

# FSOV 4D : MICRODOCHIUM

**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**

**VALADE Romain**



Florimond Desprez\*

KWS MOMONT

Syngenta

RAGT2n

Limagrain Europe

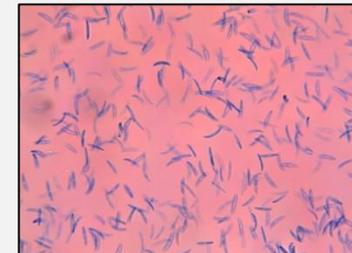
SECOBRA Recherches

Unisigma

Caussade Semences

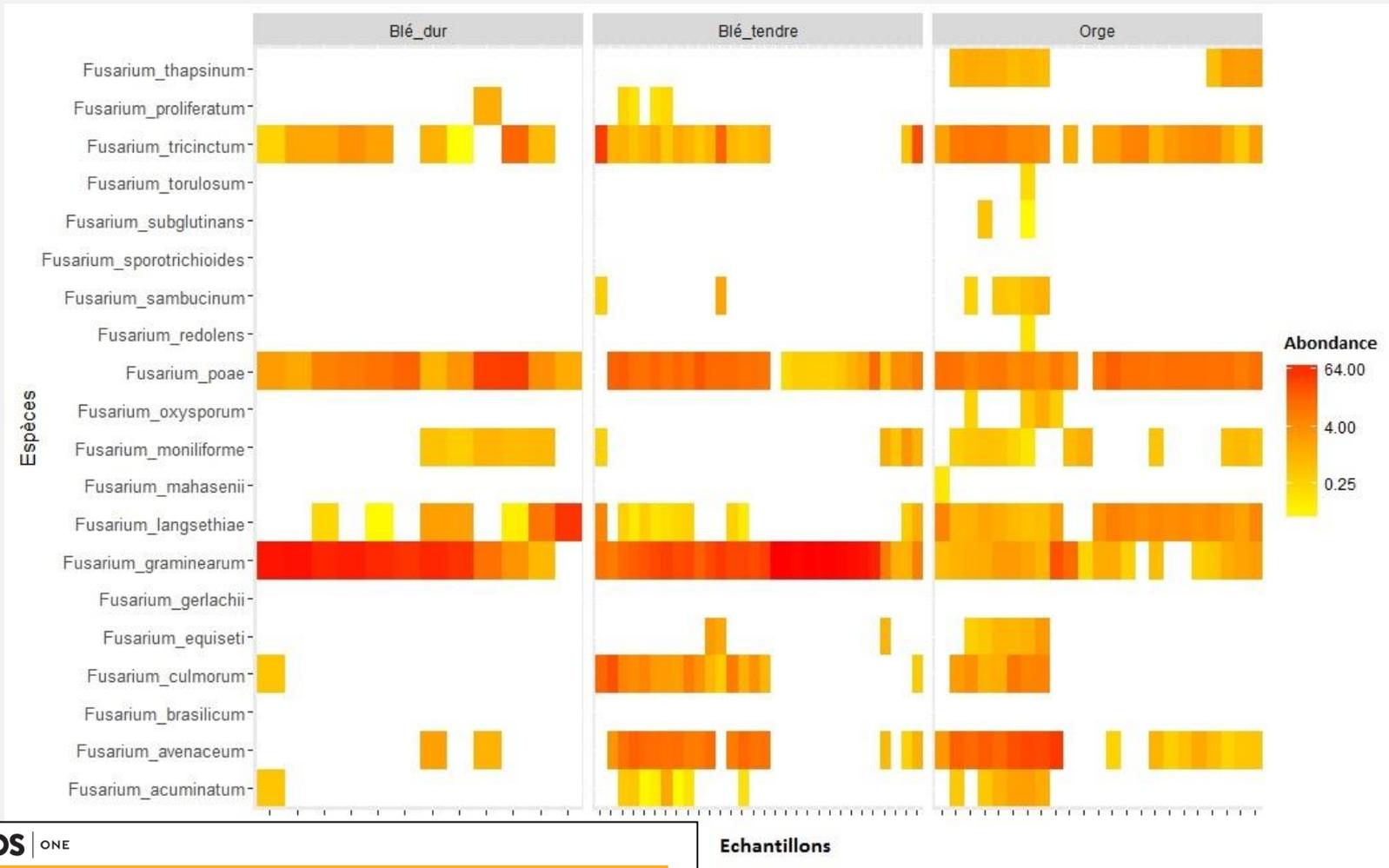
ASUR Plant Breeding

Agri Obtentions



# FUSARIOSE DES ÉPIS → COMPLEXE D'ESPÈCES

## LES *FUSARIUM* ET *MICRODOCHIUM*



✓ *Fusarium* : Espèces productrices de mycotoxines → risque sanitaire

# MICRODOCHIUM SUR CÉRÉALES: 2 ESPÈCES INDIFFÉRENCIABLES

- ✓ **Wollenweber (1930)** propose pour la première fois la reconnaissance de deux sous-espèces:

*Fusarium nivale* var. *nivale* et *Fusarium nivale* var. *majus*

- ✓ **Samuels & Hallet (1981)** => Déplacé dans le genre *Microdochium* (1 espèce pour 2 sous-espèces)

*Microdochium nivale* var. *nivale* et *Microdochium nivale* var. *majus*

**=> 2 espèces distinctes décrites et validées par des outils moléculaires:**

***Microdochium nivale* et *Microdochium majus***

- ✓ Symptomatologie identique
- ✓ Différenciation par l'observation des conidies serait possible au microscope mais très complexe et risque d'erreurs très important
- ✓ Différenciation par des outils moléculaires (PCR, qPCR...)
- ✓ Spécificité d'hôtes ainsi que de légères différences de T° optimales
- ✓ Organes végétatifs préférentiels → *M. nivale* serait plus responsable de la fonte des semis alors que *M. majus* serait plus agressif sur feuilles et épis

Journal of Applied Microbiology, 2005, 99, 1033-1038. © 2005 British Microscopical Society.  
doi:10.1111/j.1365-2656.2005.003370.x Printed in the United Kingdom.

**Phylogenetic analysis of EF-T alpha gene sequences from isolates of *Microdochium nivale* leads to elevation of varieties *majus* and *nivale* to species status**

NELSON, D. V. & MARTIN, C. H. (2005) DAVY, M. T., HARRY, J. & SIMMONS, G. (2005)  
Harper Adams University College, Newport, Shropshire TF10 8NB, UK.  
E-mail: nglynn@sax.ars.usda.gov

Received 18 April 2004; accepted 16 May 2005.

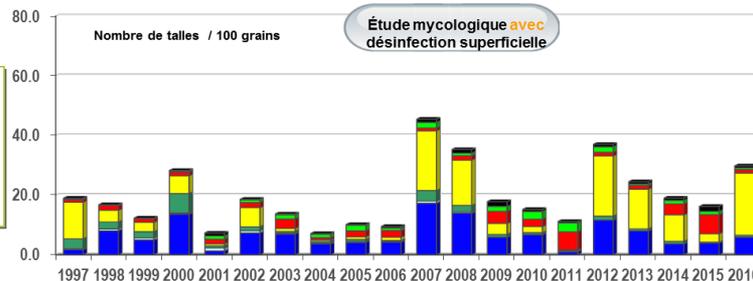
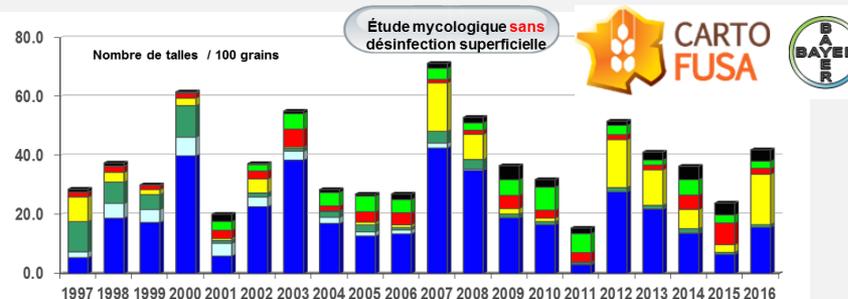


# MICRODOCHIUM SUR CÉRÉALES: UNE MALADIE DOMINANTE ET PRÉJUDICIABLE?

- Pas de mycotoxines → risque sanitaire nul
  - Pink snow mold → assez rare en France sur céréales
  - Quelle fréquence en France?
  - Nuisibilité pouvant atteindre 20qx/ha (Données Arvalis)
- Présence significative 1 année sur 2 depuis 10 ans

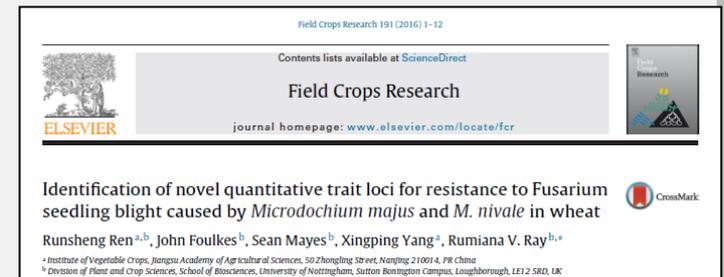


■ *F. graminearum*  
■ *F. culmorum*  
■ *F. avenaceum*  
■ *Microdochium spp*  
■ *F. poae*  
■ *F. tricinctum*  
■ Autres fusarium

