

## Systeme d'analyse d'images adapté pour l'étude du comportement de trichogrammes

Clément Vigneault, François Fournier,  
Ka Po Catherine Hui, Guy Boivin

Plus de 32 millions d'hectares de terres agricoles et forestières situées à travers le monde sont traitées annuellement à l'aide d'insectes trichogrammes (Hymenoptera, *Trichogrammatidae*, *Trichogramma* ou *Trichogrammatoidea*) [1]. Les trichogrammes sont très utilisés comme agents de lutte biologique contre des insectes ravageurs du maïs, du riz, de la canne à sucre, des légumes et des arbres forestiers et fruitiers [1-3]. Ce sont des guêpes de petite taille (moins de 1 millimètre) qui pondent à l'intérieur des œufs de leurs hôtes, ce qui les tue. Les trichogrammes attaquent plus de 400 espèces appartenant à 203 genres, 44 familles et 7 ordres d'insectes [4]. Cependant, malgré l'usage massif des trichogrammes dans les champs, leur efficacité est variable [5]. Cela peut être dû à une utilisation non appropriée lors des introductions au champ, car chaque espèce de ce groupe d'auxiliaires présente des préférences spécifiques d'insectes hôtes, préférences qui

peuvent varier avec la culture à protéger, les conditions climatiques et environnementales [5-7]. L'efficacité des lâchers de trichogrammes nécessite, pour chaque espèce ou souche évaluée, d'établir la préférence pour les ravageurs visés. Cette évaluation peut se faire à l'aide d'essais préliminaires en laboratoire (ce qui permet de réduire rapidement le nombre de candidats) et se poursuivre par des tests en conditions semi-naturelles et par des essais au champ, pour valider l'efficacité des candidats sélectionnés [5]. En outre, il convient d'évaluer périodiquement l'efficacité des espèces de trichogrammes les plus utilisées commercialement. Deux méthodes, nécessitant beaucoup de temps, ont été utilisées pour étudier la préférence des trichogrammes pour les œufs de leurs hôtes. La première, appelée méthode de contact et parasitisme, nécessite huit périodes d'observation réparties sur une durée de 7 heures pour chaque femelle évaluée. La position de la femelle sur ou à côté des œufs est notée à chaque observation [6, 8, 9]. La seconde méthode, dite d'observation continue, requiert 90 minutes d'observation pour chaque femelle, période durant laquelle tous les comportements relatifs à l'acceptation et au parasitisme des différents hôtes sont notés et chronométrés [10].

Notre étude a été réalisée dans le cadre d'un projet de recherche visant à identifier la ou les espèces de trichogramme les plus efficaces pour contrôler trois espèces de Lépidoptères ravageurs des crucifères en Amérique du Nord [11]. L'objectif était de mettre au point un système

d'analyse d'image permettant d'automatiser et de standardiser les observations faites par la méthode d'observation continue et d'augmenter l'objectivité des observations en éliminant l'intervention humaine, tout en augmentant la précision et le nombre total des paramètres mesurables dans un essai.

### Matériel et méthode

Une méthode fondée sur la vision numérique, développée pour compter le nombre d'akènes de fraise [12], a été modifiée et adaptée pour étudier les comportements des trichogrammes. Ce système d'analyse d'images enregistre la séquence des visites d'œufs faite par une femelle trichogramme, le nombre de contacts ainsi que la durée cumulative de contact avec chacun des œufs visités. La vitesse moyenne de déplacement de l'insecte à l'intérieur des zones définies par l'utilisateur (zones d'œufs versus espace entre les œufs) est aussi comptabilisée par le système. Les comportements de trois espèces de trichogrammes, *Trichogramma buesi*, *Trichogramma pretiosum* et *Trichogrammatoidea bactrae*, ont ainsi pu être comparés.

### Préparation des œufs de ravageurs

Les œufs de trois espèces de papillons ont été utilisés comme hôtes, ceux de la piéride du chou (*Artogeia rapae* L., Pieri-

C. Vigneault, K.P.C. Hui, G. Boivin : Centre de recherche et de développement en horticulture, Agriculture et Agroalimentaire Canada, 430, boulevard Gouin, Saint-Jean-sur-Richelieu, Québec, J3B 3E6, Canada.

