

# [*Microdochium* spp.] Vers une meilleure connaissance de l'occurrence, de l'épidémiologie du champignon et du comportement des variétés de blé tendre actuelles face à cette maladie

Delphine Taillieu<sup>1\*</sup>, Valerie Cadot<sup>3</sup>, Benoit Foucault<sup>1</sup>, Olivier Robert<sup>1†</sup>, Laure Duchalais<sup>1</sup>, Sébastien Caiveau<sup>1</sup>, Clément Debiton<sup>1</sup>, Pascal Giraudeau<sup>1</sup>, Sylvie Dutriez<sup>1</sup>, Thierry Bouthillier<sup>1</sup>, Jérôme Auzanneau<sup>1</sup>, Céline Duque<sup>1</sup>, Cindy Vitry<sup>2</sup>, Stéphanie Le Prieur<sup>2</sup>, Florian Dauthieux<sup>2</sup>, Marlène Faure<sup>3</sup>, Thomas Baldwin<sup>3</sup>, Clémence Galon<sup>3</sup>, Isabelle Serandat<sup>3</sup>, Jean-Philippe Maigniel<sup>4</sup>, Romain Valade<sup>2</sup>

1 - UFS - 17 Rue du Louvre, 75001 PARIS

2 - ARAVLIS - 3 Rue Joseph et Marie Hackin, 75016 PARIS

3 - GEVES - 25 rue Georges Moral, 49071 BEAUCOUZE

4 - GEVES - Domaine de l'Anjouère - La Pouëze, 49370 Erdre-en-Anjou - France

\* **Coordinateur** : Delphine Taillieu, delphine.taillieu@florimond-desprez.fr, 06 75 42 96 40

α **Co auteur Article et Poster** : Romain Valade, Valerie Cadot, Benoit Foucault, Delphine Taillieu

† **Décédé en Février 2017** Olivier Robert

## 1. Introduction

La fusariose de l'épi est une maladie causée par un complexe d'espèces fongiques toxigène (*Fusarium*) et non toxigène (*Microdochium*). Actuellement, la sélection variétale est principalement axée contre les espèces productrices de fusariotoxines notamment *F. graminearum*. Néanmoins, depuis plusieurs années la présence de deux espèces de *Microdochium*, *M. nivale* et *M. majus* ne cesse d'être significative sur les céréales françaises (Observatoire CartoFusa, Bayer ; Gourdain *et al.*, 2016) et leur rôle dans les pertes de rendements devient de plus en plus préoccupant. De plus, ces deux espèces ont la particularité d'attaquer non seulement l'épi mais également les autres organes de la plante : des racines aux feuilles, la gaine et les nœuds.

L'émergence avérée de ces agents pathogènes, couplée au manque de connaissances à la fois sur l'épidémiologie de ces champignons et sur le comportement des variétés de blé actuelles, traduisent l'enjeu du projet.

De plus l'apparition de résistance à certains produits phytosanitaires dans la population de *Microdochium*, notamment les strobilurines (Walker *et al.*, 2009) et les benzimidazoles, rend la lutte contre ces agents pathogènes plus difficile et met en évidence l'importance du levier variétale. C'est dans ce contexte que s'inscrit cette étude afin de mieux connaître l'occurrence des *Microdochium* en France, de mieux comprendre leur développement au champ et de mettre au point des outils d'évaluation de la résistance variétale à *Microdochium*. Ces outils seront utilisables par toute la filière, notamment pour la création de variétés résistantes, pour l'inscription au Catalogue français et pour la post inscription.

Le projet s'articule autour de trois axes de travail, l'occurrence de *Microdochium* sur le territoire français, son épidémiologie et enfin l'évaluation du comportement des variétés face à ce pathogène notamment grâce à des outils moléculaires et à un outil basé sur l'imagerie multispectrale de détermination rapide du taux de grains fusariés, le Videometer.

## 2. Occurrence de *Microdochium* sur le territoire et facteurs agronomiques associés

### ► Matériel & Méthodes

Au travers d'un réseau d'enquêtes menées par Arvalis Institut du végétal, 150 échantillons (120 échantillons de blé tendre et 30 échantillons de blé dur), représentatifs des variétés actuelles et

sélectionnés afin de couvrir le territoire national, ont été récupérés au cours de chaque année du projet (2015, 2016 et 2017). L'identification et la fréquence de *Microdochium* ont été réalisées de trois manières différentes afin d'éviter tout biais lié à l'analyse. Chaque échantillon de grains a été divisé en deux lots. Une analyse de flore par culture microbiologique a été réalisée en prestation externe par le laboratoire EQUASA afin de déterminer l'occurrence du genre *Microdochium* au sein de la flore fongique présente dans chaque lot. A partir de ces analyses, des isolats de *Microdochium* spp ont été transmis au laboratoire de pathologie végétale d'Arvalis pour y être purifiés par isolement monospore puis l'espèce précise a été caractérisée par PCR. Une sélection de ces isolats a également été mise en collection dans un but d'utilisation ultérieure comme inoculum artificiel. En parallèle, le second aliquot de chaque échantillon a été analysé par PCR quantitative afin de déterminer directement la proportion de chaque espèce de *Microdochium*, mais également de *Fusarium graminearum*. Ainsi, outre la détermination fiable de la présence et de la composition de la population du *Microdochium*, l'équilibre entre *Microdochium* et *F. graminearum* sur le grain a pu être appréhendé.

Dans le cadre de l'enquête, chaque échantillon est associé à une fiche technique recensant les points importants de l'itinéraire cultural suivi, notamment le lieu précis du prélèvement, le précédent et l'antéprécédent cultural, le travail du sol réalisé, la variété de blé tendre et la date de semis. Ces informations ont été mises en relation avec les quantités de *Microdochium* retrouvées dans chaque lot ainsi qu'avec la composition en espèce afin de déterminer les facteurs déterminants dans la présence de *Microdochium*.

### ► Résultats

Les analyses microbiologiques et moléculaires réalisées sur les grains issus des enquêtes agriculteurs ont permis de mettre en évidence une fréquence très variable des espèces entre les trois années avec des niveaux d'occurrence très différents (Figure 1). 4.6%, 49% et 6.41% de grains ont été identifiés, respectivement en 2015, 2016 et 2017, comme contaminés par au moins une espèce du complexe de la fusariose des épis.

Ce résultat est en adéquation avec la pression fusariose observée lors de ces trois années, notamment 2016, qui a été une des années les plus marquantes de cette dernière décennie pour la forte pression maladie notamment sur épis et grains.