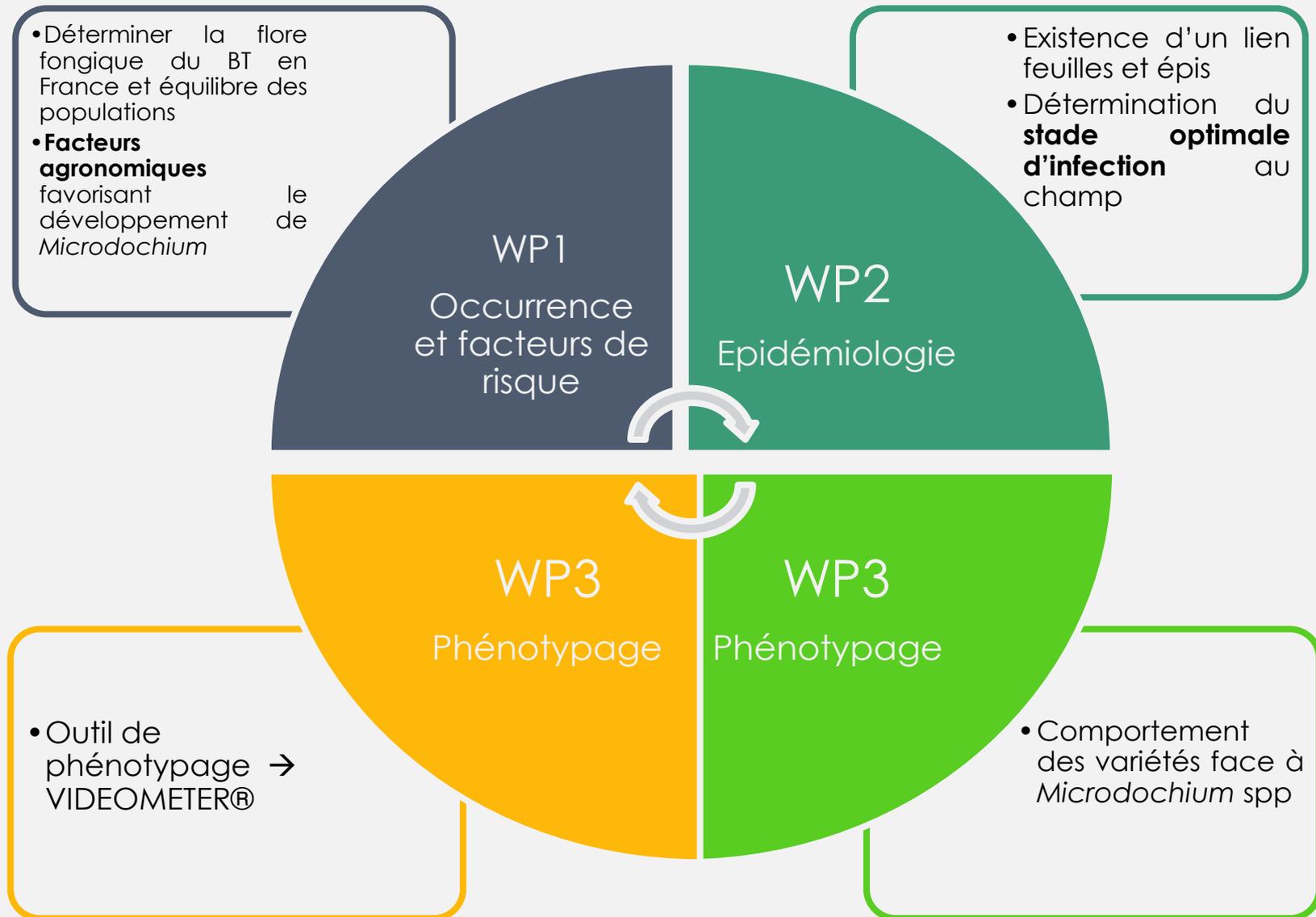


# MICRODOCHIUM SUR CÉRÉALES: QUID DE LA RÉSISTANCE VARIÉTALE?

- ✓ Intensivement travaillée pour *F. graminearum*:
  - ✓ Nombreuses équipes de recherche
  - ✓ Nombreux projets et résultats
  - ✓ Nombreux QTL identifiés
  - ✓ Notes de sensibilité variétale
- ✓ *Microdochium*?
  - ✓ QTL déterminés pour le FSB (1AL et 2BS)
  - ✓ QTL déterminés pour le FHB :
    - *M. majus*: 4A, 5B, 7D
    - *M. nivale*: 1D
    - Résistance FSB et FHB différente
    - Espèce spécifique?



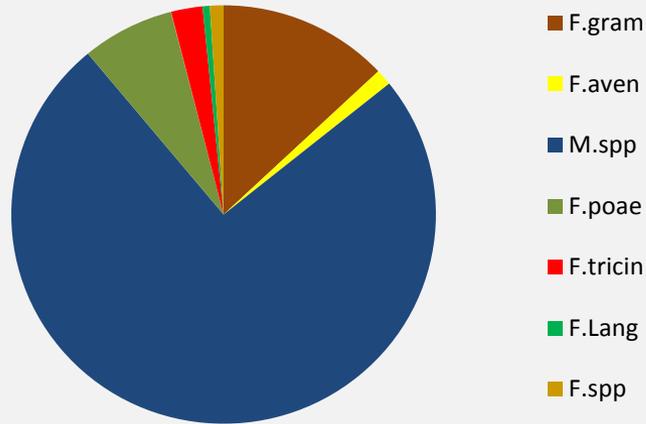
# LE PROJET FSOV 2014 MICRODOCHIUM: OBJECTIFS





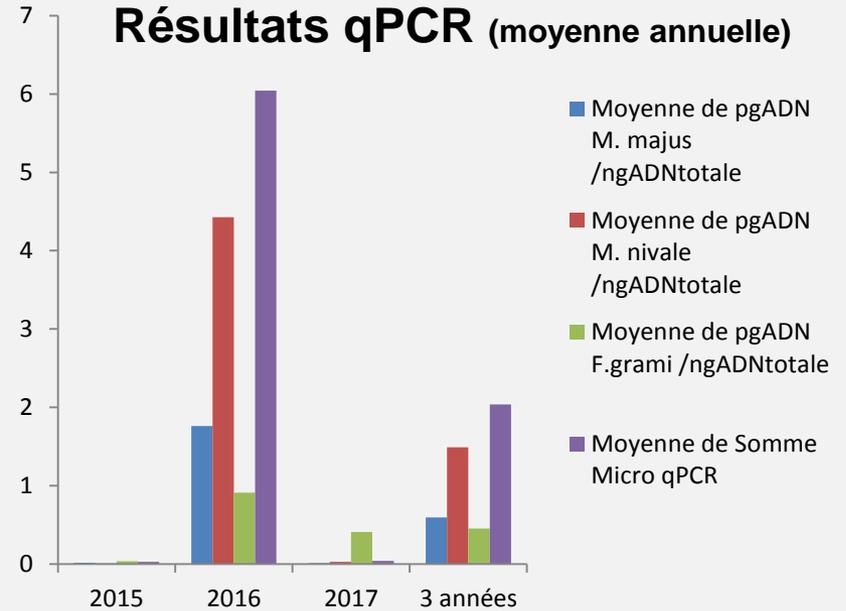
# Occurrence et facteurs agronomiques associés

Flore fusarienne (2015 à 2017)

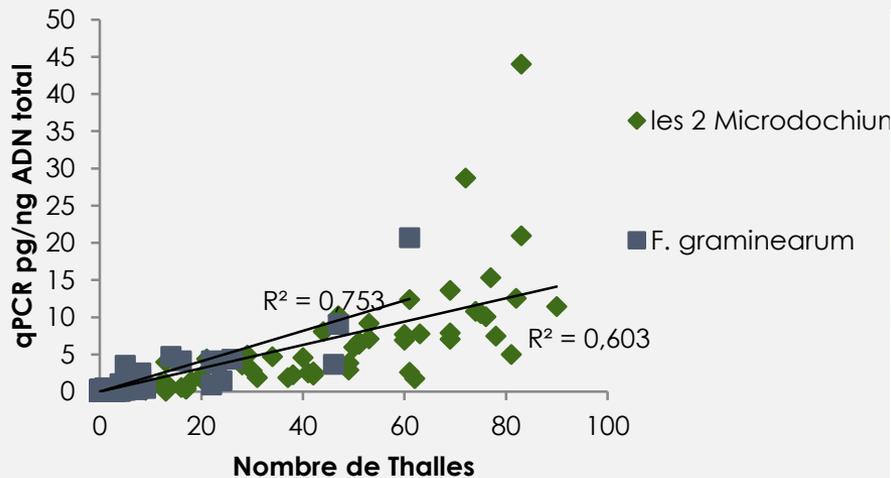


→ 75% de la flore identifiée attribuée à *Microdochium*

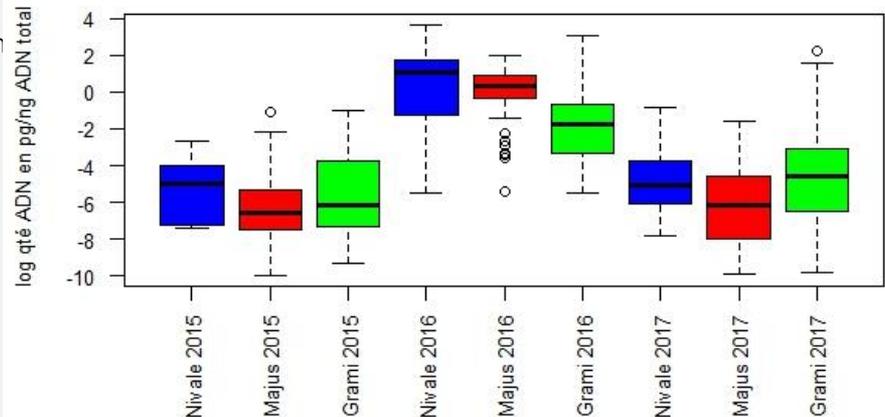
Résultats qPCR (moyenne annuelle)



→ « Prédominance » de *M. nivale*



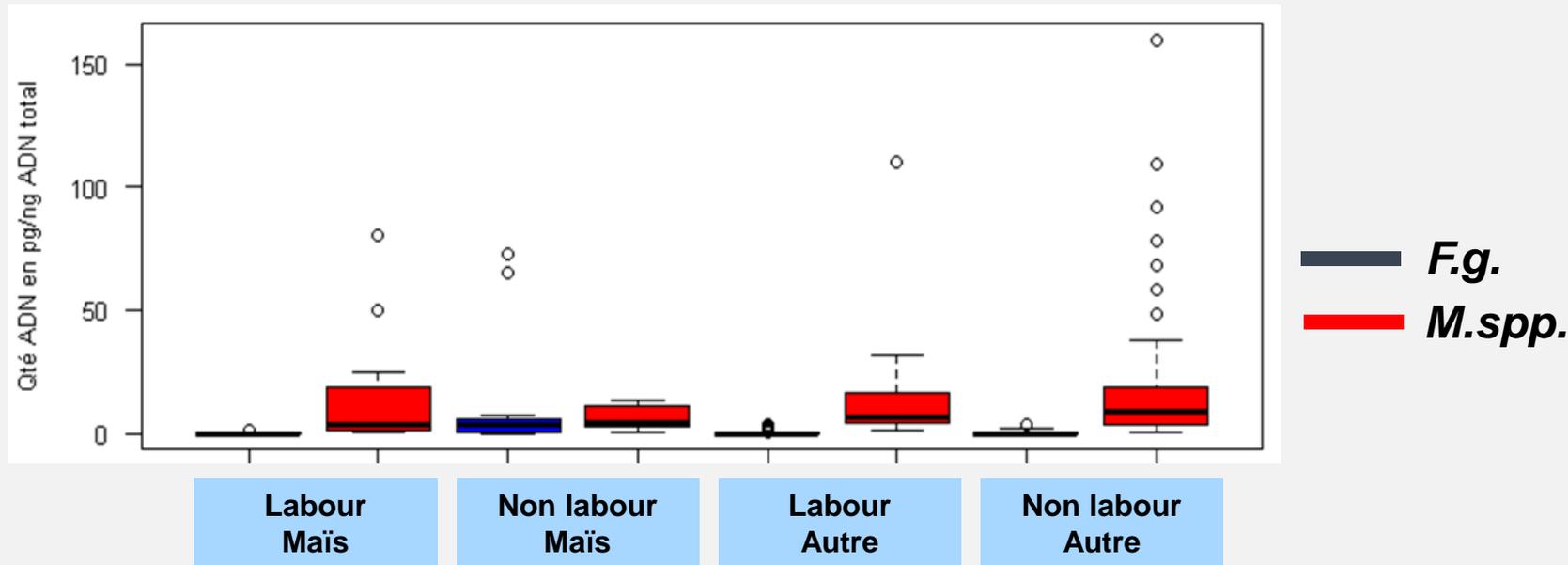
Quantité d'ADN des champignons selon années