F. Fournier : Les services Bio-Contrôle Inc., 2600 Dalton, Sainte-Foy, Québec, G1P 3S4, Canada.

Tirés à part : C. Vigneault

dae), de la fausse-teigne des crucifères (*Plutella xylostella* L., Plutellidae) et de la fausse-arpenteuse du chou (*Trichoplusia ni* Hübner, Noctuidae). Les œufs de ces trois ravageurs mesurent respectivement 1 030 x 450, 330 x 490 et 430 x 590 microns. Dans chaque essai, une femelle de trichogramme accouplée depuis moins de 2 heures a été mise en contact avec des œufs de moins de 24 heures. Les œufs (doués par espèce de papillon) étaient espacés de 2,5 millimètres entre eux, distance inférieure à la limite de perception des trichogrammes (estimée à environ 4 millimètres [13]), ce qui permet au système de bien distinguer chaque œuf et d'éviter qu'un insecte puisse être en contact avec deux œufs à la fois. La durée de chaque essai était de 20 minutes.

### Composantes physiques du système d'analyse d'image

Le système d'analyse d'image utilisé se compose principalement d'une source lumineuse, d'un diffuseur, d'une caméra vidéo du type CCD, d'un magnétoscope de type VHS, de deux écrans vidéo et d'un micro-ordinateur de type IBM-AT compatible, toutes composantes disponibles commercialement. La source lumineuse du système est constituée d'un tube fluorescent circulaire placé sous le diffuseur. Une plaque en matière acrylique est utilisée comme diffuseur pour uniformiser l'intensité lumineuse de la source. La source lumineuse, le diffuseur et la caméra ont été recouverts par une enceinte en matériau plastique noir et opaque (*photo 1*) pour éliminer les effets de la lumière ambiante sur l'image captée par la caméra à raison de 30 images par seconde (standard américain). Cette image originale est présentée sur un premier écran qui permet à l'observateur de bien centrer la matrice d'œufs dans le champ de vision de la caméra. Le signal vidéo produit par la caméra est enregistré par le magnétoscope ; l'analyse des images peut se faire pendant l'expérience ou en temps différé à l'aide d'enregistrements. Le signal vidéo transmis au micro-ordinateur est numérisé à raison de 30 images par seconde à l'aide d'une carte d'interface Oculus-300 installée dans l'ordinateur. Cette carte divise l'image du champ de vision de la caméra

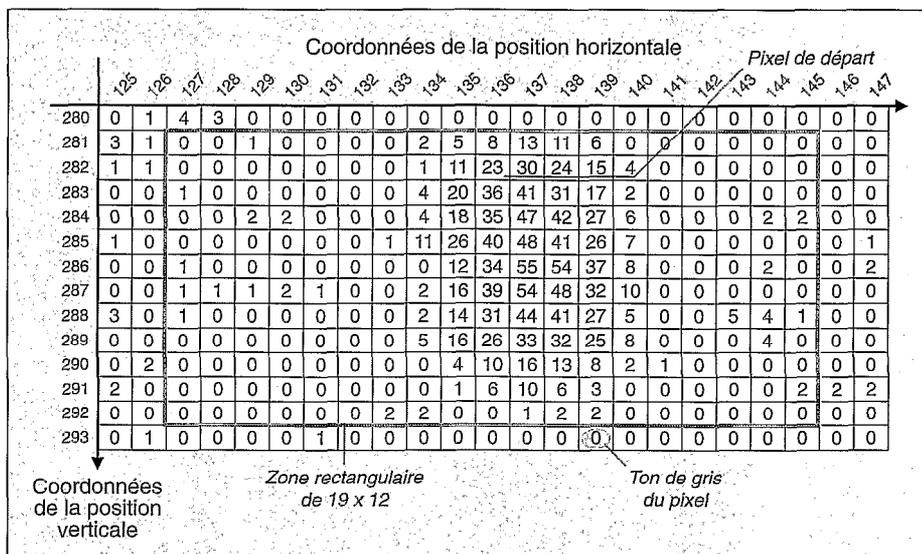


Figure 1. Matrice présentant les valeurs de tons de gris des pixels formant l'image numérisée d'un trichogramme.

