres échantillons.

Matériel utilisé

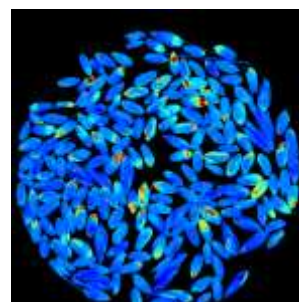
L'imageur multispectral utilisé par le GEVES est le VideometerLab2. Il est constitué d'une caméra numérique (2056x2056 pixels), d'une sphère d'intégration avec 20 LEDS ou bandes spectrales allant de 375 à 970 nm. Un logiciel interne assure la calibration, l'acquisition et les analyses en multispectral de l'image et les calculs statistiques spécifiques à la méthodologie retenue. La résolution est de 45 µm/pixel.



Figure 1 : Videometer et bande transporteuse
(Videometer and conveyor belt)



2a



2b

Figure 2a : grains de blé fusariés et sains dans le visible
(Tombstone and healthy wheat kernels in visible spectrum)
Figure 2b : grains de blé fusariés détectés par imagerie
multispectrale en jaune/rouge et sains en bleu
(Tombstone kernels detected by multispectral imaging, in
yellow/red and healthy kernels in blue)

Méthode d'apprentissage pour élaborer l'algorithme de quantification des grains fusariés

Différentes étapes ont été nécessaires pour développer un algorithme identifiant les différents symptômes de fusariose liés à *F. graminearum* ou *F. culmorum* et quantifiant le nombre de grains fusariés, par rapport au nombre de grains sains, en blé tendre et en blé dur :

1. Les grains contaminés par la fusariose et les grains sains ont été identifiés manuellement par expertise sur 10 images multispectrales issues de 5 variétés différentes, pour servir de base d'apprentissage.
2. Un algorithme de classification a été appliqué sur ces images multispectrales pour établir une signature spectrale permettant de différencier les grains contaminés des grains sains. Cette classification est basée sur une analyse canonique discriminante, avec calcul du quotient de Rayleigh, maximisant les variations inter-classes par rapport aux variations intra-classes de la combinaison linéaire des 20 bandes spectrales.
3. A partir de cette classification, un programme de traitement d'images a été mis au point pour détecter les grains fusariés de manière robuste sur un grand nombre d'échantillons, afin de prendre en compte la variabilité des symptômes sur grains, selon le type d'essai, contaminés par cannes ou par inoculation, selon l'année, en lien avec la pression maladie et le type variétal. Il a été décidé de mesurer le taux de grain fusariés au lieu de la surface de grains fusariés afin de se rapprocher de la notation au champ mesurant le pourcentage d'épillets fusariés. Afin de pouvoir calculer automatiquement ce pourcentage de grains fusariés, lors du passage d'un lot sur l'imageur multispectral, un programme a été développé, en association avec le logiciel fourni avec le Videometer^R pour compter automatiquement le nombre de grains fusariés et total.

Analyses sanitaires

Afin de définir la flore fongique présente sur les grains après récolte, des analyses microbiologiques ont été menées par le GEVES-SNES sur 400 grains pour détecter *Fusarium Section Discolor* (*F. graminearum* et *culmorum*), ainsi que d'autres espèces de *Fusarium* (sections *Sporotrichiella* et *Roseum* et autres spp.) et *Microdochium* spp.

Répétabilité de la méthode

Deux échantillons de blé tendre (une variété sensible et une résistante) ont été analysés cinq fois successivement par l'imageur en faisant varier le nombre de grains analysés.

Facteurs testés en blé tendre

Plusieurs facteurs ont été testés en année 1 et en année 2 pour valider la méthode d'imagerie multispectrale sur grains fusariés à maturité, en remplacement des notations visuelles sur épillets en cours de végétation au champ :

En année 1, les analyses par imagerie multispectrale ont porté sur environ 5000 grains par modalité, provenant des 125 épis, soit 25 épis de 5 variétés, sur 1 à 2 répétitions, selon le facteur étudié :