*Microdochium* est le taxon prédominant isolé de grains lors de ces 3 années (75% des thalles observés) devant *F. graminearum* (13%) et *F. poae* (7%). Les 3 autres taxa significativement identifiés lors

de ce projet sont *F. tricinctum*, *F. avenaceum* et *F. langsethiae* (Figure 1). La très forte majorité de *Microdochium* est notamment liée à l'année 2016 pour laquelle *Microdochium* a représenté 85% de la flore des grains infectés contre 8% pour *F. graminearum*. Néanmoins, même en 2015, année où la pression a été très faible, *Microdochium* est le taxon prédominant (38% de la flore identifiée). *F. graminearum* a été l'espèce prédominante en 2017, devant *F. poae* et *Microdochium*.

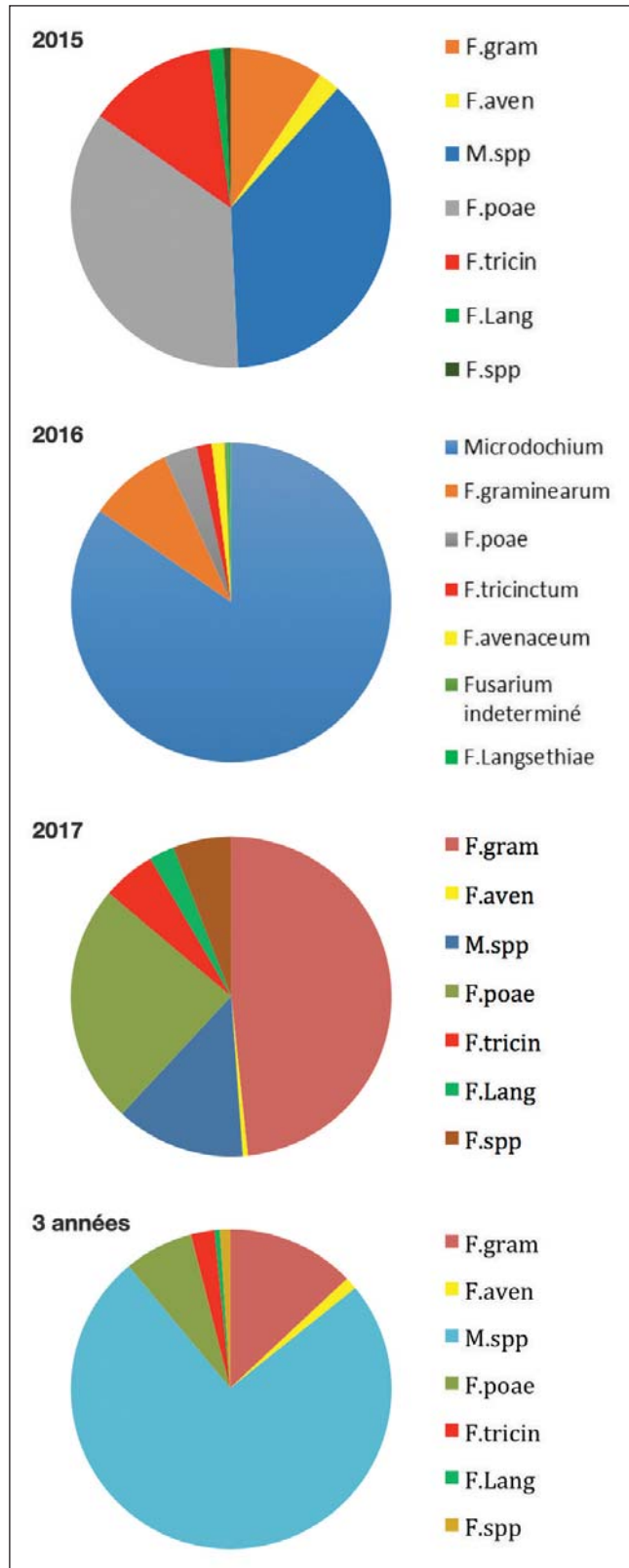


Figure 1 : Fréquence des différentes espèces de *Fusarium* et *Microdochium* identifiées par analyse microbiologique pour chaque année (2015, 2016, 2017) et en global.

Les analyses qPCR spécifiques de *F. graminearum*, *M. majus* et *M. nivale* réalisées sur ces mêmes lots de grains ont permis de mettre en évidence également une prédominance de *Microdochium* pour ces années (Figure 2).

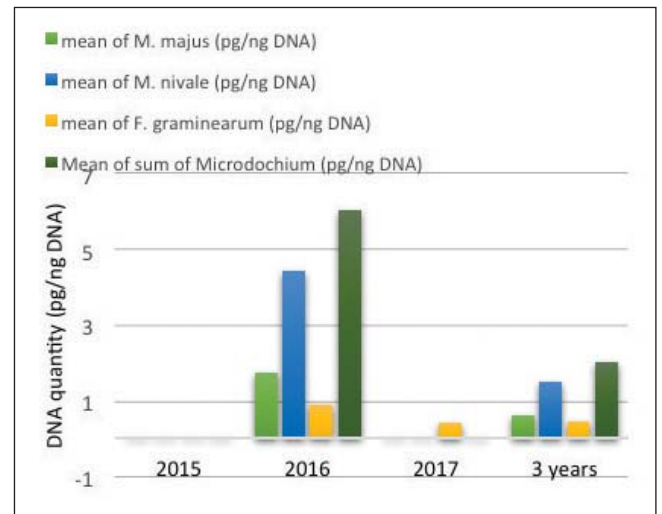


Figure 2 : Moyenne de la biomasse fongique par taxa (en pg/ng d'ADN total) pour les 3 années du projet.

Les corrélations entre les analyses microbiologiques et les qPCR pour *Microdochium* et *F. graminearum* sont respectivement de  $R^2=0.75$  et  $R^2=0.6$ . D'ailleurs, la moyenne de la biomasse fongique pour *Microdochium* (2.03 pg/ng d'ADN total) est environ 4.5 fois supérieure à celle obtenue pour *F. graminearum* (0.45) ce qui est sensiblement le même facteur obtenu avec les analyses microbiologiques (5.7x).

Les analyses qPCR ont permis d'identifier et quantifier chaque espèce de *Microdochium*. Ainsi, l'espèce majoritairement quantifiée en moyenne est *M. nivale* avec 1.49 pg/ng d'ADN total contre 0.6 pg/ng d'ADN total pour *M. majus*. Cette différence est principalement liée à l'année 2016 qui semble avoir favorisé *M. nivale* par rapport à *M. majus*.

