CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DU *CALICIOPSIS PINEA* PECK : RÉSULTATS D'INOCULATIONS ARTIFICIELLES ET D'ESSAIS *IN VITRO*

C. DELATOUR

Laboratoire de Pathologie,
Centre national de Recherches forestières, 54 - Nancy
Institut national de la Recherche agronomique

SOMMAIRE

L'auteur a procédé à des inoculations artificielles du *Caliciopsis pinea* Peck. sur le *Pinus pinaster* Ait. dans les Landes. Il a utilisé deux souches du *C. pinea*, l'une isolée à partir du *P. halepensis*, l'autre à partir du *P. pinaster* ; inoculée sur *P. pinaster*, la première ne produit que des pycnides, la seconde produit pycnides et ascocarpes. Une légère différence de croissance *in vitro* distingue ces deux souches.

Deux provenances de pin ont été utilisées comparativement, l'une landaise, l'autre portugaise ; leur comportement vis-à-vis du *C. pinea* est très voisin.

Le *C. pinea* ne pénètre dans l'arbre qu'à la faveur des blessures, il perturbe la cicatrisation et provoque l'apparition de fissures anormales au voisinage des bourrelets cicatriciels.

Cultivé *in vitro* sur bûchettes, le *C. pinea* ne donne que des pycnides, celles-ci ne se forment pas à l'obscurité, elles apparaissent en 10 à 20 jours à la lumière naturelle, en grand nombre sur l'écorce, beaucoup plus rarement sur le bois.

INTRODUCTION

Depuis 1962, les forestiers et les propriétaires landais se sont inquiétés d'un dépérissement étendu qui atteint les pins maritimes et principalement ceux d'âge inférieur à 15 ans.

La recherche des causes éventuelles permet de dégager une première hypothèse : après les incendies de 1949, l'introduction massive de graines d'origine portugaise avait entraîné l'installation de nombreux peuplements mal adaptés aux conditions locales et en particulier au froid (BOUVAREL, 1960). Bien qu'il soit assez difficile de reconstituer l'historique des peuplements quant à leur origine, le massif landais continuant de fournir une partie des graines, on considère actuellement que cette utilisation de graines étrangères est la cause principale des dépérissements, les peuplements de 10-15 ans ayant été installés à partir de 1949.

Sensibilisée par ces faits, l'observation se fit plus fine ; on s'aperçut alors que des peuplements d'origine autochtone, quoiqu'en meilleure santé, n'échappaient pas à certains symptômes. De nombreux facteurs purent alors être évoqués puis analysés, notamment des facteurs du sol (BONNEAU, LE TACON 1966).

En 1964, un champignon relevé par la suite dans la plupart des zones dépérissantes fut remarqué en Gironde. Son abondance en faisait une des causes possibles des dépérissements : il s'agit du *Caliciopsis pinea* Peck.

Dès lors, une étude de ce champignon s'imposait. C'est à ce moment-là que LANIER (1965) fit le point des connaissances sur cet agent, en France et à l'étranger, en Amérique du Nord notamment. Rappelons-les brièvement : le *Caliciopsis pinea* Peck. est un ascomycète qui se développe uniquement sur les parties ligneuses aériennes de son hôte. La fructification imparfaite consiste en de petites pycnides noires, globuleuses, qui naissent en groupe à la surface d'un stroma peu visible, elles mesurent 100 à 200 μ de diamètre et donnent naissance à des pycniospores hyalines, peu arquées, de 5 μ de long. La fructification parfaite est constituée par des ascocarpes pédonculés, pourvus d'un renflement ascogène terminal ; ces ascocarpes atteignent 3 mm de haut et naissent généralement mélangés aux pycnides.

De position systématique longtemps discutée, le *Caliciopsis pinea* Peck. est rangé dans la famille des Coryneliacées (FITZPATRICK, 1920) et dans l'ordre des Dothidéales (FITZPATRICK, 1942).