- Facteur 1 : Organes mesurés : épillets et grains fusariés
Des comptages visuels, à la fois sur épillets et sur grains, ont été menés au champ à 360°C jour après inoculation.
- Facteur 2 : Stades de notation : en végétation et à maturité
Des comptages visuels du taux de grains fusariés ont été réalisés à la fois à 360°C jour après inoculation et au stade maturité, sur les mêmes épis.
- Facteur 3 : Méthodes de phénotypage des grains fusariés
L'analyse des corrélations a été réalisée entre les différentes méthodes estimant le taux de grains fusariés : imagerie multispectrale, comptage visuel et qPCR, à partir des mêmes échantillons récoltés à maturité. La qPCR a été réalisée sur grains broyés, à l'aide de sonde Taqman spécifique de *Fusarium graminearum* par Arvalis Institut du Végétal.
- Facteur 4 : Echantillonnage des grains : battage par épi individuel ou en mélange
Les corrélations entre les mesures d'imagerie des grains fusariés, issus d'un battage par épi individuel ou de 25 épis en mélange, ont également été analysées afin de pouvoir se placer dans une configuration en routine à plus haut débit. La 1^{ère} répétition a été récoltée épi par épi et la 2^{ème} répétition en mélangeant les grains issus des 25 épis, soit environ 1000 grains par répétition et variété.
- Facteur 5 : Support testé : boîte de Petri et bande transporteuse
Afin d'accélérer le débit du nombre de grains mesurés par imagerie multispectrale, une bande transporteuse a été installée, nécessitant une mise au point de l'algorithme. Ces mesures ont ensuite été comparées avec celles réalisées à l'aide des boîtes de Petri.

En année 2, deux autres facteurs ont été testés, sur 3 répétitions de 25 épis :

- Facteur 6 : Résistance variétale
Afin de pouvoir comparer le classement de la résistance variétale à la fusariose par imagerie multispectrale, comparativement à la méthode de notation visuelle sur épillets fusariés, un large panel de variétés (73 variétés), présentant une grande variabilité de résistance et de précocités d'épiaison, a été évalué. Le taux de DON a également été mesuré par HPLC-MS sur 41 variétés (variétés inscrites et témoins) parmi les 73.
- Facteur 7 : Stade de récolte
Afin de décider de la date de récolte adéquate pour la mesure du taux de grains fusariés par imagerie multispectrale, une première récolte à maturité des témoins CTPS a été effectuée par groupe de précocité, sur la 1^{ère} ligne d'une parcelle élémentaire, tandis qu'une seconde récolte a été réalisée sur la 2^{ème} ligne, en se basant sur la maturité de la variété la plus tardive.

Méthode testée en blé dur

Lors de la première année d'étude, l'algorithme blé tendre a été testé sur 10 variétés de blé dur, à raison de 2 répétitions de 25 épis. Les notations visuelles au champ sur épillets ont été comparées aux taux de grains fusariés mesurés par imagerie multispectrale, sur ces mêmes échantillons.

RESULTATS

BLE TENDRE : CORRELATIONS ENTRE LES NOTATIONS VISUELLES ET L'IMAGERIE MULTISPECTRALE

Analyse fine des échantillons en première année d'étude

La corrélation entre notations visuelles sur épillets (résistance types I+II) et sur grains (résistance type III) provenant de 125 épis, pour des variétés de même précocité, s'est révélée hautement significative pour un même stade en végétation, avec $R = 0.95$ (Figure 3). Ces résultats s'avèrent prometteurs pour évaluer la résistance du blé tendre à la fusariose en mesurant le taux de grains fusariés au lieu des épillets fusariés. Le **Tableau I** récapitule les corrélations entre les différents facteurs étudiés. De fortes corrélations sont obtenues entre les notations visuelles en végétation (360°C jour après floraison) et les notations à maturité de récolte, avec $R \geq 0.85$. Ces résultats montrent que le classement de la résistance variétale à la fusariose reste relativement stable, au stade maturité comparativement au stade en végétation après floraison, utilisé actuellement sur épillets.