Ces résultats ont pu être mis en corrélation avec des données obtenues dans des projets précédents (ANR Don&Co et CASDAR Ecofusa). Cette analyse globale permet de montrer que la pression *Microdochium* a été la plus forte en 2016 pour les 9 années d'étude et que la pression est significative 1 année sur 2 (Figure 3). Aucune n'exclusion n'a été observée entre *F. graminearum* et *Microdochium* et une corrélation forte existe entre les deux espèces de *Microdochium*.

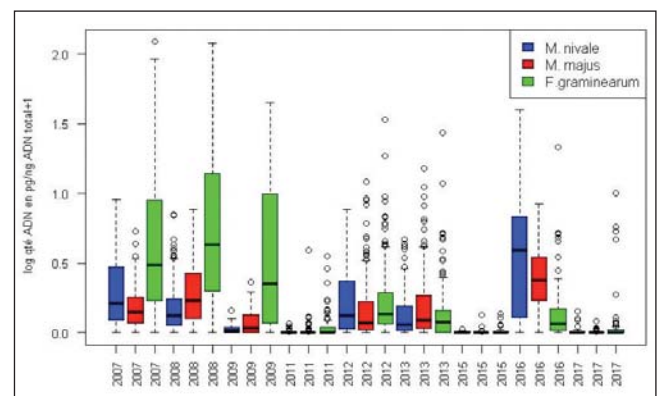


Figure 3 : Biomasse de *Microdochium* spp. et *F. graminearum* au cours des 10 dernières années.

La pression en 2015 et 2017 étant assez faible vis-à-vis de *Microdochium* dans l'ensemble des enquêtes, il n'a pas été possible d'identifier des facteurs de risque liés à l'itinéraire

technique dans le cadre du projet. En 2016, un échantillonnage complémentaire au projet a permis d'analyser, par qPCR, 149 échantillons prélevés pendant le remplissage. L'analyse des résultats montre que le travail du sol et le précédent n'ont pas d'effet significatif sur la quantité de *Microdochium* contrairement à *F. graminearum* qui est, comme attendu, significativement plus abondant après un précédent maïs non labouré (Figure 4).

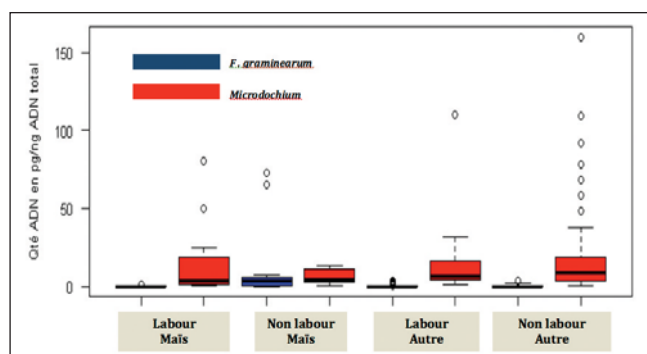


Figure 4 : Quantité d'ADN de *Microdochium* et *F. graminearum* en fonction du précédent et du travail du sol (149 échantillons prélevés pendant remplissage).

L'analyse des enquêtes de 2016 a mis en évidence de potentielles différences entre les variétés prélevées mais le nombre d'échantillons par rapport aux autres variables n'est pas assez important pour analyser statistiquement cette réponse.

### 3. Epidémiologie de *Microdochium* spp.

Le phénotypage reste la base quant à la recherche de génotype répondant aux critères de sélection, comme la tolérance aux maladies. La détermination du stade d'infection optimal en condition semi contrôlées et des conditions météorologiques favorisant l'installation de *Microdochium* spp. est un sujet majeur pour les acteurs de la sélection. Optimiser et définir une méthode d'inoculation au champ est important afin de pouvoir discriminer le matériel végétal en sélection. Outre cet élément, il nous permet de mieux comprendre le mode d'infection de ce champignon.

#### ► Matériel & Méthodes

Les essais ont été menés sur 2 années consécutives (2015 et 2016) afin d'optimiser le phénotypage au travers de dispositifs type pépinières irriguées dans des conditions climatiques naturellement différentes : un site Nord (Site Florimond Desprez, Cappelle en Pévèle 59), et deux sites dans le Centre (Site ARVALIS, Boigneville 91 et le site RAGT2n, Louville-la-Chenard 28). Quatre variétés de blé tendre de comportements différents face à la fusariose ont été testées, OREGRAIN, CELLULE, PREMIO et AREZZO. Le dispositif est commun aux 3 sites, en 2 répétitions de 6 lignes sous 5 modalités d'inoculation différentes (Tableau 1).

Stade d'infection	Objectifs
Dernière Feuille Etalée (DFE)	Appréhender l'apparition de symptômes sur feuilles
Mi Epiaison	Décrit comme stade optimal pour l'infection par <i>Microdochium</i>
Mi Floraison	Stade critique pour la fusariose
DFE + Mi Floraison	Inoculation double pour observer des symptômes sur les organes de la plante
NON inoculé	TEMOIN

Tableau 1 : Modalités d'inoculation.

Les essais ont été inoculés à partir d'un inoculum de *M. nivale*, espèce tendant à dominer les populations naturelles depuis ces

3 dernières années. L'inoculation artificielle a eu lieu par pulvérisation de spores à une concentration de 10<sup>6</sup> spores/ml. L'observation de l'apparition des symptômes a été déterminante pour le déclenchement des premières notations. 15 à 20% de symptômes sur feuilles observés sur notre témoin de référence, Premio, était synonyme des premières notations pour chaque modalité.

Le but de cet essai a été de suivre l'évolution des symptômes sur feuilles jusqu'aux épis via plusieurs notations visuelles, grâce à l'échelle utilisée classiquement en sélection variétale, note de 1 (=résistant) à 9 (=sensible). Outre la notation, la biomasse fongique a été mesurée pour chaque notation réalisée à l'aide d'outils moléculaire (cf. point 2). Ainsi, nous avons pu suivre la cinétique du complexe fusarien dans les différents prélèvements de feuilles, épis et grains (de 48h, 2 semaines, 1 mois après inoculation et à récolte variable selon l'organe) et relier ces données aux notations.

#### ► Résultats

Les résultats ont été analysés selon l'organe prélevé : feuilles, épis et grains. Les corrélations et les analyses statistiques ont été réalisées sur le jeu de données de 2016 en rassemblant les 3 lieux d'essai : Cappelle en Pévèle, Louville la Chenard et Boigneville. Seuls les résultats de l'année 2016 seront présentés, en effet l'année de 2015 n'a pas été favorable au développement de *Microdochium* malgré l'apport d'inoculum.