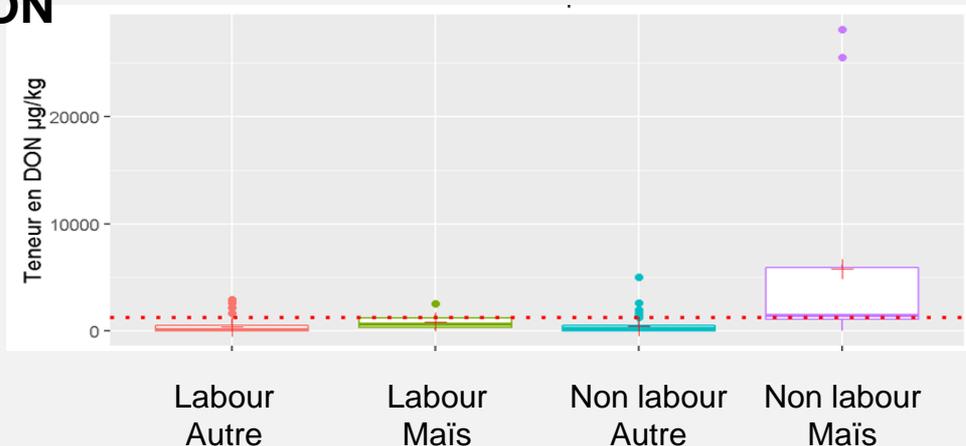
# Occurrence et facteurs agronomiques associés

Analyses de 149 échantillons 2016 prélevés avant maturité

## Analyses qPCR de la flore fongique sur épis



## DON



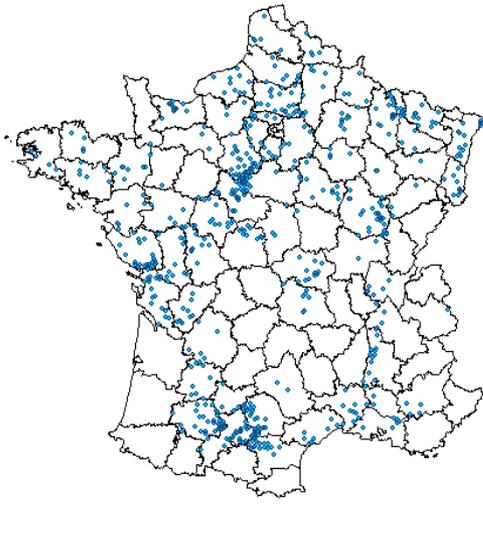
- ✓ *Microdochium* dominant en 2016 dans toutes les situations agronomiques
- ✓ *F. graminearum*. présent surtout après maïs et non labour
- ✓ Impact de l'agronomie faible?



# Occurrence et facteurs agronomiques associés

- LES DONNÉES
- 861 parcelles de Blé tendre & Blé dur
- qPCR *Microdochium nivale*, *M. majus* et *F. graminearum*

Localisation des parcelles enquêtes agriculteurs 2007-2017



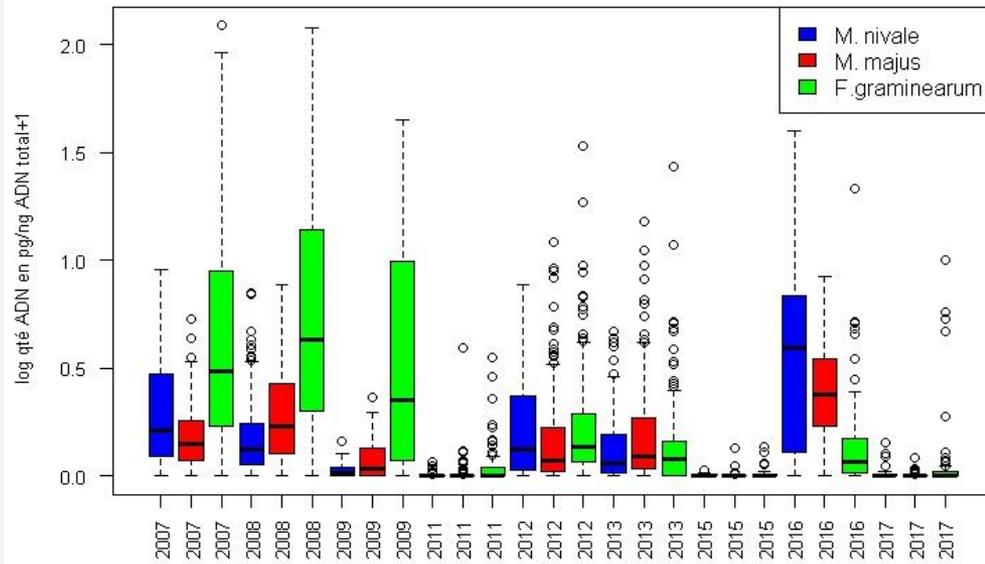
Enquêtes ARVALIS- FAM

(861 parcelles localisées)



# OCCURRENCE ET FACTEURS AGRONOMIQUES ASSOCIÉS

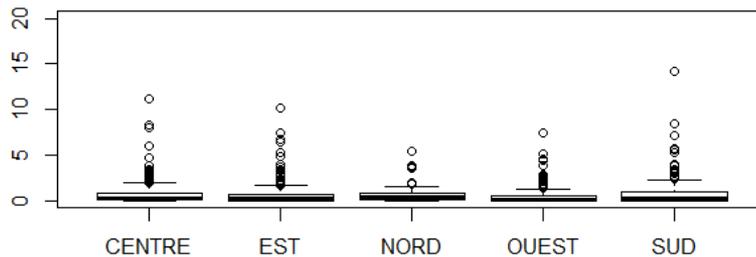
## DISTRIBUTION DES DONNÉES PAR ANNÉE ET RÉGION



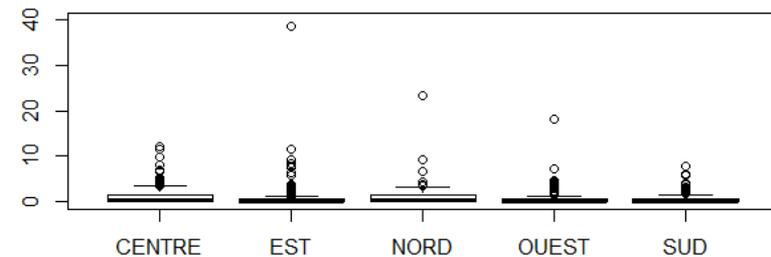
Annee	nb	MM.moy	MN.moy
2007	130	0.62	1.33
2008	104	1.25	0.75
2009	39	0.24	0.07
2011	122	0.04	0.11
2012	169	0.76	0.84
2013	157	0.89	0.44
2015	30	0.02	0.01
2016	60	1.76	4.43
2017	60	0.01	0.03

→ Variabilité interannuelle marquée  
→ Forte pression en 2016

M majus



M nivale



→ Présence de *Microdochium* dans toutes les régions

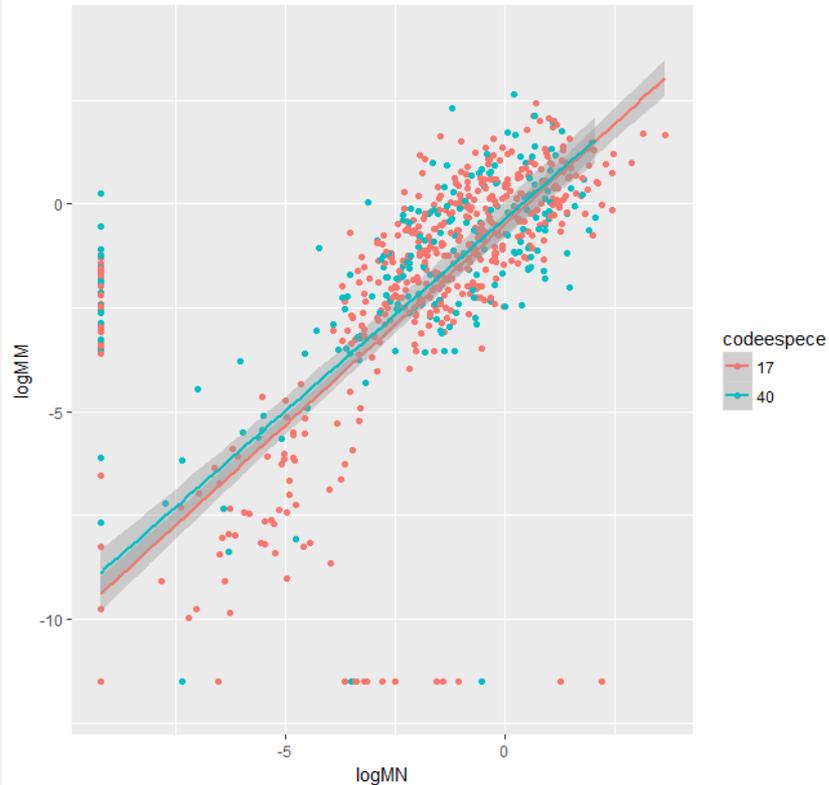
# OCCURRENCE ET FACTEURS AGRONOMIQUES ASSOCIÉS