Tableau I : Bilan des corrélations entre les notations visuelles et l'imagerie multispectrale pour évaluer la résistance à la fusariose sur blé tendre d'hiver

(Summary of correlations between visual scorings and multispectral imaging to assess Fusarium resistance for winter wheat)

			Notation visuelle			Imagerie multispectrale		
			A 360°C jour après inoculation à floraison		A maturité	A maturité		
						en boîte de Petri		Avec le convoyeur
	Stade de mesure	Coefficient de corrélation de Pearson	% épillets fusariés en vrac	% grains fusariés par épi	% grains fusariés par épi	% grains fusariés par épi	% grains fusariés en vrac	% grains fusariés en vrac
Notation visuelle	A 360°C jour après inoculation à floraison	% épillets fusariés en vrac	1	0,95	0,87	0,88	0,92	0,92
		% grains fusariés par épi		1	0,85	0,85	0,95	0,93
	A maturité	% grains fusariés par épi			1	0,89	0,87	0,92
Imagerie multispectrale	A maturité	En boîte de Petri : % grains fusariés par épi				1	0,85	0,98
		En boîte de Petri : % grains fusariés en vrac					1	0,80
		Avec le convoyeur : % grains fusariés en vrac						1

L'analyse des différentes méthodes de quantification de semences fusariées, par comptage visuel ou par imagerie multispectrale, montre dans tous les cas, de fortes corrélations, supérieures ou égales à 0.80 obtenues (Figure 4). L'algorithme développé pour la bande transporteuse ne dégrade pas significativement les corrélations obtenues avec des images des grains en boîte de Pétri. Il est ainsi possible d'analyser les grains à haut débit : 1000 grains évalués en 5 minutes avec la bande par une seule personne, donc vingt fois plus rapidement qu'avec les boîtes de Petri, et avec trois fois moins de personnel que les notations au champ faites par 3 personnes en 5 minutes.

L'analyse entre la notation visuelle actuelle au champ sur épillets en végétation et la mesure par imagerie sur grains à maturité, avec la bande transporteuse, issue d'un mélange en vrac, s'est révélée, significativement corrélée, avec un $R=0.92$; ce qui correspond aux conditions ultérieures d'utilisation en routine.

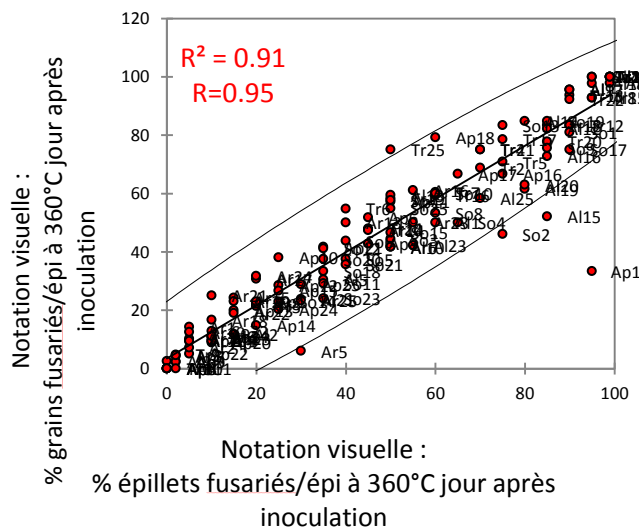


Figure 3 : Blé tendre d'hiver : Relations entre les notations visuelles du taux de grains fusariés et d'épillets fusariés, sur épi individuel, 360°C jour après inoculation de *F. graminearum* et *F. culmorum*

(Winter wheat: Relationships between Visual Disease Assessment of the level of *Fusarium* Damaged Kernels (FDK) and scabbed spikelets, on individual spikes, at 360°C dpi, by inoculation of *F. graminearum* & *F. culmorum*)

L'analyse qPCR ciblant *F. graminearum* sur les 5 variétés (5000 grains) a également montré une forte corrélation avec l'imagerie multispectrale ($R=0.91$), ainsi qu'avec les notations visuelles ($R=0.95$), en classant correctement les résistances variétales. Ces résultats apportent un élément supplémentaire de validation de l'algorithme « FusaSpectral Blé Tendre », mais nécessitent des études sur un plus grand nombre de variétés.

Analyse en routine de la méthode en deuxième année d'étude

Pour valider la robustesse de l'algorithme blé tendre, un grand nombre de variétés, de différentes précocités de floraison, ont été étudiées en 2014, en se mettant dans les conditions d'un test CTPS fusariose en routine.

- Etude du classement de la résistance variétale, selon la méthode de phénotypage

L'évaluation de la résistance des 73 variétés par estimation visuelle du taux d'épillets fusariés à 600°C jour après floraison et par imagerie multispectrale sur grains à maturité, a confirmé une forte corrélation entre les deux méthodes d'évaluation de la résistance, avec $R=0.87$; le taux d'épillets fusariés ayant été débiaisé par la date de floraison (Figure 5).