#### Analyses des Feuilles

Une assez bonne corrélation est observée entre la notation sur feuilles réalisée par l'expérimentateur et la quantité de *M. nivale*, soit R= 0.89 (Figure 5). L'analyse de variance ne démontre aucune différence significative selon les différentes modalités d'inoculation.

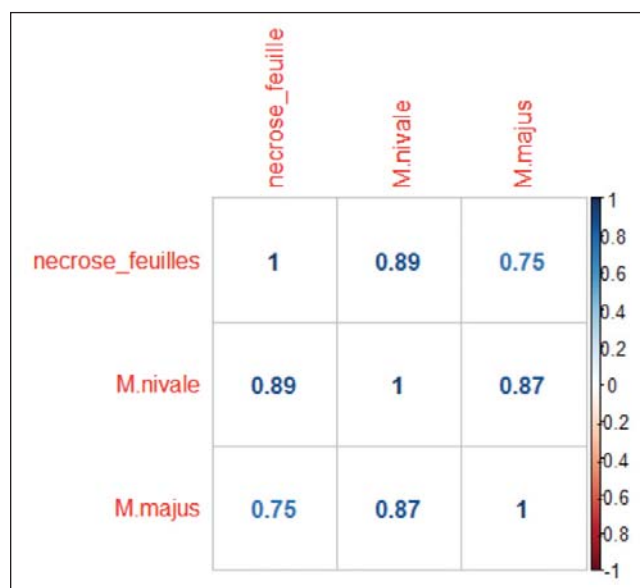


Figure 5 : Matrice de corrélation de Nécroses Feuilles Vs Quantité de *Microdochium* spp. (3 sites regroupés).

#### Analyses des épis

Sur épi, une plus grande quantité de *M. nivale* a été observée comparativement à celle sur feuilles (quantité de *M. nivale* en pg/ng d'ADN total). Selon les modalités des différences significatives ont été observées et confirmées par l'analyse de variance (Figure 6).

Deux groupes statistiques ont été identifiés. Les modalités Mi épiaison et Mi floraison présentent les moyennes ajustées les plus élevées (Figure 7). Cependant la modalité Témoin et la modalité DFE + Mi Floraison ne sont pas statistiquement différentes. En effet l'année 2016 a été marquée par une forte présence de *Microdochium* spp., sur le territoire français. La présence de celui-

ci dans les témoins non inoculés, démontre que la contamination naturelle a été aussi importante dans les sites d'essais. Cependant les essais permettent de mettre en évidence qu'une inoculation entre le stade mi-Epiaison et mi-Floraison serait toutefois plus favorable à l'expression de symptômes et donc du champignon.

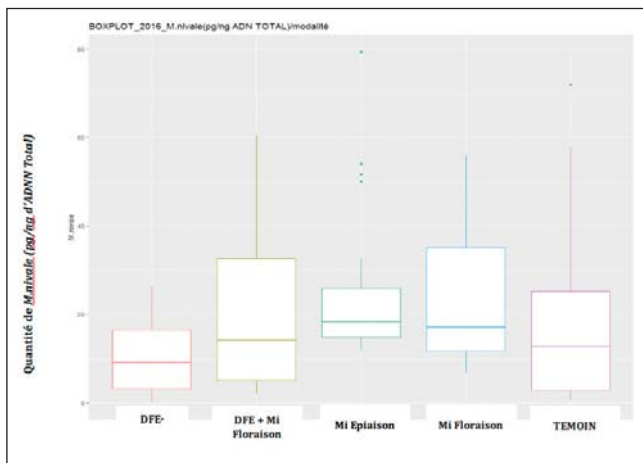


Figure 6 : Résultats qPCR - Quantité de *M.nivale* (pg/ng ADN Total) sur épi selon les modalités d'inoculations (3 sites regroupés).  
\* Dernière Feuille Etalée.

```

Modalite      lsmmean    SE    df    lower.CL    upper.CL    .group
DFE           10.25227  2.660480  139  4.992025  15.51251  A
Témoin       16.54319  2.660480  139  11.282946  21.80343  AB
DFE + MI FLO 19.02941  2.660480  139  13.769166  24.28965  AB
Mi floraison 23.70125  3.072057  139  17.627245  29.77525  B
Mi épiaison  24.94038  3.072057  139  18.866377  31.01438  B

confidence level used: 0.95
P value adjustment: tukey method for comparing a family of 5 estimates
significance level used: alpha = 0.05

```

Figure 7 : Analyses Variance - ANOVA - Effet de la modalité d'inoculation (date) sur la quantité de *M. nivale* (3 sites regroupés).

La corrélation entre la présence de symptômes de *Microdochium* spp, et la biomasse fongique sur l'épi, est assez moyenne :  $R = 0.57$  (Figure 8). Cette corrélation est plus faible que celle observée sur feuilles.

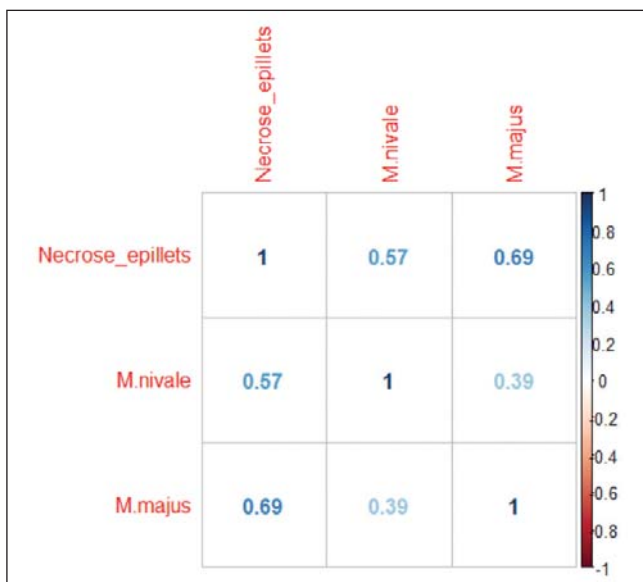


Figure 8 : Matrice de corrélation entre la notation épis (Nécrose épillets) vs la quantité de *Microdochium* spp. (3 sites regroupés).

Ce résultat démontre la difficulté pour l'expérimentateur à noter et appréhender les symptômes de *Microdochium* spp. sur épi par rapport aux feuilles. En effet l'expérience des notations au champ a prouvé la difficulté à phénotyper sur épi ce champignon, difficulté augmentée également par la présence de *F. graminearum* dans

les essais (données non montrées). Sur feuilles les symptômes sont certes proches de ceux de la septoriose mais sont plus faciles à apprécier que les symptômes sur épis.