Parmi les travaux antérieurs, citons ceux de RAY (1936), qui réalisa le premier des cultures du champignon et qui étudia son pouvoir pathogène, et surtout ceux de FUNK (1963), qui fit une étude nutritionnelle et physiologique et aussi l'étude du pouvoir pathogène sur *Pinus strobus*, *Pseudotsuga menziesii* et *Abies grandis*.

La répartition géographique actuellement connue et les hôtes du *Caliciopsis pinea* Peck. figurent au tableau 1.

Dans son étude, LANIER (1965), s'inspirant des travaux de FUNK (1963), préconisait des expériences d'inoculations. Celles-ci étaient également guidées par l'observation du champignon en nature ; en effet, l'examen des symptômes liés au *Caliciopsis pinea* Peck. et de sa localisation montre une certaine dualité du champignon. Certaines observations militent en faveur d'un caractère de pathogène, d'autres en faveur d'un caractère de saprophyte.

Caractères de pathogène :

1 — Les organes envahis par le *Caliciopsis* présentent une écorce irrégulière, anormale.

TABLEAU 1

Liste des espèces hôtes du Caliciopsis pinea Peck.

Espèce hôte*	Localisation	Référence
<i>Pinus pumila</i>	Allemagne	FITZPATRICK 1942
<i>Abies</i> sp.	—	—
<i>Pinus strobus</i>	Amérique du Nord	FUNK 1963
<i>Pinus rigida</i>	— (Est)	—
<i>Pinus pungens</i>	—	—
<i>Pinus echinata</i>	—	—
<i>Pinus virginiana</i>	—	—
<i>Pinus pinaster</i>	Gironde et Landes	LANIER 1964
<i>Pinus radiata</i>	Arboretum des Malgaches	—
<i>Pinus nigra</i> ssp. <i>laricio</i>	— (Landes)	—
<i>Pinus halepensis</i>	Massif du Lubéron (Vaucluse)	Conservation du Vaucluse 1964
<i>Pinus nigra</i> var. <i>austriaca</i>	Rainans (Jura)	DELATOUR 1966
— —	Région de Nancy (M.-et-M.)	—
<i>Pinus sylvestris</i>	Rainans (Jura)	—
—	Région de Commercy (Meuse)	—
—	Région de Nancy (M.-et-M.)	—

* Pour les espèces hôtes, nous adoptons les binômes utilisés dans : Manuel des Conifères, E.F. DEBAZAC, 1964.

2 — On note la présence fréquente de fissures plus ou moins profondes de l'écorce et aussi de petits chancres ; il s'agit dans la plupart des cas de zones chancreuses assez mal définies, souvent au niveau des pseudoverticilles. Dans certains cas, des chancres typiques se développent (fig. 1), (1).

FIG. 1. — *Symptômes liés au Caliciopsis pinea en nature. (Echelle 0,5).*

1. Chancre typique porteur de fructifications.
2. Fructifications sur cicatrices foliaires à proximité d'un chancre.

3 — On a cru remarquer une plus grande abondance de fructifications au niveau des chancres et des fissures.

4 — Les arbres présentant ces symptômes sont tous dépérissants.

Caractères de saprophyte :

1 — Les fructifications s'étendent loin en dehors des zones réellement chancreuses, émergeant de l'écorce à la faveur de toutes les ouvertures, telles que les cicatrices foliaires, et sans la présence à ce niveau de symptômes particuliers (fig. 1), (2).

2 — Le *Caliciopsis* vit encore sur les sujets morts pendant un temps certainement assez long.

A la suite de ces observations, trois questions principales se posaient :

- quel est le mode de pénétration du *Caliciopsis* ?
- le *Caliciopsis* cause-t-il des chancres aux parties attaquées ?
- et finalement, cause-t-il un dépérissement ?