Après l'analyse des corrélations entre les résistances de type I+II et III, la résistance à l'accumulation de DON de type V a été étudiée, par comparaison avec les deux autres types. Le taux de grains fusariés mesurés par imagerie multispectrale s'est avéré être un meilleur prédicteur de la résistance à l'accumulation de la DON, avec un $R^2 = 0.83$ (Figure 6) que le taux d'épillets fusariés, $R^2=0.70$ sur 41 variétés. Ces comparaisons entre teneurs en DON par HPLC-MS et taux de grains fusariés par imagerie multispectrale vont se poursuivre les prochaines années sur davantage de sites CTPS et sur les nouvelles inscriptions. Le classement des résistances variétales des témoins CTPS par rapport aux trois paramètres mesurés, s'avère proche et globalement conforme aux cotations de résistance des témoins CTPS (cotation entre parenthèse Figures 5 et 6).

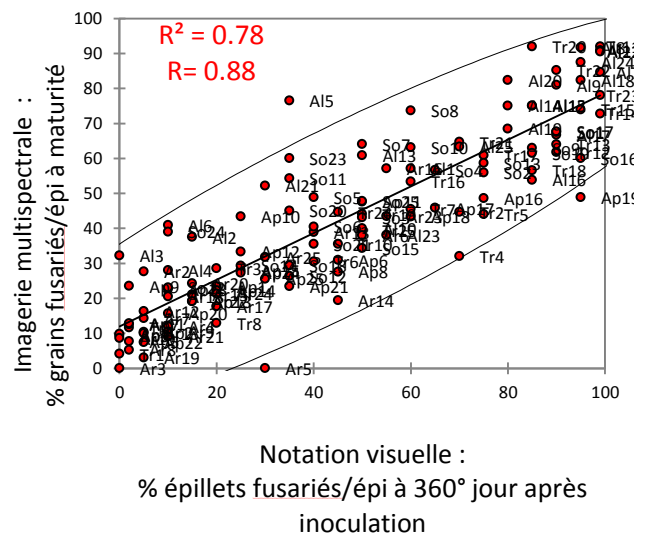


Figure 4 : Blé tendre d'hiver : Relations entre le pourcentage de grains fusariés mesuré par imagerie multispectrale et le pourcentage d'épillets fusariés à 360°C jour après inoculation, sur 125 épis individuels

(Winter wheat: Correlation between % FDK by multispectral imaging and % scabbed spikelets by VDA at 360° dpi, on 125 individual spikes)

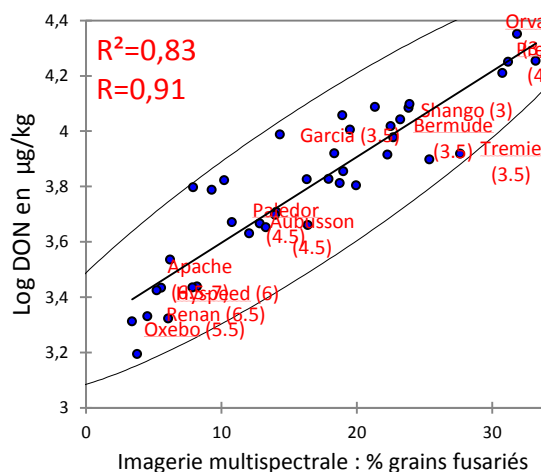
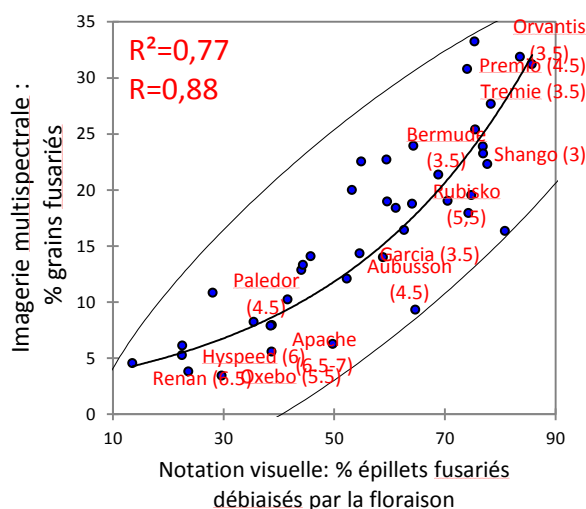