## ÉTUDE DES CORRÉLATIONS ENTRE ESPÈCES DE MSPP

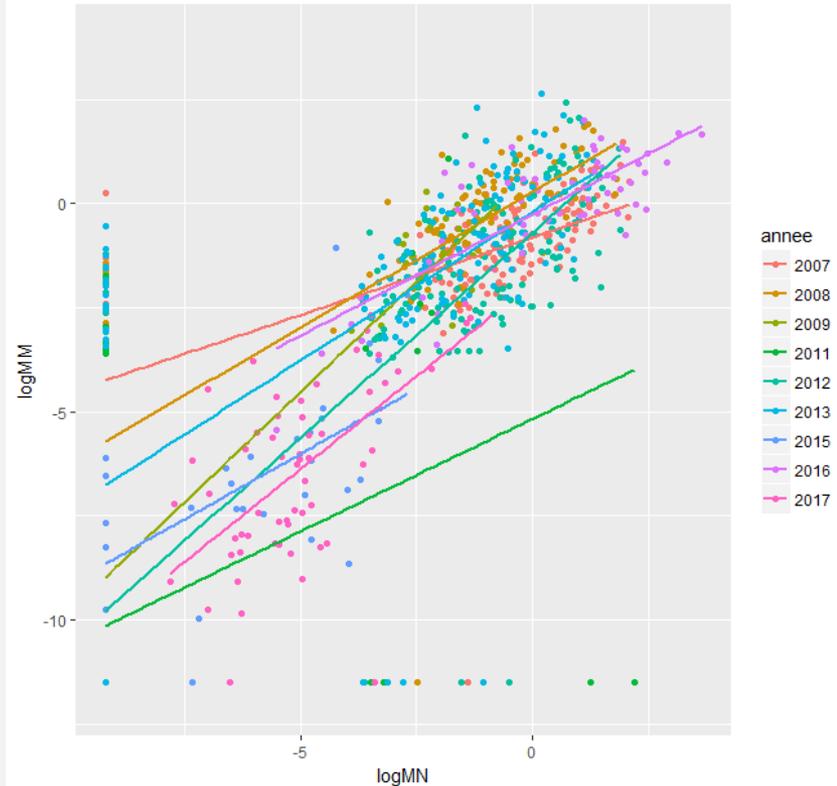
$r$  (blé tendre) = 0.80

$r$  (blé dur) = 0.81

correlation logMN / logMM - n17=591 - n40=280



correlation logMN / logMM - n = 869 donnees



- Corrélations significatives entre les deux espèces de *Microdochium*
- Pas d'exclusion avec *F. graminearum*

# OCCURRENCE ET FACTEURS AGRONOMIQUES ASSOCIÉS

## FACTEURS EXPLICATIFS?

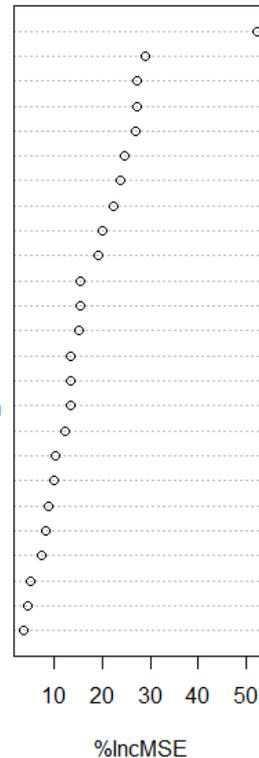
### Modèle 1 : Random Forest avec « agronomie »

**Log Mspp** ~ codeespece + annee + lambert93x + lambert93y + regionArvalis + wsol + precedent + fusariose.noteresistancevarietale + variables climatiques

### Modèle 2 : Random Forest uniquement sur variables climatiques

RF\_1

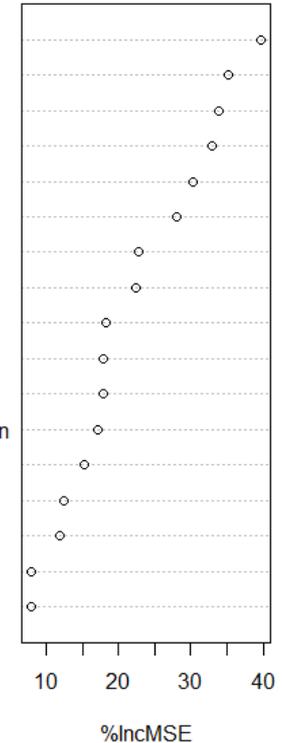
annee  
c1Pluiesup1\_et\_Tmoysup12epi1cmmaturite  
lambert93y  
Setpfloraison8jfloraison7j  
c1Pluiesup3\_et\_Tmoyinf19epiaisonmaturite  
Spluieflooraison9jfloraison8j  
Spluieepiaisonmaturite  
nTmoyinf19epiaisonmaturite  
lambert93x  
epiaison.jours  
ntmoysup16floraison8jfloraison3j  
c2Pluiesup02épiation1jfloraison3j  
regionArvalis  
fusariose.noteresistancevarietale  
nTMoysup149floraison15jfloraison3j  
c1Pluiesup1\_et\_Tmoysup2\_et\_Tmoyinf2leveeepiaison  
ntmininf4leveeepiaison  
precedent  
stmoyepi1cmfloraison7j  
c1TMaxiinf30\_et\_TMinisup11épiation12jfloraison3j  
nTmoysup9floraison19jfloraison3j  
codeespece  
c1Tmoysup16\_et\_Pluiessup1floraison9jfloraison3j  
c1Pluiesup1\_et\_Tmoy1sup179floraison8jfloraison7j  
wsol



**Le modèle explique 64% de la variance totale**

RF\_2

Setpfloraison8jfloraison7j  
Spluieflooraison9jfloraison8j  
c1Pluiesup1\_et\_Tmoysup12epi1cmmaturite  
nTmoyinf19epiaisonmaturite  
c1Pluiesup3\_et\_Tmoyinf19epiaisonmaturite  
Spluieepiaisonmaturite  
c2Pluiesup02épiation1jfloraison3j  
epiaison.jours  
nTMoysup149floraison15jfloraison3j  
ntmoysup16floraison8jfloraison3j  
ntmininf4leveeepiaison  
c1Pluiesup1\_et\_Tmoysup2\_et\_Tmoyinf2leveeepiaison  
stmoyepi1cmfloraison7j  
nTmoysup9floraison19jfloraison3j  
c1TMaxiinf30\_et\_TMinisup11épiation12jfloraison3j  
c1Tmoysup16\_et\_Pluiessup1floraison9jfloraison3j  
c1Pluiesup1\_et\_Tmoy1sup179floraison8jfloraison7j



**Le modèle explique 59% de la variance totale**

→ Agronomie pèse très peu

→ La pluie et les températures <19°C à floraison et post floraison favorise *Microdochium*

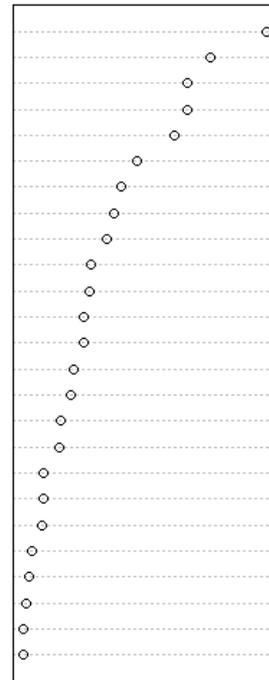


# OCCURRENCE ET FACTEURS AGRONOMIQUES ASSOCIÉS

## FACTEURS EXPLICATIFS DE LA PRÉSENCE DE M. NIVALE VS M. MAJUS?

RF\_mn1

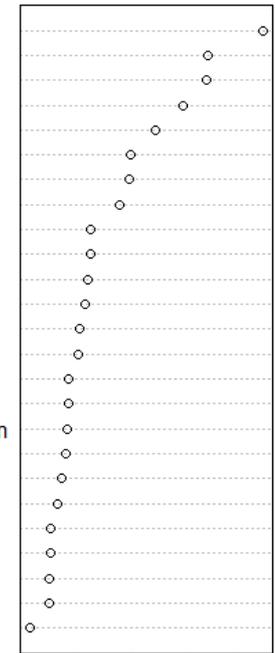
annee  
 Setpfloraison8jfloraison7j  
 Spluieepiaisonmaturite  
 c1Pluiesup3\_et\_Tmoyinf19epiaisonmaturite  
 c1Pluiesup1\_et\_Tmoysup12epi1cmmaturite  
 lambert93y  
 Spluiefleuraison9jfloraison8j  
 nTmoyinf19epiaisonmaturite  
 lambert93x  
 regionArvalis  
 c2Pluiesup02épiaison1jfloraison3j  
 c1Pluiesup1\_et\_Tmoysup2\_et\_Tmoyinf2leveepiaison  
 epiaison.jours  
 ntmmininf4leveepiaison  
 ntmoyinsup16floraison8jfloraison3j  
 c1TMaxiinf30\_et\_TMinisup11épiaison12jfloraison3j  
 stmoyepi1cmfloraison7j  
 precedent  
 codeespece  
 c1Tmoysup16\_et\_Pluiesup1floraison9jfloraison3j  
 nTmoysup149floraison15jfloraison3j  
 nTmoysup9floraison19jfloraison3j  
 wsol  
 fusariose.noteresistancevarietale  
 c1Pluiesup1\_et\_Tmoy1sup179floraison8jfloraison7j



10 20 30 40  
 MeanDecreaseAccuracy

RF\_mm1

annee  
 c1Pluiesup1\_et\_Tmoysup12epi1cmmaturite  
 Spluieepiaisonmaturite  
 Setpfloraison8jfloraison7j  
 c1Pluiesup3\_et\_Tmoyinf19epiaisonmaturite  
 nTmoyinf19epiaisonmaturite  
 Spluiefleuraison9jfloraison8j  
 c2Pluiesup02épiaison1jfloraison3j  
 ntmoyinsup16floraison8jfloraison3j  
 lambert93x  
 lambert93y  
 ntmmininf4leveepiaison  
 epiaison.jours  
 fusariose.noteresistancevarietale  
 stmoyepi1cmfloraison7j  
 c1Tmoysup16\_et\_Pluiesup1floraison9jfloraison3j  
 c1Pluiesup1\_et\_Tmoysup2\_et\_Tmoyinf2leveepiaison  
 c1TMaxiinf30\_et\_TMinisup11épiaison12jfloraison3j  
 regionArvalis  
 wsol  
 nTmoysup9floraison19jfloraison3j  
 c1Pluiesup1\_et\_Tmoy1sup179floraison8jfloraison7j  
 nTmoysup149floraison15jfloraison3j  
 codeespece  
 precedent