I. — ÉTUDE DU POUVOIR PATHOGÈNE

a — Matériel et méthodes

Matériel inoculé

Il était intéressant de comparer le comportement vis-à-vis du *Caliciopsis* des deux origines de pin maritime actuellement semées dans les Landes ; dans ce but, nous avons utilisé d'une part de jeunes pins tout venant, généralement considérés comme d'origine portugaise ou du moins sujets hybrides entre les deux provenances, et d'autre part de jeunes pins d'origine landaise certaine.

Cette expérience de comparaison a eu lieu sur des sujets âgés de deux ans, transplantés sur un terrain d'expérience du domaine de la Grande Ferrade (Centre de Recherches agronomiques du Sud-Ouest).

Une deuxième place d'expérience a été choisie en nature, sur des arbres âgés de cinq ans (d'origine portugaise ou hybride). Dans ce cas, le matériel était assez hétérogène. Mais il fallait absolument connaître le comportement du *Caliciopsis* dans les conditions moyennes d'un peuplement landais. Nous avons essayé de compenser l'hétérogénéité par le nombre des répétitions.

Inoculum

L'inoculum du *Caliciopsis pinea* Peck. a été réalisé sur place à partir de matériel récolté dans les Landes. Nous avons utilisé cet inoculum sous deux formes :

— d'une part, sous forme d'ascospores, les ascospores constituant l'« inoculum naturel » du champignon.

Cet inoculum était réalisé par broyage d'extrémités d'ascocarpes dans de l'eau stérile, au moment des inoculations pour éviter la conservation, toujours aléatoire, d'une telle suspension pendant un temps plus ou moins long au réfrigérateur. La suspension était ensuite testée sur gélose en boîte de Pétri pour s'assurer de la faculté germinative.

La suspension a été appliquée à la pipette dans le cas des pins de deux ans, au pulvérisateur dans le cas des pins de cinq ans.

— d'autre part, sous la forme mycélienne, ceci constituant un « inoculum artificiel » qui n'existe pas dans la nature. Cette forme d'inoculum a l'avantage, dans le cas d'un champignon à faible pouvoir d'installation, de mettre celui-ci dans des conditions très favorables de départ, le stock mycélien inoculé étant toujours relativement important.

Le *Caliciopsis pinea* Peck. sous forme mycélienne a été obtenu de la façon suivante :

- suspension d'ascospores étalée sur gélose au malt (4 %) en boîte de Pétri.
- prélèvement des colonies bien individualisées et repiquage.
- une fois obtenue une souche pure qui donne des colonies d'aspect typique et régulier, multiplication de cette souche en de nombreux tubes inclinés.
- sur le terrain, au moment de l'inoculation, on retire la gélose d'un tube, on la découpe en petits cubes le plus régulièrement possible (3 à 4 mm de côté environ) dans une boîte de Pétri stérile. Chaque cube ainsi préparé sert d'inoculum mycélien.

Un troisième inoculum a été utilisé. Nous possédions du *Caliciopsis pinea* Peck. isolé à partir de *Pinus halepensis* Mill. en provenance du massif du Lubéron (Vaucluse). Nous voulions en étudier le comportement sur *P. pinaster* Ait. Cet inoculum était uniquement sous forme mycélienne ; il avait été réalisé au laboratoire de Pathologie forestière de Nancy.

Différents types d'inoculations

Les différentes catégories d'inoculations sont résumées dans le tableau 2.

TABLEAU 2

Représentation schématique des différentes catégories d'inoculations

Chaque type a été inoculé par les trois inoculum, dont il a été fait mention précédemment. Toutes les inoculations par blessure sont couplées avec des témoins blessés sans inoculation.

Ce schéma général n'a été respecté dans son entier que pour les pins « portugais » de deux ans.

Dans le cas des pins landais de deux ans, les inoculations par la souche de *Caliciopsis* du Lubéron ont été omises car nous n'avons pas pu disposer de sujets en suffisance.

Dans le cas des pins de cinq ans, les inoculations sur « cicatrices foliaires » ont été supprimées ; les défoliations artificielles nous étaient alors apparues trop brutales et équivalaient à notre sens à des blessures profondes.