#### Analyses sur grains

L'ensemble des dispositifs ont été récoltés, puis ont été analysés par qPCR pour quantifier *M. nivale* dans les lots de grains récoltés pour chaque modalité. Aucun effet significatif n'a été mis en évidence pour les différentes modalités d'inoculation.

### 4. Evaluation du comportement des variétés face à *Microdochium* spp.

Cet axe du projet comportait plusieurs objectifs, tout d'abord la mise en application d'un protocole de contamination de *Microdochium* spp. pour une caractérisation phénotypique optimale au champ. Le deuxième était l'optimisation du protocole de phénotypage à la résistance aux *Microdochium* spp. Enfin la caractérisation du comportement des variétés de blé françaises à ces agents pathogènes afin de mieux orienter la sélection variétale. Le panel de variétés comportait 45 variétés dont 5 témoins.

#### ► Matériel & Méthodes

Ce panel a été sous-divisé en 2 sous-panels en fonction de la gamme de précocité et a été testé sur 2 ans répartis dans 12 lieux différents en France. Le design expérimental était sous forme de pépinière maladie irriguée avec 3 modalités en 2 répétitions ; 1 modalité sans inoculum (Témoin), une modalité avec *M. nivale* et enfin une modalité avec *M. majus*. Au cours de ces deux années d'expérimentations, les deux protocoles d'inoculation ont consisté en deux ou trois inoculations. L'efficacité de l'infection et la pression maladie ont été mesurées par 2 méthodes : visuelle et moléculaire. La première basée sur l'observation visuelle des feuilles lorsque le témoin Premio était touché à 15-20% avec une échelle de 1 à 9 selon le pourcentage de nécroses foliaires, 1 étant l'absence de symptôme. Pour les épis, des notations visuelles ont été réalisées respectivement à 450 et 550°C jours après Mi-Floraison sur épis, de 1 à 9 comme une notation classique de fusariose. Des prélèvements ont été effectués pour réaliser des analyses qPCR sur grains et sur feuilles pour les sites les plus infestés. Au total 9 sites ont été retenus et 4 sites ont été analysés entièrement par qPCR.

#### ► Résultats

Sur les témoins (Apache, Renan, Premio, Tremie et Bermude) révélateurs, l'analyse statistique a mis en évidence des effets variétés et des effets souches significatifs sur toutes les mesures, excepté pour les feuilles (Tableau 2). Pour autant, nous n'avons jamais eu d'effet significatif de la modalité d'inoculation.

Factor	Trait	Df	Pr(>F)
Variété	qPCR_M.nivale	46	8.12e-09***
Variété	qPCR_M.majus	46	4.93e-08***
Variété	qPCR_F.grami	46	2.17-05***
Variété	qPCR_Total_Fungi	46	5.20e-11***
Variété	NOTE_GLOBALE_FEU	46	5.85e-09***
Variété	NOTE_GLOBALE_EPI	46	1.63e-14***
Souche	qPCR_M.nivale	3	2.75e-17***
Souche	qPCR_M.majus	3	1.19e-15***
Souche	qPCR_F.grami	3	0.003**
Souche	qPCR_Total_Fungi	3	0.050*
Souche	NOTE_GLOBALE_FEU	3	7.39e-11***
Souche	NOTE_GLOBALE_EPI	3	2.60e-05***

Tableau 2 : Effets variétaux et modalités sur les témoins de l'essai (2016 - 2018).

En prenant en compte, la totalité du panel variétés, des effets significatifs des souches et des variétés ont été mis en évidence pour différents caractères mesurés (**Tableau 3**).

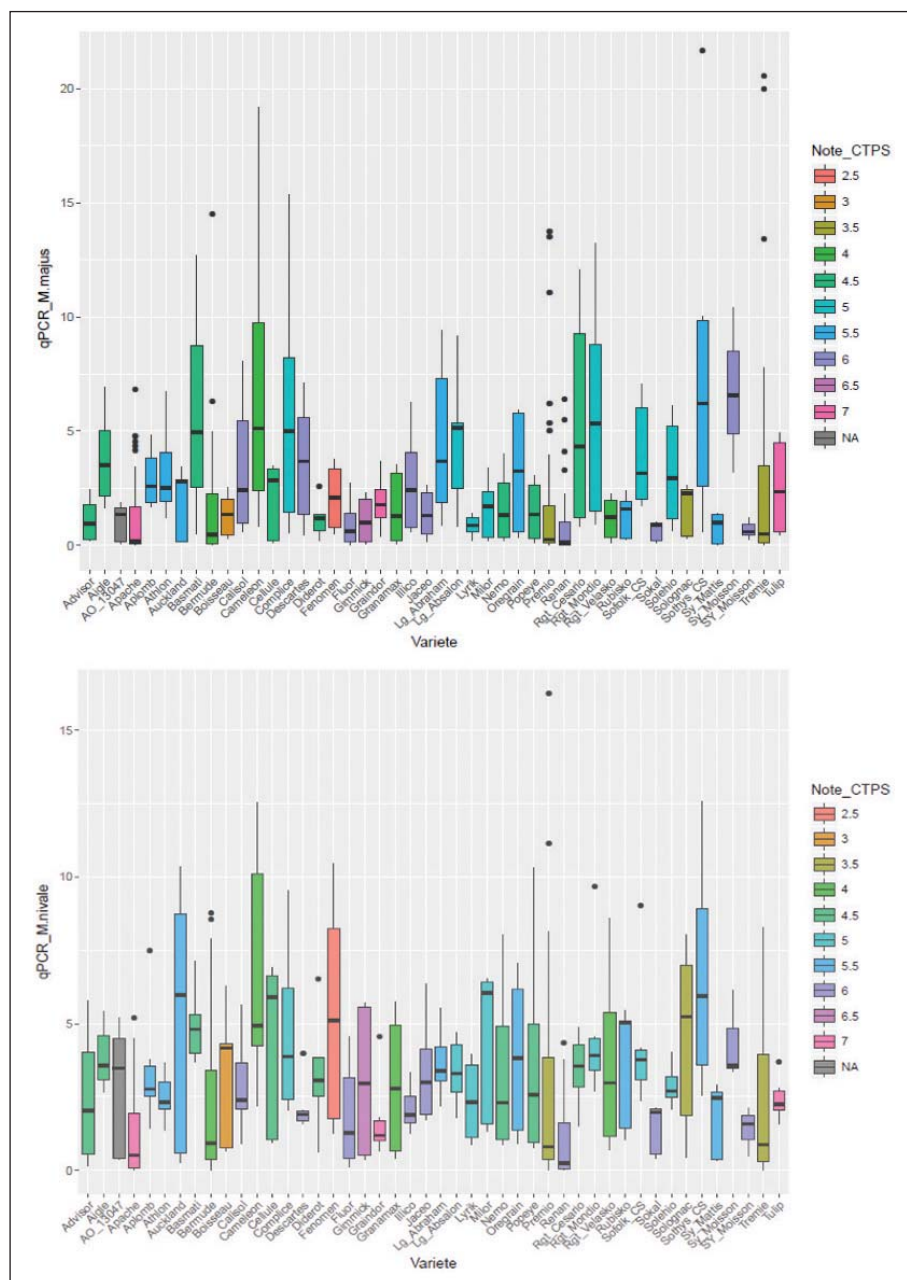
Factor	Trait	Df	Pr(>F)
Variete	qPCR_M.nivale	4	0.0004***
Variete	qPCR_M.majus	4	0.0545*
Variete	qPCR_F.grami	4	1.780e-06***
Variete	qPCR_Total_Fungi	4	7.079e-08***
Variete	NOTE_GLOBALE_FEU	4	0.1142
Variete	NOTE_GLOBALE_EPI	4	6.317e-06***
Souche	qPCR_M.nivale	3	1.254e-05***
Souche	qPCR_M.majus	3	3.384e-08***
Souche	qPCR_F.grami	3	0.1309
Souche	qPCR_Total_Fungi	3	0.0194**
Souche	NOTE_GLOBALE_FEU	3	2.716e-05***
Souche	NOTE_GLOBALE_EPI	3	0.0246*