Figure 1. Matrix showing grey-level values for pixels which represent a digitized Trichogramma.

sur une surface de 27,5 millimètres de large par 26 millimètres de long en 512 x 484 petits éléments carrés (appelés pixels) ayant environ 54 microns de côté (standard nord-américain, 512 x 512 en Europe). Chacun des pixels est décrit par trois coordonnées : positions horizontale et verticale et intensité lumineuse captée par la caméra (*figure 1*). Le ton de gris de chaque pixel s'exprime en 8 bits donnant une échelle de 0 à 255 (de noir à blanc respectivement). L'analyse d'image se fait à l'aide d'un logiciel spécialement développé à cette fin à partir d'une librairie fournie à l'achat de la carte d'interface.

### Fonctionnement du logiciel et définitions des paramètres utilisés

Après avoir centré la plaque de verre sur laquelle avait placé les œufs à l'intérieur du champ de vision de la caméra, le système d'analyse d'image est activé et le ton de gris moyen d'une partie du fond ne contenant pas d'œufs est mesuré. L'ordinateur utilise ce ton de gris pour augmenter le contraste de l'image après la numérisation, laquelle est présentée sur le deuxième écran. La multiplication par quatre d'une partie des

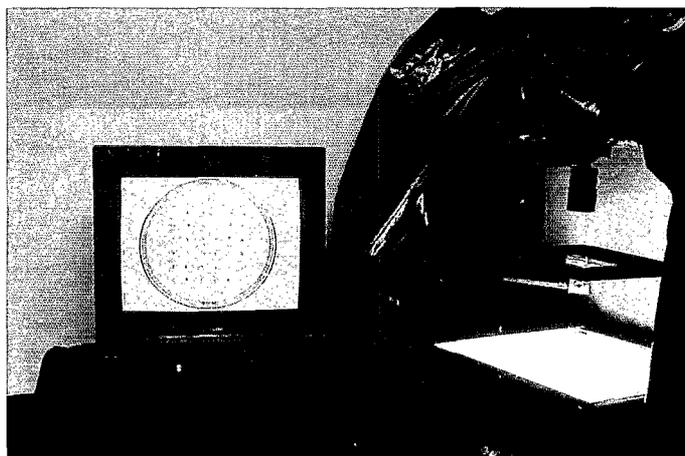


Photo 1. Système d'analyse d'image utilisé pour étudier le comportement des trichogrammes. Une enceinte de matière plastique noire et opaque couvre la source lumineuse, le diffuseur et la caméra. L'écran vidéo montre l'image produite.

Photo 1. Image analysis system used for studying the predatory behaviour of Trichogramma. An opaque black plastic sheet covers the light source, the diffuser and camera. The image is viewed on the video monitor.

tons de gris situés de part et d'autre du ton de gris moyen du fond de l'image originale permet à l'observateur de mieux distinguer les différents œufs sur le deuxième écran sans toutefois affecter les résultats obtenus par l'analyse d'image. Le ton de gris moyen du fond de l'image originale (avant l'augmentation de contraste) était de  $106 \pm 4$ . L'utilisateur fournit ensuite à l'ordinateur les paramètres suivants : durée de l'essai, ton de gris seuil pour trouver les œufs, dimension minimale d'un objet pour considérer qu'il s'agit d'un œuf, longueur moyenne d'un insecte. L'ordinateur identifie alors la position de chacun des œufs, le ton de gris moyen des œufs sur l'image originale étant de 72. Le ton de gris seuil utilisé pour identifier les œufs a généralement été fixé à 90, soit à mi-chemin entre le ton de gris moyen du fond et celui de l'œuf. La dimension minimale d'un œuf a été fixée à 30 pixels. Le système considère un objet comme œuf seulement si son ton de gris est inférieur ou égal à 90 et que sa surface est plus grande ou égale à 30 pixels. Il trace alors le contour de chaque œuf localisé et mesure sa surface à l'aide d'un algorithme [14], puis il établit, suivant les axes  $x$  et  $y$ , les coordonnées maximales et minimales (appelées coordonnées extrêmes) des pixels formant le contour de chaque œuf. Une bande de 10 pixels (soit 540 microns) est ajoutée aux quatre coordonnées extrêmes pour former une zone rectangulaire autour de chaque œuf. La largeur de cette bande correspond à la moitié de la longueur moyenne du corps des trois espèces de trichogrammes, telle que perçue par le système. L'insecte est considéré « en contact » avec un œuf dès qu'il entre dans le rectangle ainsi délimité autour de l'œuf [5]. Les œufs présentés sur le deuxième écran sont remplacés par ces zones rectangulaires et l'observateur peut vérifier les positions des œufs sur l'écran et corriger les erreurs, s'il y a lieu. Ces zones d'œuf sont ensuite numérotées de 1 à 36 par l'ordinateur ; le numéro 0 étant, quant à lui, associé à la zone extérieure aux zones d'œuf. Les coordonnées des positions des 36 zones d'œuf sont enregistrées et servent à déterminer, par comparaison avec la position de l'insecte, si ce dernier est en contact ou non avec un œuf.