0 10 20 30 40  
 MeanDecreaseAccuracy

→ Sensiblement les mêmes variables qui ressortent en tête des facteurs explicatifs

# PHÉNOTYPAGE AUX CHAMPS:

## DÉTERMINATION D'UN PROTOCOLE OPTIMALE D'INFECTION ARTIFICIELLE

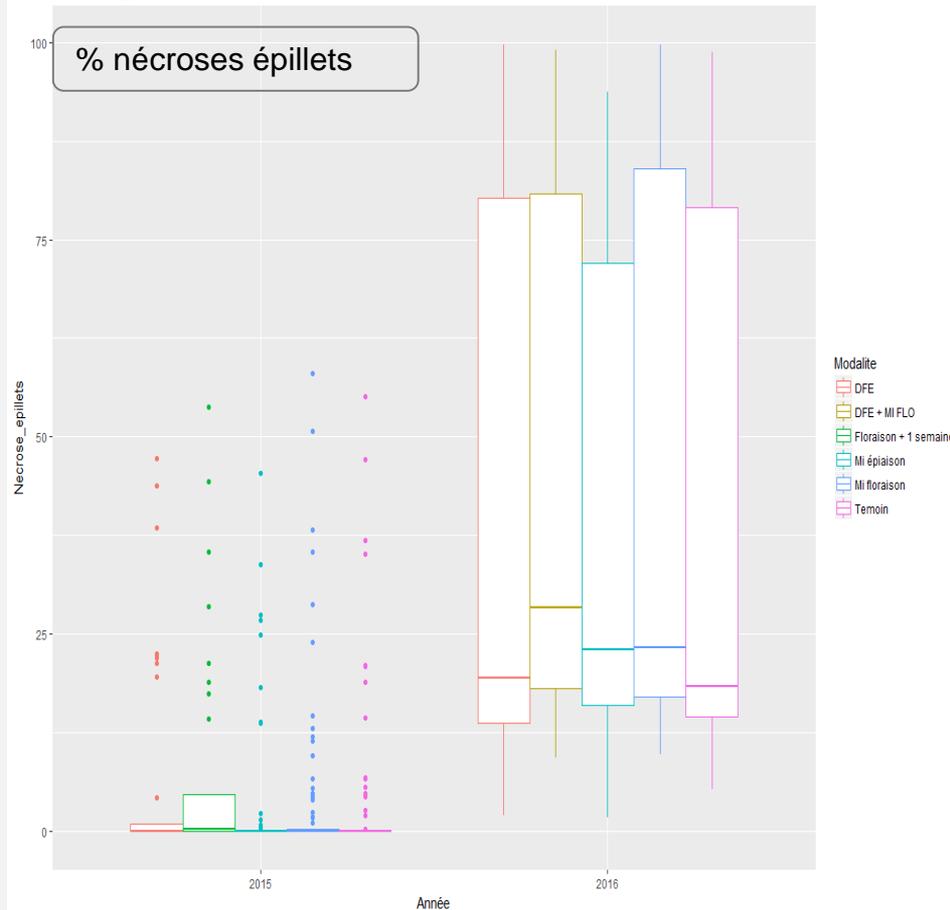
- 2 années d'essais
- 3 sites
- 4 variétés :
  - Cellule
  - Oregrain
  - Arezzo
  - Premio
- Inoculation avec *M. nivale*
- 4 stades distincts + 1 témoin :
  - Dernières feuilles étalées (Z39)
  - Mi épisaison (Z55)
  - Mi floraison (Z65)
  - 1 semaine après la fin floraison (Z69)
  - Sans inoculation = témoin
- Prélèvements et notations à plusieurs dates sur feuille et épis
- Analyses qPCR des feuilles, des épis et des grains



# PHÉNOTYPAGE AUX CHAMPS: DÉTERMINATION D'UN PROTOCOLE OPTIMALE D'INFECTION ARTIFICIELLE

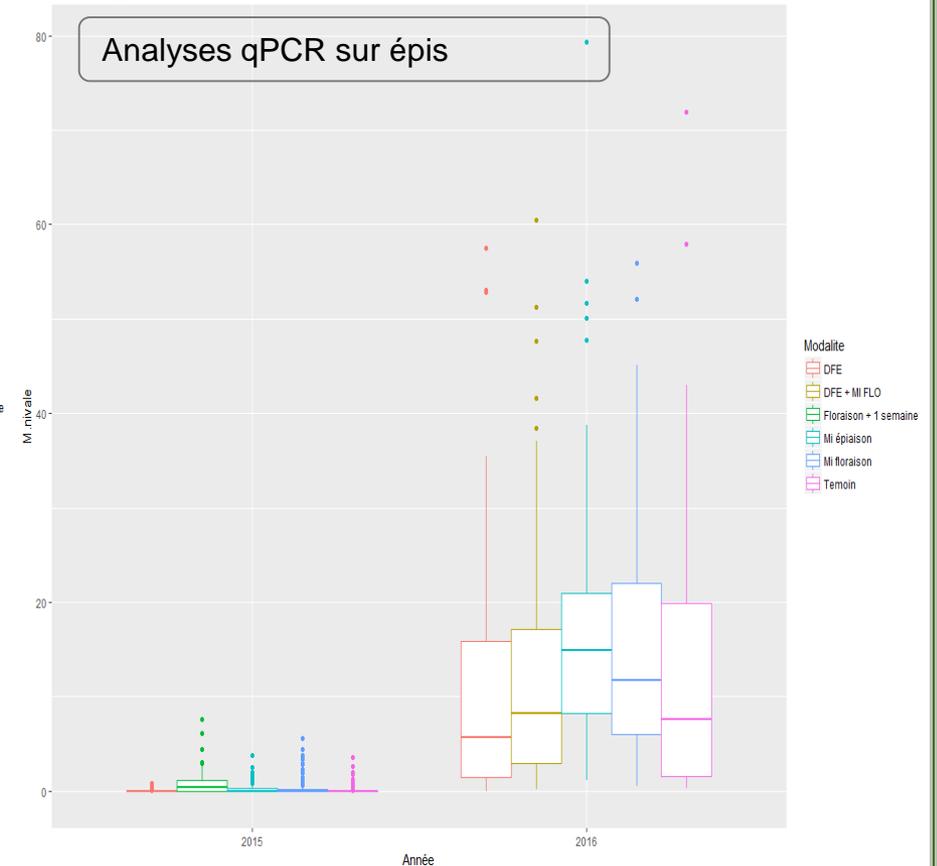
BOXPLOT\_Effet Année

% nécroses épislets



BOXPLOT\_Effet Année

Analyses qPCR sur épis



→ Effet année très important (+ des effets sites)

# PHÉNOTYPAGE AU CHAMP:

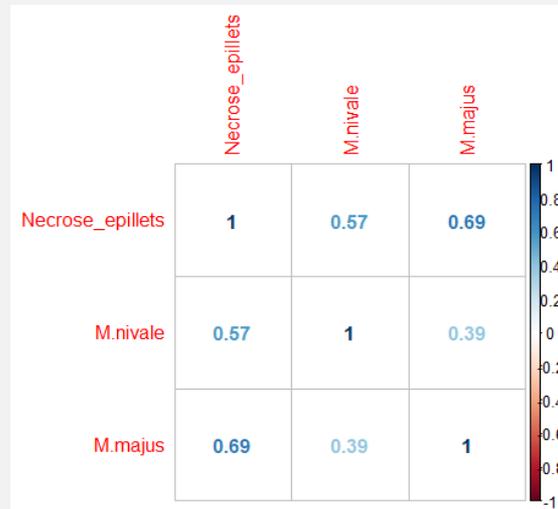
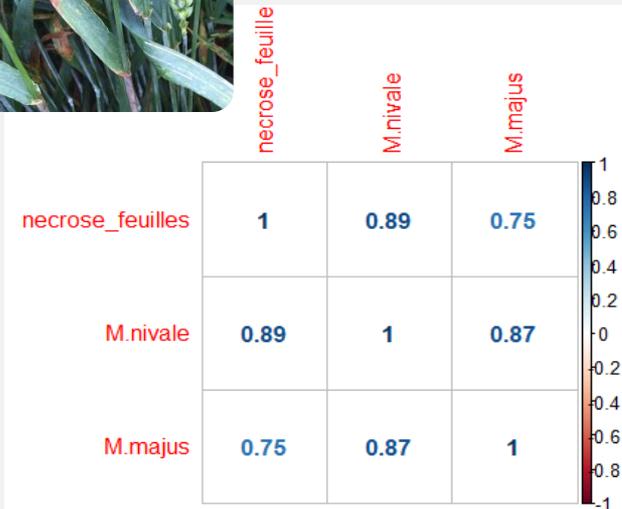
## DÉTERMINATION D'UN PROTOCOLE OPTIMALE D'INFECTION ARTIFICIELLE



Feuilles



Epis



```
> cld(moy_var, Letters=c(LETTERS))
Modalite      lsmean      SE  df  lower.CL upper.CL .group
DFE           10.25227  2.660480 139  4.992025 15.51251  A
Temoin        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
```

➤ Très bonne corrélation entre les notations visuelles et les données moléculaires

➤ Pas de différences significatives entre les modalités

➤ Corrélation notations et qPCR plus faibles pour le pourcentage d'épillets (liée à la présence de *F. graminearum*)

➤ Les analyses statistiques montrent un léger effet modalité: **applications à Mi-floraison & Mi-épiaison**