**Tableau 3** : ANOVA sur les variétés du panel (40 Variétés).

Les deux graphiques ci-dessous (**Figure 9**) représentent les quantités de *M. nivale* et de *M. majus* en pg/ng d'ADN total, retrouvées dans les grains post récolte. Le graphique est illustré en associant la note délivrée par le CTPS en post inscription pour la sensibilité à la DON ?, mycotoxines produites notamment par *Fusarium graminearum*.

Les analyses qPCR sur les grains récoltés dans les différents essais ont permis de mettre en évidence des différences variétales vis-à-vis de *Microdochium*. Elles ont également permis de mettre en évidence une réponse des variétés sensiblement identiques entre *M. majus* et *M. nivale*, même si ce résultat reste à confirmer avec plus de sites et de données.

Les 2 années furent très différentes en termes de conditions climatiques et n'ont pas permis de mettre en avant la réussite d'une méthode d'inoculation. Sans l'outil qPCR, il est très compliqué de dissocier les maladies sur épis dues à *Microdochium* spp. ou à *Fusarium* spp. Un effet variétal existe dans la résistance aux *Microdochium* spp. et il peut s'avérer différer de celui à la *Fusarium graminearum*, mettant en évidence des mécanismes de résistances potentiellement différents contre ces agents pathogènes.



**Figure 9** : Quantité de *M.majus* et *M.nivale* en pg/ng d'ADN total sur grains post récolte.

## 5. Outil d'imagerie multispectrale du taux de grains attaqués par *Microdochium*

Un des objectifs de ce projet était de tester la capacité d'un imageur multispectral, à différencier des grains présentant des symptômes de *Microdochium* spp. ou de *Fusarium graminearum* afin de pouvoir réaliser un classement de la résistance variétale à ces deux bioagresseurs. La capacité de l'imagerie multispectrale à classer les grains en 3 groupes : grains contaminés par *Fusarium* spp, grains contaminés par *Microdochium* spp. et grains non contaminés par ces agents pathogènes ; a été testée pendant 2 ans.

### ► Matériel & Méthodes

L'imageur multispectral utilisé par le GEVES est le VideometerLab3, possédant 20 LEDs de longueurs d'onde différentes, allant de l'ultra-violet à l'infra-rouge (de 375 nm à 970 nm). L'image multispectrale est obtenue en éclairant successivement l'échantillon avec ces 20 LEDs (Figure 10).

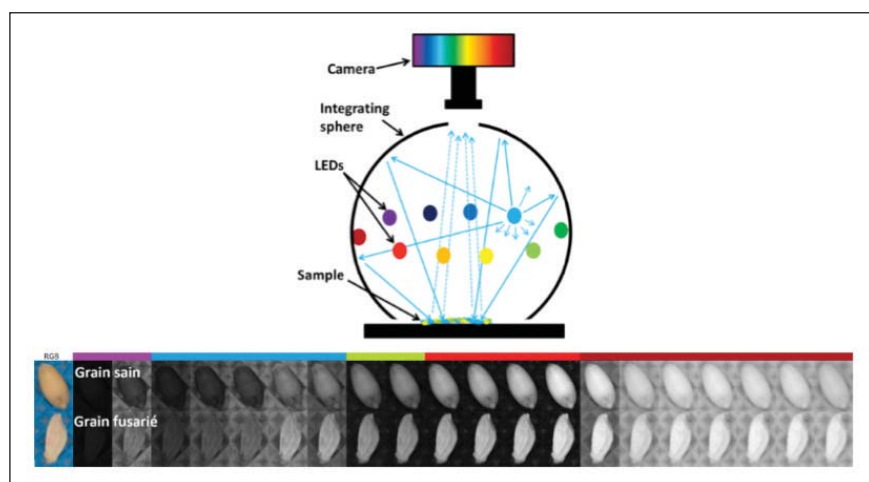


Figure 10 : VideometerLab3 : images multispectrales d'un grain sain et d'un grain fusarié

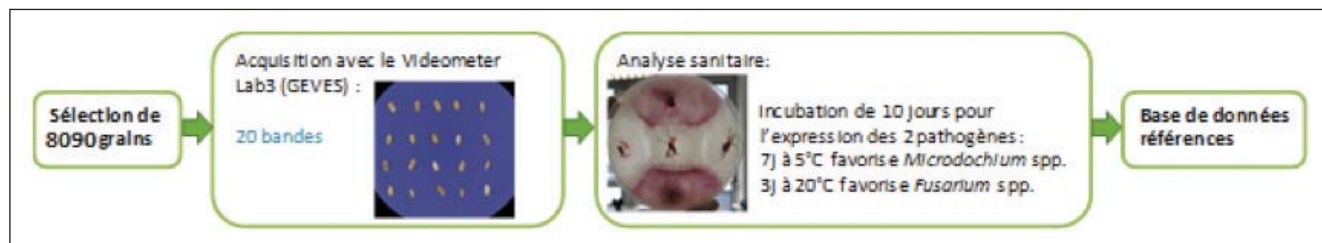


Figure 11 : Schéma de la construction des données de références.