Lorsque tous les œufs ont été identifiés et localisés, une enceinte en matière plastique ayant un diamètre de 25 millimètres est centrée sur la matrice d'œufs et une image de référence est enregistrée par le système. Les tons de gris de toutes les images subséquentes seront soustraits, pixel par pixel, de l'image de référence [15]. Ainsi, les images

## Summary

### Image analysis system adapted to evaluate the predatory behaviour of *Trichogramma* insects

C. Vigneault, F. Fournier, K.P.C. Hui, G. Boivin

*A system based on image analysis was adapted to assess the preying preference of Trichogramma on eggs of other host insects. The system consisted of a circular background light source, a light diffuser, a CCD video camera, a VHS video cassette recorder, two video monitors and a IBM-AT compatible computer. The original image was digitized into a 512 x 484 pixel image (American standard), with each pixel described by its  $x$  and  $y$  co-ordinates, and its light intensity graded on a 256 grey-level scale. An egg matrix (6 eggs x 6 eggs) was placed within the field of vision of the camera. The operator specified the following parameters to the system: duration of the experiment, average length of an insect, threshold grey level and minimum size of an object to be recognised as an egg. Once all eggs were detected by the system, a rectangular zone was created around each egg. A reference image was stored by the computer, along with the co-ordinates of the egg zones. The system started recording as an insect was introduced into the egg matrix. Image analysis and insect detection were performed at a rate of 6 images per second in real time. As an insect entered into an egg zone, a contact was considered to be made. During the test, the sequential visits of egg zones and the distance of travel of the insect between different egg zones were recorded by the computer. A report including the above information, the average travel speed of the insect, the total number of egg contacts and the cumulative contact time, was provided by the system at the end of each test. Observations recorded by the system were more precise and objective than simple manual observation.*

*Cahiers Agricultures* 1997 ; 6 : 289-92.

présentées après la soustraction seront pratiquement noires et ne montreront des points clairs qu'aux endroits où il y a une grande différence de ton de gris entre l'image de référence et l'image observée. L'introduction d'un insecte dans le champ des œufs produira un point brillant correspondant à la position de l'insecte. Quand la femelle de trichogramme est introduite à l'intérieur de l'enceinte, le chronomètre du système démarre. L'image obtenue par la soustraction est présentée sur le deuxième écran. La soustraction de l'image se fait à raison de 30 images par seconde ; toutefois le système ne peut analyser que 6 images par seconde en temps réel, eu égard au temps de calcul nécessaire à l'identification et à la vérification de la position relative de l'insecte par rapport aux zones d'œuf. Ce temps de calcul pouvant varier d'une image à l'autre, l'intervalle entre l'analyse de deux images successives, mesuré au millièmètre de seconde près, n'est pas constant.

L'ordinateur localise le trichogramme par la

différence de ton de gris entre le fond et l'insecte, dont la surface moyenne est d'environ 75 pixels, avec un ton de gris moyen de 20 et un ton de gris maximal d'environ 60, le ton de gris seuil utilisé pour la recherche de l'insecte étant fixé à 20. Au moment où l'insecte est introduit dans l'enceinte, le système commence à balayer l'écran de gauche à droite et de haut en bas. Il arrête le balayage dès qu'il rencontre un pixel ayant un ton de gris supérieur ou égal à 20, par exemple, *figure 1*, pixel (136, 282) et établit une zone de  $19 \times 12$  autour de ce pixel de départ (soit 9 pixels vers la gauche, 9 pixels vers la droite, 1 pixel vers le haut et 10 pixels vers le bas). L'insecte pouvant se situer à n'importe quel endroit à l'intérieur de cette zone rectangulaire, l'ordinateur additionne tous les tons de gris des pixels du rectangle. Si la somme est supérieure ou égale à 1 000, le système considère que l'insecte est trouvé ; sinon, il continue sa recherche à partir de ce point. Après avoir localisé