Figure 5 : Corrélation entre le taux de grains fusariés à maturité, mesuré par imagerie multispectrale et le taux d'épillets fusariés par notation visuelle (Correlation between the rates of FDK at maturity by multispectral imaging and scabbed spikelets by VDA)

Figure 6 : Corrélation entre les teneurs en DON (log) et le taux de grains fusariés mesurés par imagerie multispectrale (Correlation between the rates of DON (log) and FDK measured by multispectral imaging)

Entre parenthèse : Cotation de référence de la résistance à la fusariose de 1 : sensible à 9 : résistante (In bracket : Reference resistance cotation to FHB : 1 : susceptible to 9 : resistant)

- Etude de la date de récolte sur le taux de grains fusariés

L'analyse du facteur date de récolte sur les 22 témoins CTPS, soit par groupe de précocité, soit basé sur la maturité de la variété la plus tardive, n'a pas révélé d'effet significatif de la date de récolte sur le classement variétal de la résistance, avec une corrélation de Spearman hautement significative, $R=0.96$, $p=0.0001$ entre les deux modalités, malgré l'observation logique d'une valeur légèrement supérieure des grains fusariés récoltés à la date de la variété la plus tardive (Figure 7).

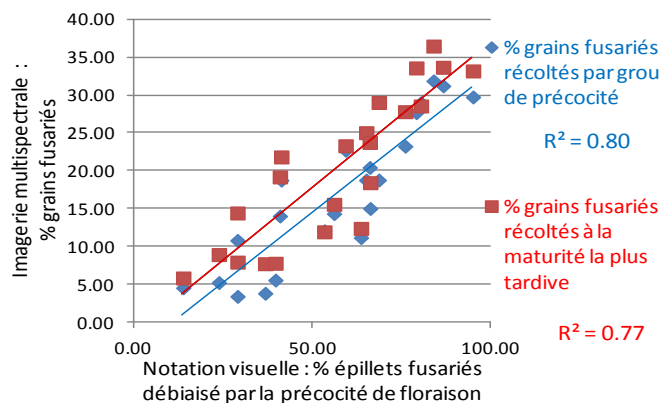


Figure 7 : Effet de la date de récolte sur le pourcentage de grains fusariés en blé tendre sur les témoins CTPS

(Effect of the harvesting date on the percentage of FDK for wheat CTPS controls)

- Répétabilité de la méthode d'imagerie multispectrale

Pour l'échantillon de la variété sensible, présentant un taux moyen de 42% de grains fusariés, l'écart-type entre les 5 mesures successives fut de 1 % pour 1500 grains analysés, et de 2% pour 1000 grains analysés. L'écart maximal pour 1000 grains entre 2 répétitions fut de 4.8%. Pour l'échantillon de la variété résistante, présentant un taux moyen de 1.8% grains fusariés l'écart type est resté aux alentours de 0.2%. Ces résultats indiquent une bonne répétabilité des données issues du Videometer et préconisent un échantillonnage compris entre 1000 et 1500 grains pour obtenir une précision acceptable.

BLE DUR : CORRELATIONS ENTRE LES NOTATIONS VISUELLES ET L'IMAGERIE MULTISPECTRALE

La première année d'étude a montré que l'algorithme du blé tendre ne pouvait pas être utilisé pour l'analyse d'échantillons de blé dur ; les corrélations étant trop faibles entre les notations visuelles et les mesures d'imagerie. De ce fait, un nouvel algorithme spécifique du blé dur a dû être mis au point sur les 10 variétés, incluant les témoins CTPS et des variétés en étude. Une corrélation élevée, de $R = 0.92$, a été obtenue entre l'imagerie multispectrale et les notations visuelles sur épillets ainsi qu'un classement cohérent des témoins, confirmant la sensibilité de Dakter, le niveau intermédiaire d'Isildur et de Neodur et la tolérance de Joyau (Figure 8). Ces résultats sont en cours de validation sur un plus grand nombre de variétés en 2^{ème} année d'étude.