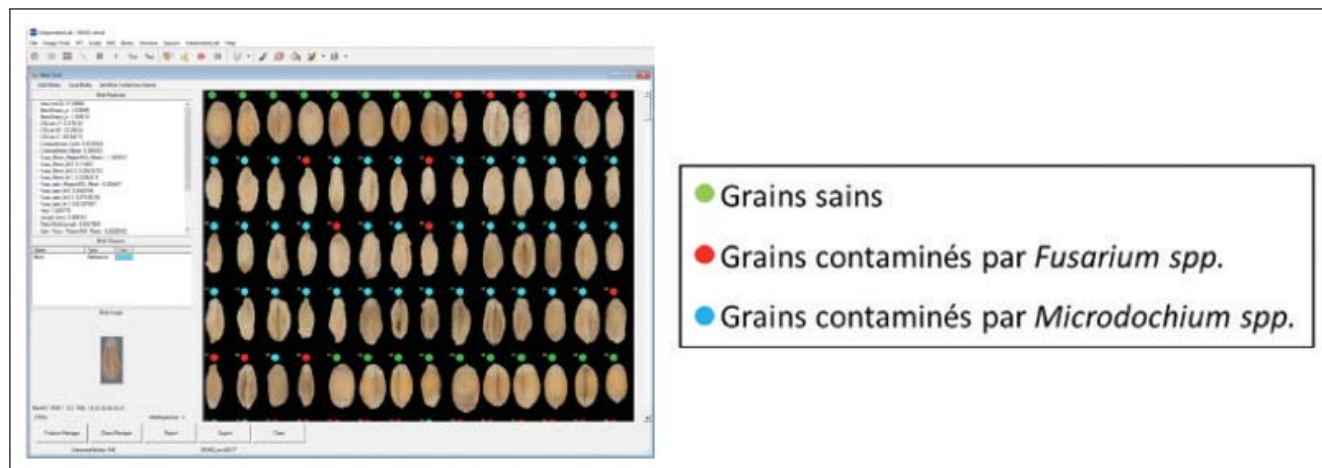


Figure 12 : Exemple de BlobCollection.

A partir de 6 essais contaminés par ce complexe fusariose en 2016 et 2017, une base de données de référence de 8090 grains a été constituée, en couplant les données multispectrales, les analyses visuelles et microbiologiques (Figure 11).

Une bibliothèque de référence appelée BlobCollection a été créée : à chaque image de grain, appelé Blob, est associé sa classe d'appartenance (Figure 12).

Vingt-sept caractéristiques décrivant les grains ont été définies à l'aide de l'outil BlobTool, comprenant 12 caractéristiques spectrales issues de la classification des grains en 2 groupes par Analyse Discriminantes Canonique normalisée (nCDA), mais aussi 15 caractéristiques morpho-métriques (surface, forme, texture du grain).

Le modèle de classification utilisé est un Extra Trees Classifier basé sur des forêts d'arbres de décisions. Le GEVES a développé, sous Matlab, de nombreux modèles de classification en modifiant la base d'apprentissage (enrichissement ou équilibrage des données) et/ou les caractéristiques utilisées.

## ► Résultats

Le choix d'un modèle équilibré, avec un même nombre de grains pour chaque classe, en utilisant 50% des grains comme base d'apprentissage, a permis d'obtenir un taux moyen de **81.51%** de bonne classification (**Figure 13**). Cependant, Le taux de bonne classification n'est que de **63.03%**, lors de la validation externe sur les 4046 grains non utilisés lors de la phase d'apprentissage (**Figure 14**). Le modèle à 3 classes présente des difficultés pour différencier les grains sains des grains contaminés par *Microdochium* spp (**Figure 15**).

		Modèle		
		Sain	Fusa	Micro
Analyse sanitaire	Sain	87%	2%	11%
	Fusa	5%	87%	8%
	Micro	20%	6%	75%

Figure 13 : Matrice de confusion sur l'ensemble des données, soit 8090 grains.

		Modèle		
		Sain	Fusa	Micro
Analyse sanitaire	Sain	67%	5%	28%
	Fusa	13%	66%	21%
	Micro	31%	9%	61%

Figure 14 : matrice de confusion sur l'ensemble des données externes, soit 4046 grains.

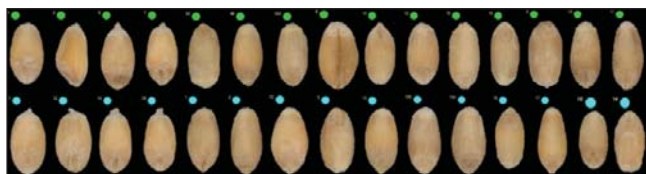


Figure 15 : Echantillon de grains sains (pastilles vertes) et de grains *Microdochium* (pastilles bleues) issus de la collection de référence

Dans les essais avec de la fusariose sans *Microdochium* spp., l'algorithme Fusaspectral blé tendre à 2 classes (grains fusariés, grains indemnes), développé par le GEVES en 2015 demeure la référence ( $R^2=0.95$ ) par rapport à l'algorithme à 3 classes ( $R^2=0.74$ ). Pour améliorer la classification à 3 classes, deux pistes pourraient être poursuivies : élargir la base de référence et modifier les longueurs d'onde présentes dans le Videometer. Une étude hyperspectrale pourrait être menée pour déterminer les longueurs d'onde les plus discriminantes pour la classification des grains en 3 groupes. Les longueurs d'onde retenues pourraient ensuite être introduites dans une nouvelle version du Videometer.

## 6. Discussion

Nous avons, au cours de ces 3 années de travaux, constitué une base de données riche à partir de laquelle nous avons pu apporter des réponses aux principales interrogations à l'initiative de ce projet. Les données acquises confirment l'importance de *M. majus* et *M. nivale*, plus fréquemment retrouvés que *F. graminearum* pendant les 3 années du projet. Souvent confondu et mal interprété entre la septoriose sur feuilles ou les fusarioses sur épi, l'impact de *Microdochium* sur les cultures céréalières en France a pu être sous-estimé par la sélection variétale.