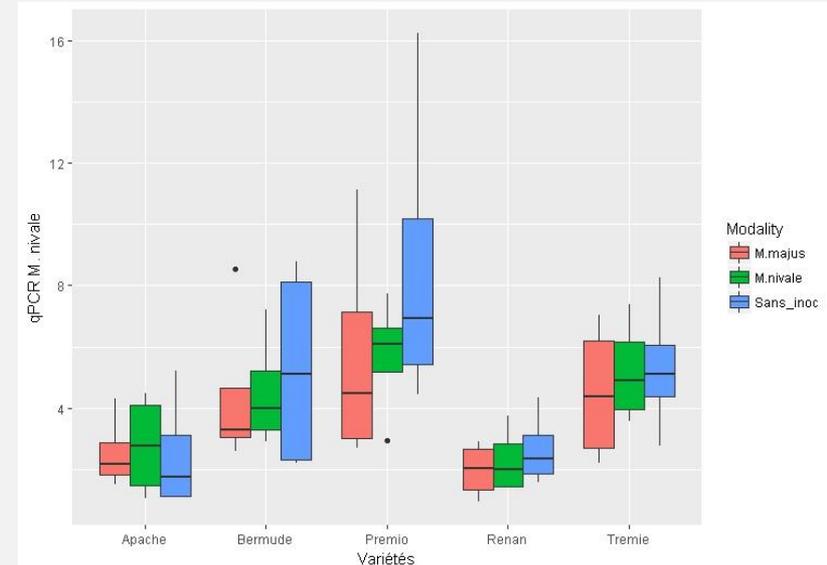
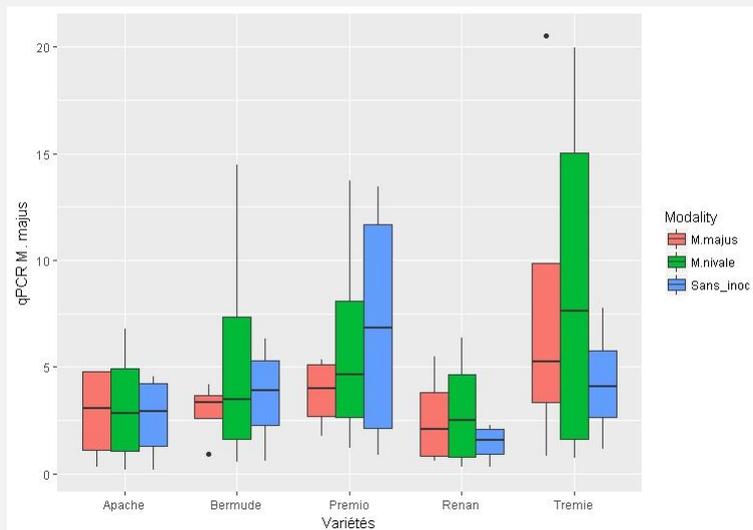
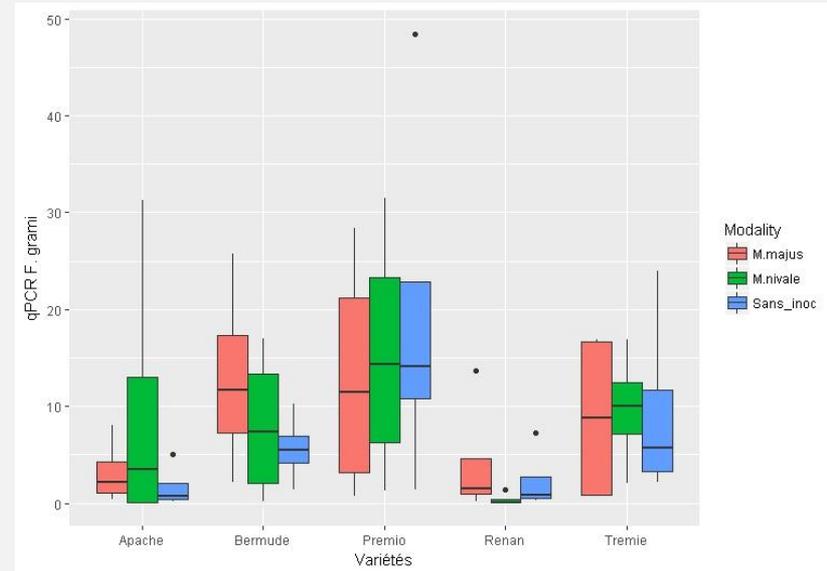
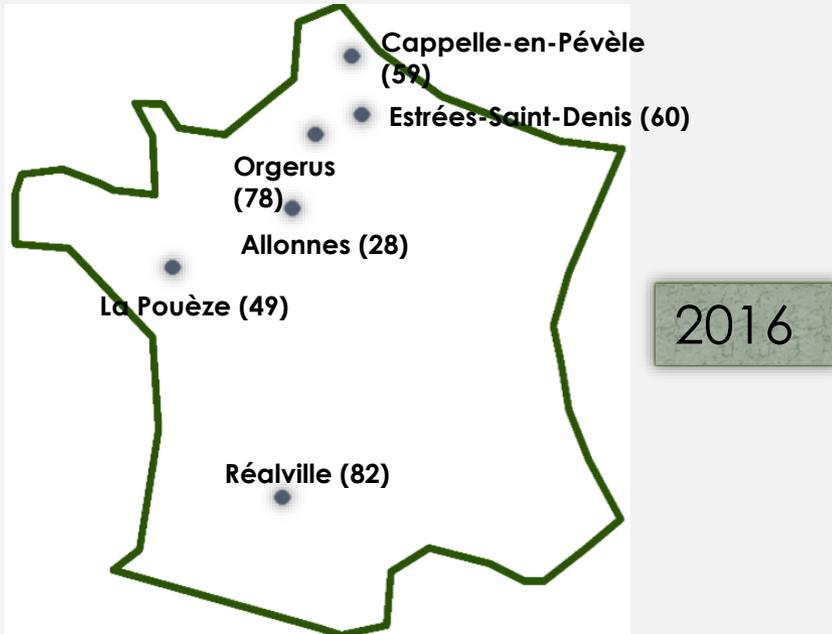
# Phénotypage au champ:

## Evaluation de la sensibilité variétale

- **2 années d'essai: 2016 et 2017**
- **45 variétés :**
  - **40 variétés récentes**
  - **4 témoins** connues pour leur sensibilité/résistance à la fusariose **+ 1 témoin** avec une sensibilité marquée pour *Microdochium* spp.
- **Création de 2 sous-panels de 25**
  - **20 variétés** réparties en 5 groupes de précocité **+ 5 témoins**
  - **les 2 sous-panels** sont répartis sur **12 lieux** différents sur **2 ans**.
- **Semis en pépinière maladie avec irrigation**
- **3 modalités :**
  - Inoculation par *M. nivale*
  - Inoculation avec *M. majus*
  - Aucune inoculation
- Chaque **modalité** comporte **2 répétitions**
- **Contamination en 2 ou 3 applications :**
  - année 2 : **au stade DFE**, soit dernière feuille étalée et **à mi-floraison** (pour chaque groupe de précocité)
  - année 3 : **3 inoculations (DFE+ mi-épaisseur+ mi-floraison)**
- Plusieurs notations sur feuilles et épis
- Tous les témoins ont été analysés en qPCR ainsi que les grains de toutes les variétés des 4 essais les plus pertinents (2 essais par an)

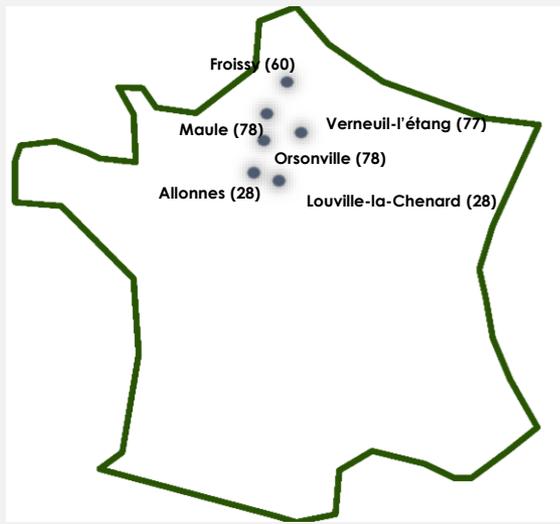
# Phénotypage au champ:

## Evaluation de la sensibilité variétale

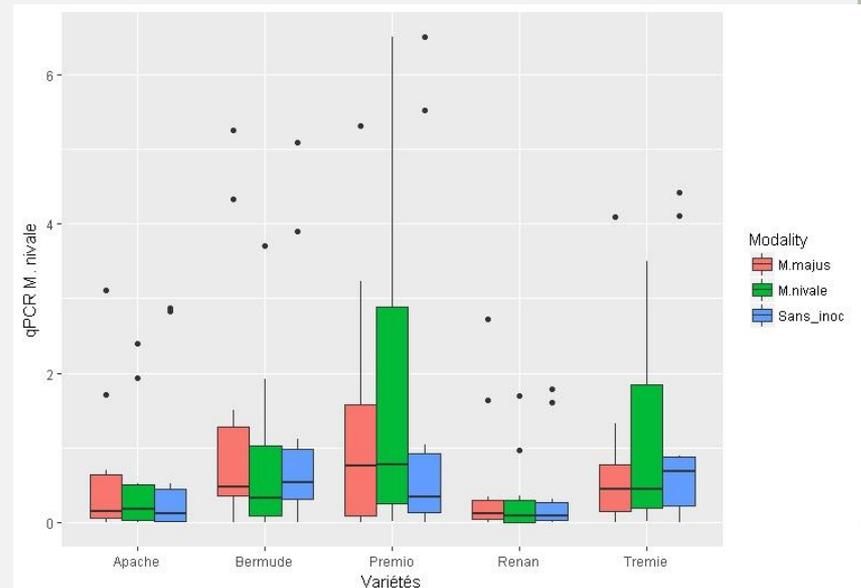
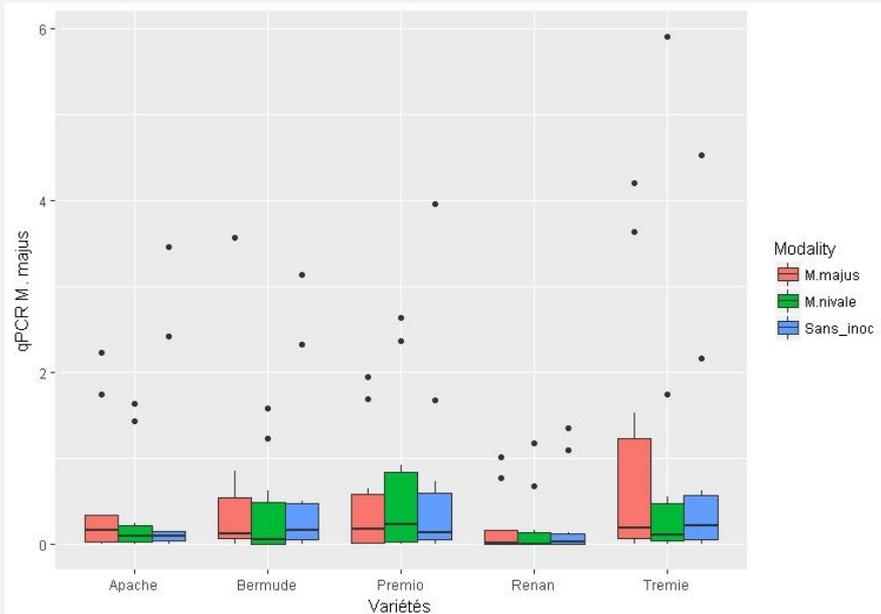
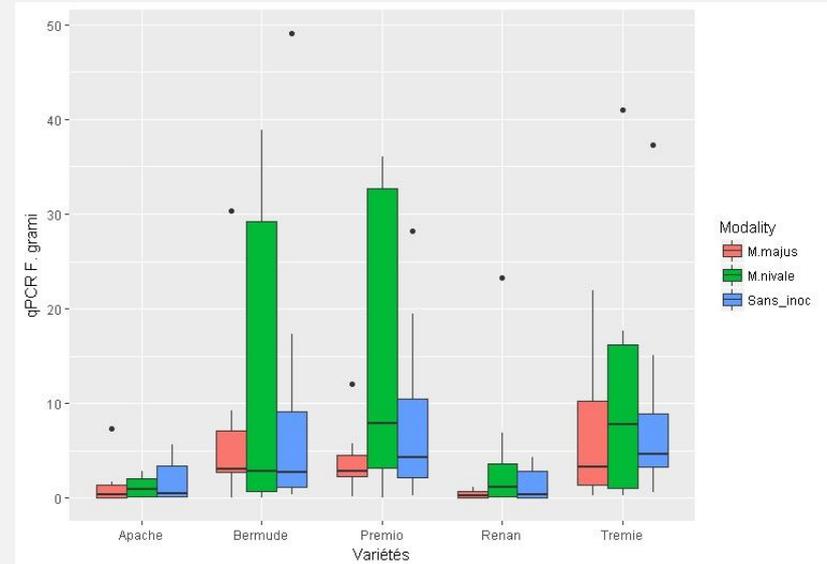