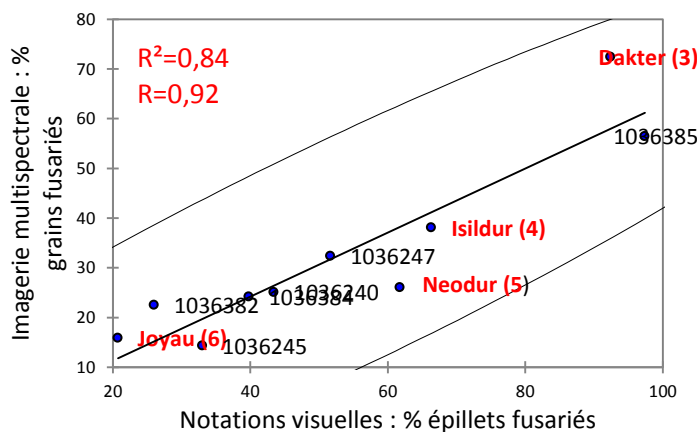


Figure 8 : Blé dur : Corrélation entre le taux de grains fusariés à maturité mesuré par imagerie multispectrale et le taux d'épillets fusariés par notation visuelle.

(Durum wheat: Correlation between the rate of FDK by multispectral imaging and the rate of scabbed spikelets by VDA)

(Cotation de résistance pour les témoins : 1 : sensible à 9 : résistante)
(Resistance cotation for controls: 1 : susceptible to 9: resistant)

DISCUSSION

Comme la quantification de semences fusariées par imagerie multispectrale en blé tendre s'est avérée significativement corrélée avec les notations visuelles sur grains ($R=0.91$) sur un grand panel de variétés et également avec la qPCR mais sur un nombre réduite de témoins (Cadot *et al.*, 2015), l'imagerie multispectrale peut être considérée comme une nouvelle méthode d'évaluation fiable de la résistance à *Fusarium graminearum* ou *F. culmorum*. Cette méthode d'évaluation de la résistance à la fusariose des épis en blé tendre a été utilisée en routine pour la première fois en 2015 dans le cadre officiel de l'inscription CTPS des variétés au Catalogue, au GEVES de l'Anjouère sur 3 essais fusariose qui contenaient uniquement *F. graminearum* ou *F. culmorum*, en donnant des résultats satisfaisants, comparativement aux notations visuelles des témoins. Des études réalisées en 2013 sur d'autres lieux d'essais, dans le cadre d'un programme de recherche FSOV Mycotek, ont confirmé que lorsque les notations visuelles de la fusariose ne sont pas perturbées par une contamination par du *Microdochium*, l'imagerie multispectrale s'avère un bon prédicteur de la note de sensibilité variétale ; la qPCR ayant confirmé la bonne prédiction de l'imageur spectral (Valade *et al.*, 2015). En 2015, l'algorithme est en cours de validation sur deux autres sites CTPS fusariose, contenant en plus de *Fusarium graminearum*, du *Microdochium spp.* et d'autres espèces de *Fusarium* (section *sporoetrichiella* et *roseum*). Il est prévu dans le cadre d'un programme FSOV de développer un algorithme sur *Microdochium spp.* et éventuellement d'affiner le premier algorithme pour différencier *Fusarium graminearum* & *culmorum* de *Microdochium spp.*, avec une validation par qPCR. L'intérêt de l'imagerie multispectrale par rapport aux notations visuelles est d'avoir une bonne répétabilité, avec un taux d'erreur de 2% pour 1000 grains analysés, contre environ 10% par expertise au champ. De plus, cette méthode permet un gain de temps et de personnel spécialisé pour noter puisqu'il suffit d'une seule personne non experte en laboratoire. Néanmoins ce gain de temps n'est réel que s'il est couplé à une récolte des épis pour une autre utilisation. C'est le cas pour les essais contaminés par cannes de maïs qui sont ensuite exploités pour les mesures de DON, mais pas pour les essais par inoculation qui ne sont pas actuellement exploités pour la DON. il pourrait être intéressant pour les essais non récoltés de

développer une méthode de phénotypage automatisée au champ par imagerie multispectrale sur épis. Actuellement l'imagerie RGB au champ donne de très bons résultats (Serre *et al.*, 2015, soumis) mais cette méthode demande encore le développement de vecteurs adaptés à l'expérimentation pour réaliser les prises de vue. Elle peut être biaisée en cas de mélanges de pathogènes. Concernant le phénotypage de la fusariose au laboratoire sur céréales, des études en imagerie multispectrale et hyperspectrale ont été menées sur épis ou sur grains ; notamment l'imagerie multi-variée qui a été développée et validée par la qPCR pour détecter et quantifier les grains fusariés en blé dur (Jallais *et al.*, 2015). Leurs résultats sur le classement variétal sont en accord avec les nôtres et confirment l'utilisation de l'imagerie multispectrale pour l'évaluation de la résistance variétale en blé dur.