Selon les conditions environnementales et climatiques, les niveaux de pression ont été très variables. En effet, dans les deux sites Centre, les symptômes et les quantités de *Microdochium* spp. ont été plus marqués que dans le site Nord, à Cappelle en Pévèle (59). De plus, au cours des 3 années de recherche, l'effet année était un facteur important sur le développement de *Microdochium* spp. Une pression forte a été observée sur tout le territoire en 2016, comparativement aux années 2015 et 2017, peu favorables au développement des champignons *Microdochium*. L'année 2016 a été caractérisée par de fortes pluies, un rayonnement lumineux insuffisant associés à des températures fraîches entre l'épiaison et la fin du remplissage. Ces critères sont décrits dans la littérature comme étant plus favorables à *Microdochium* spp. et sont en adéquations avec les notations et résultats obtenus en 2016.

L'ensemble des résultats suggère fortement que *Microdochium* spp., est plus sensible aux conditions climatiques qu'aux conditions agronomiques. En effet, nous n'avons pas mis en évidence de conditions agronomiques favorables à *Microdochium* contrairement à *F. graminearum* qui est plus fréquent après un précédent maïs en non labour si les conditions climatiques sont favorables.

Les résultats des essais afin de constituer un protocole d'inoculation pour les acteurs de la sélection en conditions semi contrôlées, ont révélé et mis en évidence les difficultés de la mise en place d'un protocole d'inoculation pour un phénotypage discriminant. Celui-ci s'est avéré plus difficile sur épis que sur feuilles. La présence sur épi de *Fusarium graminearum* et de *Microdochium* spp., est impossible à distinguer de façon claire et rigoureuse à l'œil nu. Seule l'analyse moléculaire permet de faire la différence. Parallèlement, l'étude via le Videometer a, elle aussi démontré des difficultés quant à la possibilité de différencier des grains présentant des symptômes de *Microdochium* spp. et de *F. graminearum* dans un objectif de pouvoir réaliser un classement de la résistance variétale à ces deux bioagresseurs.

La forte pression naturelle de *Microdochium* en 2016 ne nous a pas permis mettre en évidence le stade optimal pour inoculer artificiellement le champignon au champ. De même, en 2015 et 2017, l'inoculation artificielle n'a pas permis un développement significatif du champignon quelle que soit la modalité d'inoculation ou une interaction trop forte avec *F. graminearum* a empêché une notation visuelle spécifique de *Microdochium*. Néanmoins, des tendances ont été observées suggérant que plusieurs applications entre Mi- Epiaison et Fin-Floraison pourraient être efficaces. De plus, des ajustements méthodologiques sont encore possibles pour réussir à maîtriser ces inoculations artificielles (meilleure maîtrise de la brumisation, gestion de la pression exercée par *F. graminearum*, bâchage...).

Concernant la résistance variétale, les essais menés sous inoculations artificielles et grâce à la pression naturelle de 2016, démontrent qu'il existe des différences variétales dans la résistance. Ainsi, du progrès génétique est possible pour lutter contre *Microdochium* même si aucune résistance totale n'a été observée. Nous n'avons pas mis en évidence de différences marquantes pour les variétés testées entre *M. majus* et *M. nivale*. Dans l'ensemble, les variétés sensibles à *F. graminearum* le sont aussi à *Microdochium* spp. Cependant, les résultats suggèrent des différences pour certaines variétés, pouvant ainsi mettre en évidence des mécanismes de résistance différents. Enfin, certains résultats suggèrent que les variétés présentent des niveaux de résistance différents selon l'organe attaqué. Ainsi, certaines variétés semblent plus sensibles sur feuilles que sur épis (ou l'inverse).

L'imagerie multispectrale, avec une vingtaine de longueurs d'onde a montré ses limites pour différencier finement des symptômes proches entre *Fusarium* et *Microdochium*. Mais

l'imagerie hyperspectrale avec plus de longueurs d'onde (>200) et sur une gamme plus étendue, du visible au proche infra-rouge, permettrait d'identifier finement les longueurs d'onde spécifiques de *Microdochium* et de les comparer à celles déjà identifiées pour *Fusarium graminearum*, dans le programme CASDAR IRIGAM. L'ensemble de ces résultats sur la résistance variétale reste à être confirmé par des essais complémentaires.

## 7. Conclusion et perspectives

Ainsi, cette étude a mis en évidence l'importance de travailler cette thématique et a démontré que le levier génétique pourrait

être un levier utile dans la lutte contre *Microdochium*. Il a également permis de mettre en évidence des verrous méthodologiques notamment dans la maîtrise des inoculations artificielles. Les limites identifiées sont en partie liées aux manques de connaissances sur la biologie de ces champignons. Ainsi, des efforts de recherche doivent être menés en axant les travaux autour de la compréhension et la maîtrise des infections de *Microdochium* spp. afin de fournir à la filière céréalière française, des méthodes et outils pour optimiser la sélection de variétés tolérantes et lutter ainsi plus efficacement contre la microdochiose. Ces travaux seront menés dans le cadre du nouveau projet FSOV : FSOV RESISTAMICRO.

## Références bibliographiques

**Observation CartoFusa**, 2013. BayerCropScience, Communication personnelle

**Gourdain E., Batina H., Du Cheyron P., Foureay A., Gélisse S., Grignon G., Laval V., Maumené C., Méléard B. et Valade R.**, 2016. Lutte contre les fusarioses des épis de blés : quantification des espèces du complexe fusarien, facteurs de risque et méthodes de lutte, *Innovations agronomiques*, vol. 49, pp. 133-145.

**Walker A.S., Auclair C., Gredt M., Leroux P.**, 2009. First occurrence of resistance to strobilurin fungicides in *Microdochium nivale* and *Microdochium majus* from France naturally infected wheat grains. *Pest management Science*, vol. 65 (8), pp 906-915

**Parry D.W., Rezanoor H.N., Pettitt T.R., Hare M.C., Nicholson P.**, 2008. Analysis of *Microdochium nivale* isolates from wheat in the UK during 1993. *Annals of Applied Biology*, vol 126 (3), pp 449-455

**ANR DON&CO** (2010-2013) - Mycotoxinogénèse chez le blé : de la diversité de la microflore fusarienne à la toxicologie. INRA MycSA (coordinateur) Arvalis-Institut du végétal, INRA Bioger), INRA Agroécologie, INRA Toxalim, ENVT, INRA BIOGECO.

**CASDAR ECOFUSA** (2010-2013) - Lutte contre les fusarioses des épis de blés : de l'utilisation raisonnée des fongicides aux méthodes de luttés alternatives. ARVALIS – Institut du végétal Coordinateur), INRA BIOGER, INRA MycSA.