Nous avons fait 3 répétitions pour les pins landais de 2 ans (39 sujets)

4 répétitions pour les pins « portugais » de 2 ans (72 sujets)

10 répétitions pour les pins de 5 ans (150 sujets)

Remarques particulières

Les « cicatrices foliaires »

Nous les avons réalisées sur les pins de deux ans par arrachage pur et simple des aiguilles au moment de l'inoculation. Cette méthode a l'inconvénient de réaliser de véritables blessures qui vont

parfois presque jusqu'au bois. C'est pour cette raison que nous avons alors éliminé ce mode d'inoculation dans l'expérience des pins de cinq ans. Par la suite, nous avons réalisé 9 inoculations sur des pins de deux ans non inclus dans le dispositif préétabli, au niveau de cicatrices foliaires obtenues de la façon suivante : le long d'une branche, quelques aiguilles sont coupées à 1 cm environ de leur base ; les portions restantes des aiguilles se dessèchent et au bout de 8 jours nous avons pu les faire tomber par un simple attouchement. C'est alors qu'on obtient des cicatrices foliaires artificielles très proches de celles qui se réalisent en nature.

Blessures sans gel préalable

Les blessures sont faites avec un scalpel flambé à l'alcool ; on réalise une entaille tangentielle au tronc sur 2 à 3 cm de longueur, allant jusqu'au bois, ménageant ainsi une languette qu'on laisse attachée par sa base. L'inoculation se fait entre la languette et le bois mis à nu.

Cette technique a le gros inconvénient de produire des blessures non identiques entre elles ; dans le sens de la hauteur, on arrive à une certaine standardisation, mais la largeur de la blessure est fonction du diamètre de la partie à inoculer. Ceci est surtout vrai dans le cas des pins de cinq ans où les sujets ont des tailles assez variables.

Blessures avec gel préalable

Cette technique du gel préalable a pour but de provoquer un traumatisme local qui met la partie de l'hôte ainsi traitée en état d'infériorité vis-à-vis du champignon que l'on installe. Cette technique est particulièrement bonne pour des champignons à pouvoir d'installation faible.

Le gel est obtenu par application d'un jet d'anhydride carbonique pendant 5 secondes, ensuite la blessure est faite au même niveau, puis inoculée.

L'inconvénient de cette technique est qu'on en contrôle mal les effets, mais elle a l'avantage d'être pratique pour le travail sur le terrain.

Les pansements

Immédiatement après chaque inoculation, un pansement est appliqué. Il a pour but de protéger l'inoculation contre toute contamination étrangère, de favoriser la reprise de l'inoculum en l'empêchant de se dessécher, et enfin de maintenir en place l'inoculum qui aurait risqué d'être déplacé par des pluies éventuelles.

(Ces pansements ont été enlevés au bout de 13 jours chez les pins de deux ans, au bout de 8 jours chez les pins de cinq ans).

Notation des observations

Les inoculations ont eu lieu les 10 et 11 juin 1965 pour les pins de deux ans, le 21 juin pour ceux de cinq ans.

Trois séries d'observations ont eu lieu jusqu'à présent :

le 22 septembre 1965, au bout de 3 mois,

les 8 et 9 mars 1966, au bout de 9 mois,

le 5 septembre 1966, au bout de 15 mois.

Ont été notés :

La présence ou l'absence du champignon sous sa forme fructifiée.

Le type de fructification (pycnides ou ascocarpes) avec son intensité au cours des premières et deuxième observations (notée de 1 à 3).

La localisation des fructifications.

Le degré de cicatrisation des blessures.

Des observations particulières ont également été notées : exsudations de résine, attaques d'insectes et toutes autres anomalies.

Des mensurations ont enfin été faites chez les pins de cinq ans : hauteur totale, diamètre au milieu, ceci dans le but de mettre en évidence l'incidence du *Caliciopsis pinea* Peck. sur le développement des arbres.

b — Résultats

Implantation du Caliciopsis pinea Peck.