# Phénotypage au champ:

## Evaluation de la sensibilité variétale

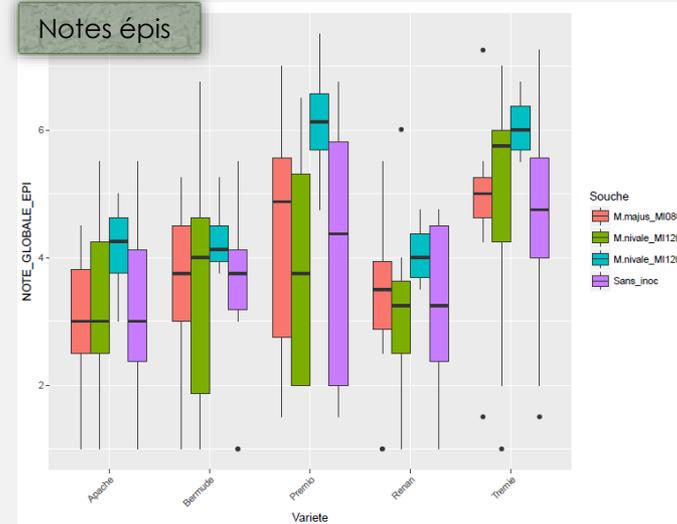
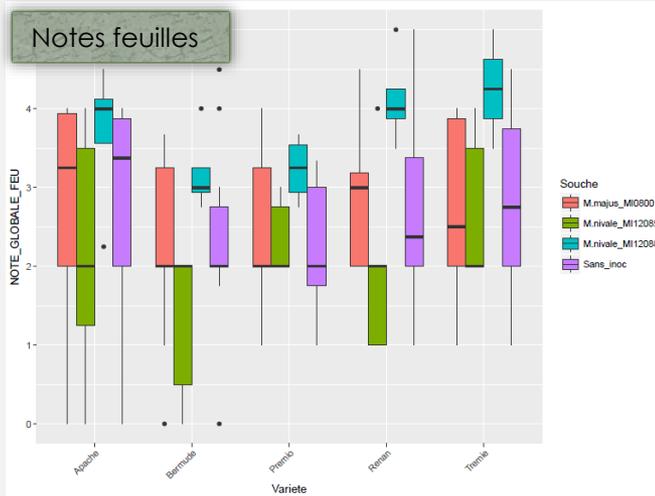


2017



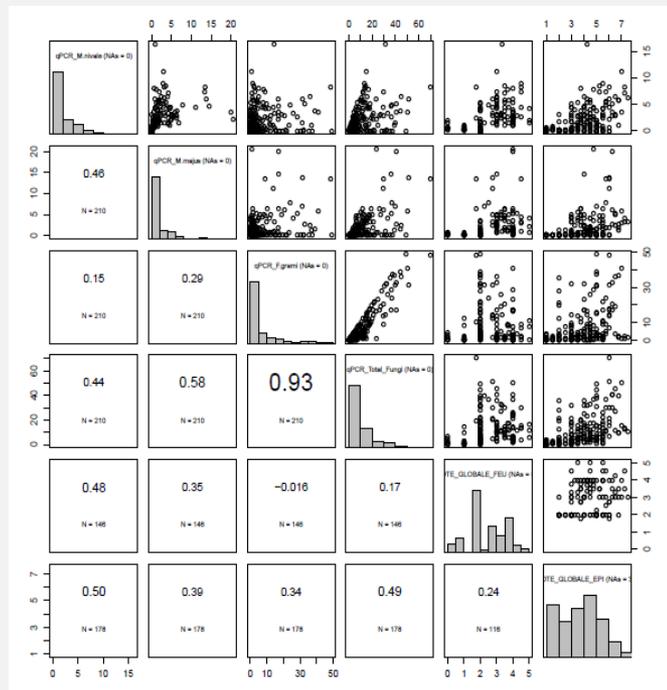
# Phénotypage au champ:

## Evaluation de la sensibilité variétale



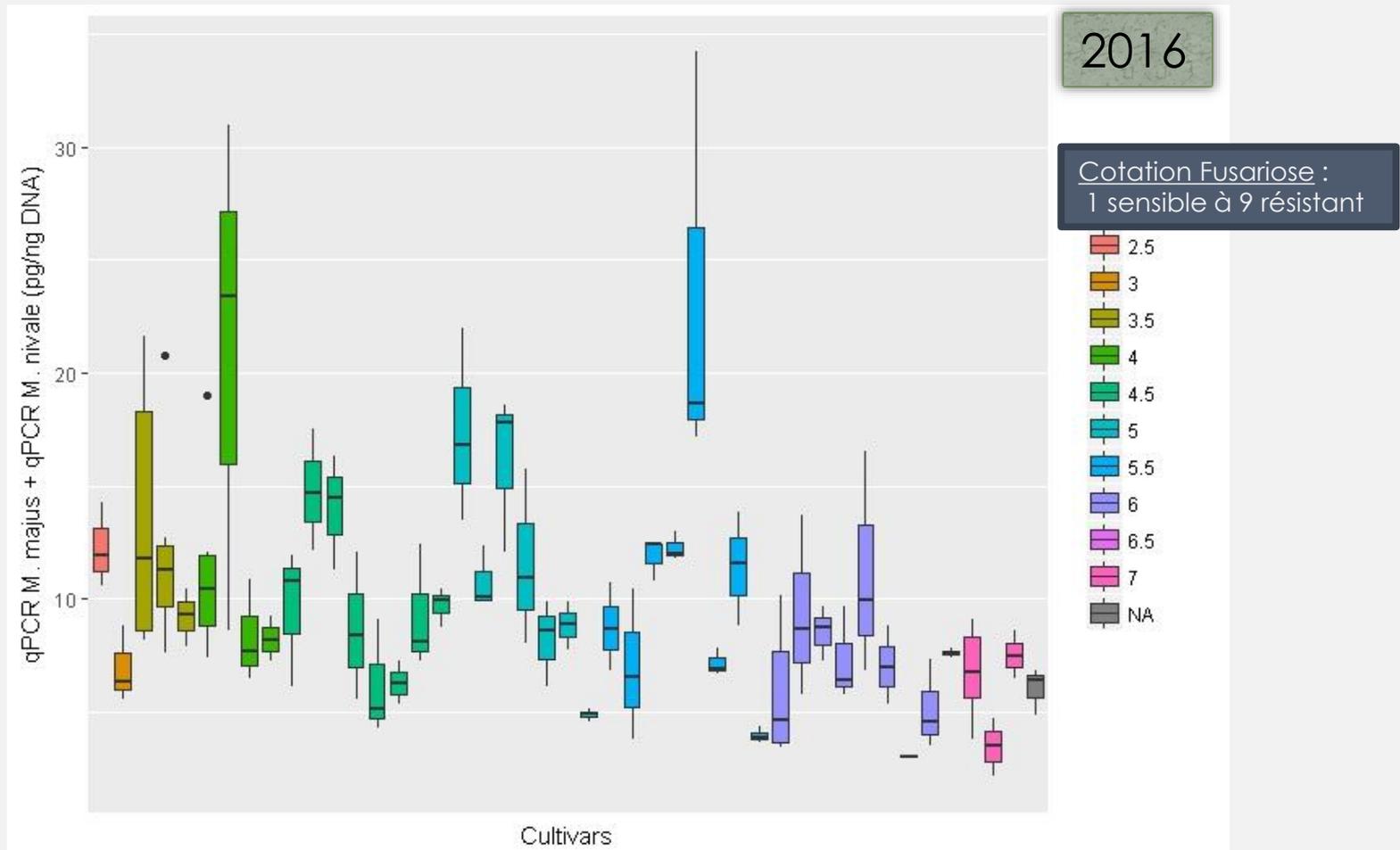
Factor	Trait	Df	Pr(>F)
Variete	qPCR_M.nivale	4	0.0004***
Variete	qPCR_M.majus	4	0.0545*
Variete	qPCR_F.grami	4	1.780e-06***
Variete	qPCR_Total_Fungi	4	7.079e-08***
Variete	NOTE_GLOBALE_FEU	4	0.1142
Variete	NOTE_GLOBALE_EPI	4	6.317e-06***

- **Différence variétale significative** entre les 5 témoins pour différents traits
- Corrélations faibles à moyennes entre les notations épis et les données de biomasses fongiques → Interactions avec *F. graminearum*



# Phénotypage au champ:

## Evaluation de la sensibilité variétale



- ✓ Différences variétales significatives → progrès génétique possible
- ✓ Tendence globale d'une réponse similaire à la résistance à *F. graminearum*
- ✓ Variabilité dans les différents groupes de notes CTPS