Le fait d'avoir obtenu une corrélation entre taux de grains fusariés et teneur en DON, $R=0.91$, supérieure à celle entre taux d'épillets fusariés et teneur en DON, $R=0.83$, conforte les données bibliographiques entre FDK et mycotoxines ; la notation sur grains étant moins influencée par l'environnement et plus proche de la résistance de type V (Liu W. *et al.*, 1997 ; Paul P.A *et al.*, 2005 ; Jin F. *et al.*, 2014).

CONCLUSION

En blé tendre, un algorithme a été mis au point pour évaluer la résistance variétale à *Fusarium graminearum* et *culmorum* en mesurant à maturité le taux de grains fusariés par imagerie multispectrale. Cet algorithme, dénommé FusaSpectral Blé Tendre, couplant imageur multispectral et bande transporteuse pour augmenter le débit, fait l'objet d'une déclaration d'invention. En 2015, il a été utilisé en routine pour la première fois sur 3 essais CTPS fusariose, contenant uniquement du *F. graminearum* ou *F. culmorum*, et a donné des résultats satisfaisants, comparativement aux notations visuelles des témoins. L'imagerie multispectrale sur grains s'est avérée mieux corrélée avec le taux de DON, avec $R^2=0.83$ que la notation visuelle sur épillets avec la DON, $R^2=0.7$. Cette meilleure prédiction du classement variétal de la résistance à la DON, en utilisant la résistance de type III plutôt que la sévérité pourrait s'avérer intéressante pour éviter d'utiliser des méthodes coûteuses comme l'HPLC-MS. Les prochaines analyses de DON, ainsi que les mesures du Videometer pour les prochaines campagnes d'inscription permettront de nous éclairer sur les méthodes à conserver. Dans les sites présentant un complexe avec d'autres espèces de *Fusarium* ou avec du *Microdochium* spp., il s'avère nécessaire de confirmer les résultats préliminaires de la spécificité de l'algorithme FusaSpectral Blé Tendre par qPCR sur plus d'échantillons ; les notations visuelles ne permettant pas d'évaluer correctement les symptômes spécifiques de *F. graminearum*. D'autre part, il est prévu prochainement de développer un algorithme spécifique de *Microdochium* spp., et d'essayer à terme de disposer d'un seul programme différenciant et quantifiant *Fusarium graminearum* et *Microdochium* spp.

L'algorithme mis au point sur blé dur, FusaSpectral Blé dur, demande encore une validation sur un panel de variétés plus large pour pouvoir être validé. Cet algorithme devra aussi être testé dans le cas de complexe fusariose-microdochium. L'imagerie multispectrale sur triticales est également en cours et nécessitera une validation par qPCR, vu la difficulté d'obtenir des notations visuelles fiables sur épillets. Pour les essais par inoculation qui ne sont pas récoltés pour la DON, il apparaît intéressant de s'orienter vers des méthodes de phénotypage au champ automatisées, avec des caméras multispectrales pour affiner les différences par rapport au visible ; notamment dans le cas de mélanges de pathogènes, y compris la rouille jaune sur épis.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été financé par le GEVES. Nous tenons à remercier Arvalis-Institut du Végétal, pour le financement des teneurs en DON, et notamment Romain Valade pour la réalisation des analyses qPCR.