l'insecte, l'ordinateur calcule la position de son centre d'intensité lumineuse en calculant le moment de premier ordre des tons de gris du rectangle de  $19 \times 12$  (en réalité moyenne pondérée par les tons de gris) [15]. De cette façon, les coordonnées du centre d'intensité lumineuse peuvent être calculées au centième de pixel près. Elles sont ensuite utilisées pour vérifier la position de l'insecte par rapport aux zones d'œuf et pour le calcul de la vitesse moyenne de déplacement de l'insecte [15].

Le système prend ensuite une nouvelle image et cherche l'insecte dans un carré de  $80 \times 80$  pixels centré sur le dernier pixel de départ. Cette dimension de la zone de recherche permet à l'ordinateur de trouver l'insecte plus rapidement qu'en cherchant sur l'ensemble de l'écran et garantit un taux élevé de succès. Lorsque le système ne trouve pas l'insecte à l'intérieur de ce carré (par exemple dans le cas où l'insecte est superposé à un œuf), il prend une nouvelle image et l'analyse. Si l'insecte demeure toujours introuvable dans le carré de  $80 \times 80$  après cinq nouvelles images, le système le recherche en balayant toute la surface de l'écran jusqu'à ce qu'il le retrouve. Il recalcule ensuite le centre d'intensité lumineuse et vérifie la position de l'insecte. Lorsque ce dernier entre dans une nouvelle zone, un signal sonore est produit par le système qui enregistre aussi le numéro de la nouvelle zone et le temps d'entrée dans cette dernière. Le temps de résidence et la distance parcourue par l'insecte dans chaque zone sont alors calculés par le système.

À la fin de l'essai, l'ordinateur comptabilise les vitesses moyennes de déplacement de l'insecte dans chaque zone, le nombre total de contacts et la durée accumulée des contacts pour chacun des œufs. Toutes ces données, de même que la liste séquentielle des temps d'entrée dans les différentes zones, sont présentées dans un rapport final fourni à l'opérateur. Des options ont aussi été ajoutées au logiciel afin de permettre de choisir une nouvelle image de référence ou de terminer l'analyse à n'importe quel moment durant l'essai.

## Performance du système

Lorsque le système trouve l'insecte, il marque sa position à l'aide d'une croix sur le deuxième écran. L'opérateur peut donc vérifier la position réelle de l'insecte représenté par un point brillant avec celle de la croix. Pendant les 15 essais de 20 minutes effectués, la position de la croix a toujours correspondu à celle de l'insecte, démontrant ainsi la performance du système. Par

ailleurs, les changements de zone de l'insecte ont toujours été signalés par le système.

## Conclusion

Le système d'analyse d'image développé pour étudier la préférence d'hôtes chez les trichogrammes a atteint les objectifs visés : les données fournies par l'ordinateur sont plus précises et objectives que celles obtenues visuellement. Les durées des visites et la position du centre d'intensité lumineuse de l'insecte ont été obtenues respectivement au millième de seconde et au centième de pixel, soit 0,5 micron. Les vitesses moyennes de déplacement de l'insecte entre les œufs, exprimées en mm/s, permettent à l'observateur d'analyser les différents comportements de l'insecte dans le temps.