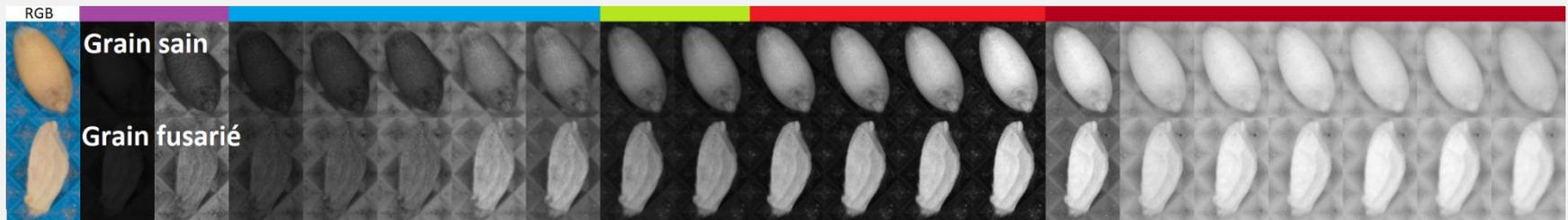
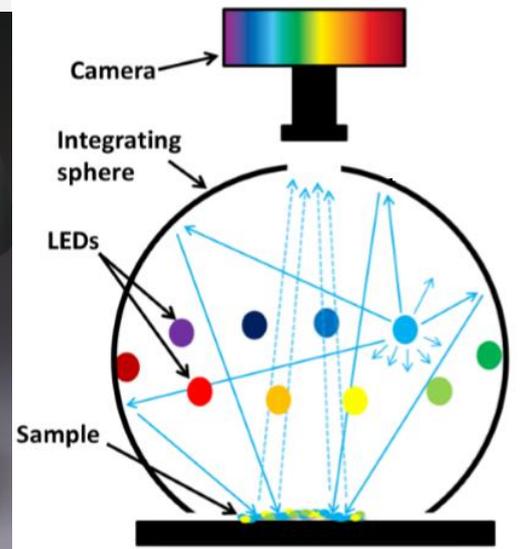
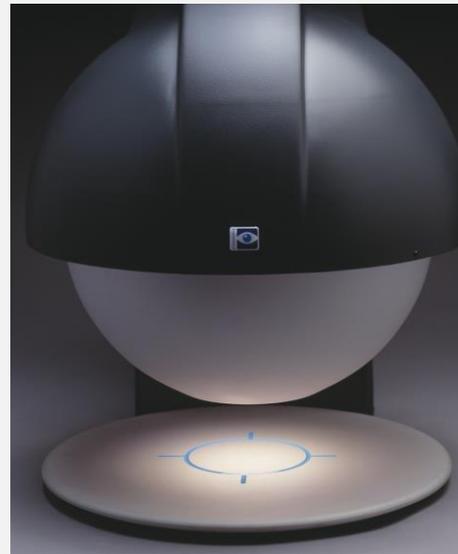
# Phénotypage par imagerie multispectrale : Evaluation de la sensibilité variétale

Imageur multispectrale : **Videometer  
Lab3**

Principe du Videometer : Eclairage de l'échantillon avec 20 LEDs de longueurs d'ondes différentes de 375nm à 970nm

1 acquisition ⇔ 20 images

→ Différenciation possible entre grains fusariés par *F. graminearum* et grains sains : algorithme FusaSpectral blé tendre (GEVES)



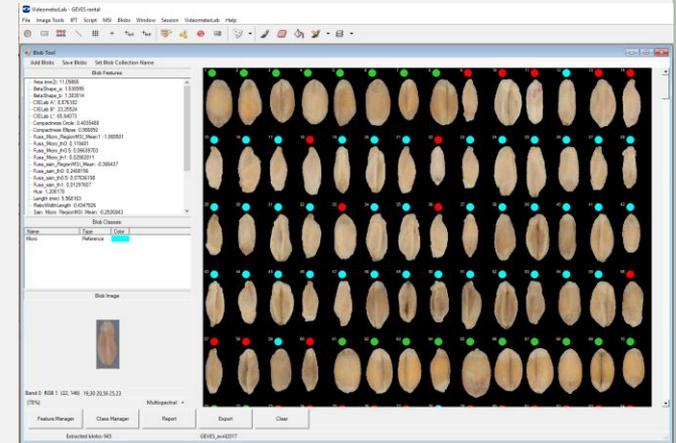
## **OBJECTIFS:**

Tester la capacité du Videometer à classer les grains en 3 groupes :

- Groupe 1 : grains sains
- Groupe 2 : grains contaminés par *Fusarium* spp.
- Groupe 3 : grains contaminés par *Microdochium* spp.

# Phénotypage par imagerie multispectrale : Evaluation de la sensibilité variétale

- Base de données de référence de **8090 grains** couplant les données multispectrales, les analyses visuelles et **microbiologiques**
- Bibliothèque de référence : BlobCollection
- **27 caractéristiques définies**
  - 12 caractéristiques spectrales
  - 15 caractéristiques morpho-métriques
- **Base d'apprentissage : 50% des grains,** avec des classes équilibrées (1348 grains/classe)
- Modèle de classification basé sur des forêts d'arbres de décisions et développé sous MATLAB (GEVES)



## 3 classes :

- Sain
- Fusa
- Micro



# Phénotypage par imagerie multispectrale :

## Evaluation de la sensibilité variétale

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

Matrice de confusion sur l'ensemble des données, soit 8090 grains

→ Taux moyen de **81.81%** de bonne classification

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

matrice de confusion sur l'ensemble des données externes, soit 4046 grains

→ Taux moyen de **63.03%** de bonne classification avec données « externes »

→ **Modèle à 3 classes non utilisable à ce stade:**

- ✓ Biais de l'analyse sanitaire sur le statut des grains
- ✓ Elargir base de référence
- ✓ Etudes hyperspectrales et modification des longueurs d'ondes

# CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

- *Microdochium*: 2 espèces à ne pas sous-estimer!
- **Facteurs climatiques sont prédominants** pour expliquer leur présence → Besoin de les caractériser plus précisément pour développer un modèle/grille de risque
- **Des symptômes foliaires mieux connus** mais **une caractérisation sur épis qui reste difficile** et qui nécessite des outils complémentaires à l'œil (qPCR, imagerie,...)
- **Maîtrise aléatoire des conditions artificielles d'inoculation**: pression faible, interaction avec *F. graminearum* → Besoin de tester d'autres protocoles
- Démonstration de différences variétales dans la sensibilité à *Microdochium* → progrès génétique possible

# CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

mais encore des connaissances « manquantes »

- ✓ Spécificité d'hôte
- ✓ Génétique, Génomique, Diversité
- ✓ Pathogénicité, Interactions plantes-pathogènes
- ✓ Maîtrise des contaminations et caractérisation des variétés

→ FSOV 2018 RESISTAMICRO



Agri Obtention

Limagrain Europe

Caussade

RAGT2n

DSV

ASUR Plant Breeding

Florimond-Desprez

Secobra

KWS Momont

Syngenta

Lemaire-  
Deffontaines

Unisigma



## WP1. Caractérisation génétique des populations de *Microdochium* spp. et prédiction du risque



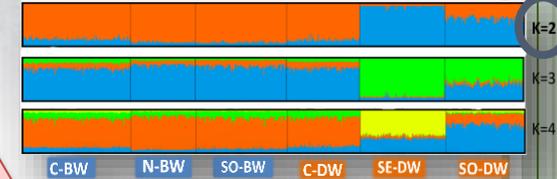
### ACTIONS

- Identification des facteurs agro-climatiques à risque.
- Etude de la variabilité des populations de chaque espèce selon l'hôte, les organes, les régions.

### LIVRABLES

- Grilles de risque ou modèle de prédiction du risque
- Connaissance des espèces et des populations
- Outils de génomiques utiles pour la lutte génétique, la lutte chimique, la recherche de gènes d'intérêt ...

Gestion des résidus*	Sensibilité variétale	Pluie à la floraison		
		<10	10-40	>40
Céréales à paille, colza, lin, pois, luzerne, tournesol	Peu sensibles			
	Moyennement sensibles			
Techniques sans labour ou résidus en surface	Peu sensibles			
	Moyennement sensibles			
Bettewers, pomme de terre, soja, autres	Peu sensibles			
	Moyennement sensibles			
Techniques sans labour ou résidus en surface	Peu sensibles			
	Moyennement sensibles			
Maïs et sorgho	Peu sensibles			
	Moyennement sensibles			
Maïs et sorgho fourrages	Peu sensibles			
	Moyennement sensibles			
Techniques sans labour ou résidus en surface	Peu sensibles			
	Moyennement sensibles			
Maïs et sorgho grains	Peu sensibles			
	Moyennement sensibles			
Techniques sans labour ou résidus en surface	Peu sensibles			
	Moyennement sensibles			



Comprendre et maîtriser les infections de *Microdochium* spp. pour améliorer la résistance du blé à la « Microdochiose ».

## FSOV RESISTAMICRO

## WP2. Mise au point de méthodes de phénotypage robustes

### ACTIONS

- Mise au point d'un test en conditions contrôlées: feuilles et épis
- Réseau d'expérimentation de 13 essais par an au champ pour identifier les conditions favorables à l'infection par *Microdochium*

### LIVRABLES

- Protocole détaillé de tests de phénotypage en conditions contrôlées sur feuilles et épis.
- Protocoles robustes pour évaluer la sensibilité variétale
- Caractérisation des variétés élites françaises.



## WP3. Interactions blé/*Microdochium* spp.

### ACTIONS

- Agressivité et virulence sur feuilles/épis
- Caractérisation du mode d'infection et comparaison avec *F. graminearum* (épis)
- Déterminisme moléculaire de l'interaction

### LIVRABLES

- Compréhension des mécanismes d'infection
- Prédiction résistance épis avec tests feuilles?
- Identification de protéines et gènes putatifs impliqués dans l'interaction

# Merci de votre attention

**Olivier Robert\***

**Delphine Taillieu\***

**Benoit Foucault**

**Laure Duchalais**

**Valérie Cadot**

**Marlène Faure**

**Thomas Baldwin**

**Clémence Galon**

**Jean-Philippe Maigniel**

**Sébastien Caiveau**

**Clément Debiton**

**Pascal Giraudeau**

**Sylvie Dutriez**

**Thierry Bouthillier**

**Jérôme Auzanneau**

**Céline Duque**

Et tous les partenaires  
qui ont fait les essais et  
les prélèvements

## Partenaires

Florimond Desprez

KWS Momont

Syngenta

RAGT2n

Limagrain Europe

GEVES

Secobra recherches

Unisigma

Caussade  
Semences

ASUR Plant Breeding

Agri Obtention



Cindy Vitry

Stéphanie Le Prieur

Emmanuelle Gourdain

Béatrice Orlando

Stéphane Porrez

Delphine Bouttet

Et tous les collègues  
impliqués...



**Partenaires et financeurs des projets ANR DON&Co et CASDAR ECOFUSA**