BIBLIOGRAPHIE

- Bauriegel E., Giebel A., Geyer M., Schmidt U., Herppich W.B. 2011-Early detection of *Fusarium* infection in wheat using hyper-spectral imaging. *Computers and Electronics in Agriculture*. 75 (2) February 2011, 304–312.
- Cadot V. and Maigniel J.-P. 2013- Testing varieties at GEVES for resistance to *Fusarium* head blight on cereals: A way to improve genetic progress in the French Catalogue and to reduce the use of pesticides. *12th European Fusarium Seminar, 12-16 May, Bordeaux (France)*, p. 99.
- Cadot V., Vadaine R., Demilly D., Maigniel J.-P., 2015 - Multispectral camera and imaging: a new tool for assessment of wheat resistance to *Fusarium graminearum* and preliminary study for assessment of DON content. *13th European Fusarium Seminar, 10-14 May 2015, Martina Franca (Italy)*, p. 160.
- De Girolamo A., Lippolis V., Cervellieri S., Bernardi N., Pascale M., 2015- FT-NIR spectroscopy for rapid analysis of deoxynivalenol in wheat and wheat bran. *13th European Fusarium Seminar, 10-14 May 2015, Martina Franca (Italy)*, p. 93.
- Gilbert J., Woods. S.M, 2006-Strategies and Considerations for Multi-Location FHB Screening Nurseries – in *The global Fusarium initiative for an international collaboration, CIMMYT, El Batan, Mexico, 14-17 March 2006*, 93-102.
- Jaillais B., Roumet P., Pinson-Gadais L., Bertrand D., 2015- Detection of *Fusarium* head blight contamination in wheat kernels by multivariate imaging. *Food Control*, 54, 250–258.
- Jin F., Bai G., Zhang D., Dong Y., Ma L., Bockus W., Dowell F., 2014 - *Fusarium*-damaged kernels and deoxynivalenol in *Fusarium*-infected U.S. winter wheat. *Phytopathology* 104(5), 472-478.
- Liu W., Langseth W., Skjinner H., Elen O.N., Sundheim L., 1997 - Comparison of visual head blight ratings, seed infection levels, and deoxynivalenol production for assessment of resistance in cereals inoculated with *Fusarium culmorum*. *European Journal of Plant pathology* 103, 589-595.
- Mesterhazy, A. 1995. Types and components of resistance to *Fusarium* head blight of wheat. *Plant Breed.* 114, 377-386.
- Oldenburg E., Ellner F., Kraft M., 2015- Detecting and quantifying fusarium ear rot symptoms in maize by spectral imaging technology. *13th European Fusarium Seminar, 10-14 May 2015, Martina Franca (Italy)*, p. 204.
- Paul P.A., Lipps P.E., Madden L.V., 2005 - Relationship between visual estimates of fusarium head blight intensity and deoxynivalenol accumulation in harvested wheat grain: a meta-analysis. *Phytopathology* 95(10), 1225-1236.
- Schroeder H.W., Christensen J.J., 1963 - Factors effecting resistance of wheat to scab caused by *Gibberella zeae*. *Phytopathology*, 53, 831-838.
- Serranti S., Cesare D., Bonifazi G., 2013-The development of a hyperspectral imaging method for the detection of *Fusarium*-damaged, yellow berry and vitreous Italian durum wheat kernels. *Biosystems Engineering*. 115 (1), May 2013, 20-30.
- Serre F., Faure M., Abadi M., Desray P., Roche S., M. Joannin M., Vinot M., Petit S., Tourvieille de Labrouhe D. 2015-11 ème Conférence internationale sur les maladies des plantes, 7 au 9 Décembre 2015, 10p (soumis).
- Tekle S., Måge I., Segtnan V.H. Åsmund Bjørnstad 2015-Near-Infrared Hyperspectral Imaging of *Fusarium*-Damaged Oats (*Avena sativa* L.), *Cereal Chemistry*. January 2015, 92 (1), 73- 80.
- Valade R., Vitry C., Leite S., Stragliati J., Senellart P., Foucault B., Sunderwirth S., Lonnet P., Langin T., Pinson-Gadais L., Atanasova V., George P., Maigniel J.P., Vadaine R., Cadot V., Batina H., Laval V., Ferreyrolle J., 2015-Constitution d'une mycothèque des champignons pathogènes du blé tendre et mise au point d'outils permettant la caractérisation et la quantification de ces espèces. *Projet FSOV Mycotek ; quatrième Rencontre Scientifique du FSOV, Paris, 8 janvier 2015*, 16p.
- Williams P.J., Geladi P., Britz J., Manley M., 2012-Near-infrared (NIR) hyperspectral imaging and multivariate image analysis to study growth characteristics and differences between species and strains of members of the genus *Fusarium*. *Anal. Bioanal. Chem.* 404, 1759-1769.