À l'aide du système décrit, toutes les observations et les calculs nécessaires sont effectués automatiquement et un rapport contenant la séquence des visites, les temps d'entrée dans les zones d'œuf, le nombre de visites par œuf, la durée totale des visites ainsi que les vitesses moyennes de déplacement dans chaque zone est fourni à la fin des essais ; ceci facilite considérablement la tâche de l'opérateur et élimine la majorité des erreurs expérimentales dues à un changement d'opérateur. La méthode développée est actuellement utilisée par un groupe de chercheurs qui étudie le comportement de trichogrammes. Ce système pourrait être utilisé pour toute étude comportementale, d'insectes ou autres organismes, fondée sur les séquences de visite, les durées de contact et les vitesses de déplacement à l'intérieur et entre des zones de différentes qualités (nourriture, odeur, hôte, etc.). Le logiciel utilisé dans cette étude est disponible sur demande en s'adressant à C. Vigneault ■

## Références

- Li LY. Worldwide use of *Trichogramma* for biological control on different crops : a survey. In : Wajnberg E, Hassan SA, eds. *Biological control with egg parasitoids*. Oxon : CAB International, 1994 : 37-53.
- Stinner RE. Efficacy of inundative releases. *Annu Rev Entomol* 1977 ; 22 : 513-31.
- King EG, Bull DL, Bouse LF, Phillips JR. Biological control of bollworm and tobacco budworm in cotton by augmentative releases of *Trichogramma*. *Southw Entomol* 1985 ; 8 : 1-198.
- Bao JZ, Chen XH. *Research and application of Trichogramma in China*. Beijing : Academia Books and Periodicals Science Press, 1989 ; 220 p.

5. Hassan SA. Strategies to select *Trichogramma* species for use in biological control. In : Wajnberg E, Hassan SA, eds. *Biological control with egg parasitoids*. Oxon : CAB International, 1994 : 55-71.

6. Hassan SA. Selection of suitable *Trichogramma* strains to control the codling moth *Cydia pomonella* and the summer fruit tortrix moth *Adoxophyes orana*, *Pandemis heparana* (Lep., Tortricidae). *Entomophaga* 1989 ; 34 : 19-27.

7. Nordlund DA. Habitat location by *Trichogramma*. In : Wajnberg E, Hassan SA, eds. *Biological control with egg parasitoids*. Oxon : CAB International, 1994 : 155-63.

8. Hassan SA, Guo MF. Selection of effective strains of egg parasites of the genus *Trichogramma* (Hym., Trichogrammatidae) to control the European corn borer *Ostrinia nubilalis* Hb. (Lep., Pyralidae). *J Appl Entomol* 1991 ; 111 : 335-41.

9. Wührer B, Hassan SA. Selection of effective species/strains of *Trichogramma* (Hym., Trichogrammatidae) to control the diamondback moth *Plutella xylostella* L. (Lep., Plutellidae). *J Appl Entomol* 1993 ; 116 : 80-9.

10. Dijken MJ van, Kole M, van Lenteren JC, Brand AM. Host preference studies with *Trichogramma evanescens* Westwood (Hym., Trichogrammatidae) for *Mamestra brassicae*, *Pieris brassicae* and *Pieris rapae*. *J Appl Entomol* 1986 ; 101 : 64-85.

11. Fournier F, Boivin G. Souches de trichogrammes pour la lutte biologique contre les lépidoptères ravageurs des crucifères. *Résumé des recherches*. Centre de recherche et de développement en horticulture, Agriculture et Agroalimentaire Canada, Saint-Jean-sur-Richelieu, QC, Canada, 1993 ; 22 : 26-8.

12. Khanizadeh S, Vigneault C, Buszard D. Comparison of two methods of determining achene numbers in strawberry. *Hort Science* 1994 ; 29 : 1366.

13. Bruins EBAW, Wajnberg E, Pak GA. Genetic variability in the reactive distance in *Trichogramma brassicae* after automatic tracking of the walking path. *Entomol Exp Appl* 1994 ; 72 : 297-303.

14. Vigneault C, Panneton B, Raghavan GSV. Real time image digitizing system applied to air bubble measurement. *Can Agr Eng* 1992 ; 34 : 151-5.

15. Vigneault C, Panneton B, Cormier D, Boivin G. Automated system to quantify the behavior of small insects in a four-pointed star Olfactometer. *Appl Eng Agric* 1996 (soumis).

## Résumé

Une méthode fondée sur un système d'analyse d'image a été adaptée pour mesurer la préférence de trichogrammes, insectes parasitoïdes d'œufs d'autres insectes. Les observations effectuées par le système sont plus précises et plus objectives que celles faites visuellement. La méthode développée et les paramètres utilisés lors de sa conception sont décrits et les résultats sont discutés.