Nous pouvons donner les pourcentages de réussite suivants, acquis dès 3 mois après les inoculations :

inoculations sur blessure :	pins de cinq ans	100 %
	pins de deux ans	89 %
inoculations sur écorce intacte :	pins de cinq ans	0 %
et pseudovorticilles	pins de deux ans	0 %
inoculations sur « cicatrices foliaires » :	pins de deux ans	80 %

Type de fructification et intensité

L'observation du type de fructification nous a permis de mettre en évidence une différence de comportement entre les deux souches de *Caliciopsis* utilisées : la souche en provenance du Lubéron, isolée à partir de pin d'Alep, a donné *uniquement des pycnides* ; la souche en provenance des Landes, isolée à partir de pin maritime, a produit *pycnides et ascomarques* dans tous les cas.

La vitesse d'apparition et le nombre des pycnides sont les mêmes pour les deux souches de *Caliciopsis* ; ils sont également indépendants de la forme de l'inoculum (spores ou mycélium pour la souche des Landes).

En revanche, lors de la première série d'observations, nous avons noté une plus grande abondance de pycnides et d'ascocarpes sur les blessures ayant subi le gel préalable que sur celles ne l'ayant pas subi. Cette différence s'est complètement estompée par la suite.

Localisation des fructifications

— Au niveau des blessures :

Nous avons distingué quatre régions différentes :

- 1 — le fond de la blessure qui est constitué par le bois mis à nu,
- 2 — les lèvres de la blessure qui évoluent en bourrelet cicatriciel,
- 3 — la languette, qui s'est desséchée rapidement, qui a disparu quelquefois ou qui a été prélevée pour examen,
- 4 — l'extérieur, constitué par le pourtour de la blessure demeuré intact lors des inoculations.

Nous n'avons pas pu relever de localisation nettement préférentielle entre les trois premières zones, la quatrième étant toujours demeurée indemne de fructifications du moins au début. Dans certains cas, nous avons cependant noté une grande abondance de fructifications sur la languette, ce qui semble montrer l'affinité de ce champignon pour les parties dépérissantes, sinon mortes.

Au cours de la deuxième notation, nous avons observé le débordement des fructifications sur la zone externe ; ce débordement était très faible et consistait en quelques ascocarpes apparus dans le proche voisinage de la blessure.

Sur les pins de cinq ans, les cas de débordement se répartissent de la façon suivante :

blessure - mycélium : 4 cas	
gel - blessure - mycélium : 5 cas	} 8 cas
gel - blessure - spores : 3 cas	

Sur les pins de deux ans, à la deuxième notation, nous avons pu mettre en évidence une différence entre les deux provenances de pin, en ce qui concerne le débordement des ascocarpes du *Caliciopsis* :

Pins landais : gel - blessure - mycélium : 0 cas sur 3 répétitions.

Pins portugais : gel - blessure - mycélium : 4 cas sur 4 répétitions.

— Au niveau des « cicatrices foliaires ».

Dans le cas des cicatrices profondes comme des cicatrices « vraies », des ascocarpes et des pycnides sont apparus au niveau des cicatrices ; sur les cicatrices foliaires « vraies », les ascocarpes ainsi disposés reproduisaient un des aspects que l'on rencontre en nature.

La cicatrization des blessures

Chez les pins de cinq ans, au bout de 15 mois, les résultats sont les suivants :

témoins : cicatrisés	100 %
blessures inoculées : cicatrisées	25 %
en voie de cicatrization complète	12 %
non cicatrisées	55 %
blessure superficielle	8 %

Les blessures cicatrisées sont celles où les bourrelets cicatriciels sont au contact l'un de l'autre, les non cicatrisées sont celles qui laissent apparaître encore le bois au fond de la blessure.

Chez les pins de deux ans :

témoins : cicatrisés	100 %
blessures inoculées : cicatrisées	52,7 %
en voie de cicatrization	27,8 %
non cicatrisées	16,8 %
blessure superficielle	2,7 %

Chez les pins de deux ans, on note une cicatrization bien meilleure, sans doute est-elle due aux meilleures conditions dans lesquelles sont mis les sujets qui ont fait une pousse 1966 vigoureuse.

Dans les anomalies de la cicatrisation trouvent leur place certaines observations faites à la troisième notation :

Chez les pins de cinq ans, si aucun chancre n'est apparu à la suite des inoculations, nous avons pu constater dans de nombreux cas que la mauvaise cicatrisation s'accompagnait de fissures longitudinales et transversales, au voisinage des bourrelets cicatriciels. 25 cas ont été relevés, ils accompagnent pratiquement aussi bien les cicatrifications complètes que les incomplètes. Les témoins ne présentent pas de tels symptômes (fig. 2).

FIG. 2. — Symptômes expérimentaux obtenus en 15 mois sur blessures. (Echelle 1).

B₁-B'₁-B₂ : Blessures inoculées par *Caliciopsis pinea*.

1. fond de blessure. — 2. bourrelet cicatriciel. — 3. languette. — 4. extérieur de la blessure. — c. l. : crevasse longitudinale. — c. t. : crevasse transversale.

T : blessure témoin, non inoculée.

Chez les pins de deux ans, seuls les pins « portugais » présentent actuellement des symptômes de fissuration, les pins landais en étant indemnes. Peut-être ne s'agit-il que d'une différence passagère, comme nous en avons déjà relevé une.

c — Discussion - Conclusion

Au cours de nos observations, nous avons pris comme critère de pénétration du *Caliciopsis* dans les tissus, la fructification, visible à l'extérieur. C'est suivant ce critère que nous avons établi les pourcentages de réussite des inoculations, et ceux-ci

nous permettent d'affirmer que le champignon ne peut pénétrer qu'à la faveur de blessures, soit accidentelles, soit naturelles. Un résultat identique avait été mis en évidence par FUNK (1963) pour *Caliciopsis pseudotsugae* Fitzp. sur *Pseudotsuga menziesii*. Nous pensons que ce critère mériterait d'être confirmé par des isolements à effectuer dans le voisinage des zones inoculées dépourvues de fructifications.

En ce qui concerne les inoculations après gel artificiel, on ne doit les considérer que comme un moyen technique d'étude : en effet, le gel se fait par un jet d'anhydride carbonique qui occasionne un abaissement de température extrêmement brutal (inférieur à -20°C) et de plus, ce gel a été réalisé au mois de juin, c'est-à-dire à une saison où la circulation de sève est active et où les tissus sont turgescents ; ainsi les tissus sont très peu préparés à subir un gel, même beaucoup plus faible. Ces considérations nous interdisent absolument d'établir un parallèle entre ce gel artificiel et un gel naturel.

Mais l'intérêt de cette technique de gel local s'est confirmé par quelques observations : au bout de trois mois, nous notons que les fructifications étaient nettement plus abondantes sur les blessures ayant subi le gel préalable que sur celles ne l'ayant pas subi. Il est donc certain maintenant que plus l'intensité du traumatisme est grande, plus la prolifération du *Caliciopsis* dans les tissus est importante. La disparition ultérieure de cette différence s'explique sans doute par le fait que la zone lésée par le gel était limitée à la blessure ; le maximum de prolifération du mycélium est identique dans les deux types de blessures, mais plus rapidement atteint avec le gel préalable, plus long à s'établir dans l'autre cas. Cette interprétation est confirmée par l'observation relative au débordement du champignon à l'extérieur des blessures : le débordement est deux fois plus fréquent lorsqu'il y a eu gel préalable, c'est-à-dire que la colonisation des zones voisines se fait plus tôt dans ce type d'inoculation. Il ne faut cependant pas donner trop d'importance à cette différence car elle est bien trop faible pour faire apparaître des degrés dans la réponse de l'hôte, en ce qui concerne sa cicatrisation en particulier.

Toujours en ce qui concerne le gel artificiel, nous avons pu mettre en évidence une différence entre les pins portugais et les pins landais ; en effet, au bout de 9 mois et pour les inoculations par gel-blessure-mycélium (souche des Landes) uniquement, tous les pins portugais ont vu le *Caliciopsis* déborder à l'extérieur de la blessure alors que sur les pins landais, le cas ne se produit pas. Sans que ceci puisse être une mise en évidence de la plus grande sensibilité au froid des pins portugais, nous pouvons cependant en conclure que toutes choses égales d'ailleurs, le gel artificiel a causé un traumatisme plus important aux pins portugais et ceci s'est traduit par une extension plus rapide du champignon. Ici encore, la différence est très faible et n'a été que passagère.

Avec l'étude du mode de pénétration du *Caliciopsis pinea* Peck., celle des réactions de l'hôte constituait un des buts même de notre travail. Les premiers symptômes que nous avons relevés sont ceux concernant le degré de cicatrisation des blessures inoculées ; ces observations mettent en évidence de façon nette que la présence du champignon dans les zones blessées perturbe la cicatrisation de façon appréciable, la freinant seulement quelquefois, l'inhibant très tôt dans d'autres cas. Un tel phéno-

mène est typique des parasites de blessure comme le *Cytospora leucostoma* par exemple ou le *Dasyscypha willkommii*.

En ce qui concerne l'apparition de chancres du type observé en nature, les auteurs nord-américains RAY (1936) et FUNK (1963) l'ont obtenue sur *Pinus strobus* après inoculation sur blessure (trois mois après l'inoculation, FUNK). Il faut noter que les symptômes sur *P. strobus* sont assez différents : en effet, les chancres liés au *Caliciopsis pinea* Peck. y sont bien délimités et typiques, ce qui n'est absolument pas le cas sur le pin maritime.

Dans notre expérience, l'apparition de chancres véritables est beaucoup plus lente ; nous voyons actuellement dans les fissures anormales qui apparaissent au voisinage des blessures les premiers signes de cette apparition mais ceci sera ou non confirmé par les observations ultérieures.

Le stade ultime des réactions de l'hôte pourrait être son dépérissement mais il nous semble probable, compte tenu de l'extrême lenteur d'évolution du *Caliciopsis pinea* Peck. que ce stade reste actuellement problématique.

Ces inoculations nous ont permis d'autres observations, concernant le *Caliciopsis* lui-même.

Dès 3 mois après les inoculations, une différence fondamentale nous est apparue entre les deux souches : celle du pin d'Alep donnait uniquement des pycnides sur pin maritime, celle du pin maritime donnait des pycnides et d'abondants ascocarpes mûrs. Il était alors tentant d'en déduire qu'il s'agissait de deux formes biologiques distinctes du *Caliciopsis pinea* Peck. ; on peut noter toutefois que la souche, cultivée plusieurs mois, a pu se dégrader et perdre son aptitude à fructifier sous la forme parfaite.

Malgré cette objection, on peut penser que nous avons de fortes chances d'être en présence de deux formes biologiques.

Un autre point à souligner est l'apparition *rapide* d'ascocarpes dans le cas de la souche du pin maritime inoculée au pin maritime. Ce résultat diffère sensiblement de ceux obtenus par les auteurs qui ont expérimenté sur *Pinus strobus* avec des souches obtenues à partir de ce même hôte.

RAY fit ses inoculations au printemps 1934 et rapporte que jusqu'en août 1935 (soit 15 mois plus tard) aucune colonne stromatique n'était apparue, alors que les symptômes étaient reconstitués en automne 1934 (soit 4 mois après les inoculations environ).

FUNK (1963) obtint des résultats similaires ; il reconstitua les symptômes en 3 mois et n'obtint aucun ascocarpe même 14 mois après les inoculations.

Nous obtenons donc un résultat inverse : reconstitution des diverses formes du *Caliciopsis* très rapidement (3 mois), reconstitution des symptômes très lente (douce au bout de 15 mois). FUNK précise que ses inoculations ont été faites sur *branches* alors que les nôtres l'ont été sur jeunes troncs, la lenteur d'apparition des symptômes s'explique peut-être par ce seul fait.

II. — ESSAIS *IN VITRO*

Parmi les essais que nous avons réalisés, nous ne mentionnerons ici que ceux qui nous semblent apporter des éléments nouveaux à la connaissance du *Caliciopsis pinea* Peck.

Ces essais comprennent :

- une étude comparée de la croissance des deux souches du *Caliciopsis*.
- une étude de la fructification *in vitro*.

a — *Matériel et méthodes**Inoculum*

Les souches mycéliennes utilisées provenaient l'une du Lubéron (Vaucluse), isolée à partir du pin d'Alep, l'autre des Landes, à partir du pin maritime. Ces deux souches sont pluri-ascospores.

Substrats

Pour l'étude de la croissance, nous avons utilisé un milieu gélifié au malt (4 %) et un milieu à l'avoine (1).

Pour l'étude de la fructification, nous avons utilisé des bûchettes stérilisées de pin maritime et de pin sylvestre en tube.

Technique

Sur ces différents substrats, les ensemencements ont été faits par des pastilles prélevées à l'emporte-pièce dans des colonies du champignon en boîte de Pétri.

La mesure de la croissance a été effectuée en marquant périodiquement le pourtour de la colonie par un trait d'encre de Chine, sur le fond de la boîte. Le résultat final est reporté sur papier photographique par tirage direct, puis les croissances successives sont mesurées par pesée du papier. Trois séries comparatives ont été faites successivement, chacune comportant 5 à 10 boîtes de chaque souche. Dans la première série étaient incluses des boîtes au milieu avoine. Les courbes qui figurent ici sont la moyenne des différentes répétitions à l'intérieur de la première série.

b — *Résultats**Croissance mycélienne*

Menée pendant 20 jours ou davantage, la croissance de la souche du pin d'Alep s'est toujours montrée légèrement meilleure que celle du pin maritime, aussi bien sur le milieu au maltéa que sur celui à l'avoine. La croissance sur le milieu à l'avoine est plus rapide que sur milieu au maltéa (fig. 3).

Fructifications in vitro

Quatre essais ont été réalisés successivement et ont donné les résultats suivants :

Nous n'avons jamais obtenu d'ascocarpes bien que certaines structures pouvaient faire penser à leur ébauche ; nous avons obtenu uniquement des pycnides

(1) Milieu à l'avoine : H₂O, 1 000 cm³, farine d'avoine 50 g, NaCl 5 g, gélose 15 g.

FIG. 3

Croissance comparée des deux souches de Caliciopsis pinea.

En abscisse : nombre de jours de croissance.

En ordonnée : en cm² : surface colonisée par le champignon.

en cm : diamètre de la colonie.

ainsi que des formations stromatiques anormales, que ce soit sur pin maritime ou sur pin sylvestre (fig. 4 et 5). Les deux souches du *Caliciopsis* se comportent de la même manière. Quelques conditions se sont montrées nécessaires à la fructification :

— la lumière naturelle influe de façon déterminante : il n'y a pratiquement aucune apparition de pycnide à l'obscurité ; par contre, les pycnides apparaissent 10 à 20 jours après l'exposition des tubes à la lumière naturelle (fig. 6).

— le support favorise aussi dans une large mesure la fructification : l'écorce est particulièrement favorable à l'apparition des pycnides alors que le bois l'est beaucoup moins.

c — Discussion - Conclusion

L'étude de la croissance *in vitro* a été faite avec plusieurs répétitions car à l'intérieur de la même souche, nous avons rencontré des irrégularités dans la croissance qui risquent de fausser le résultat si elles ne sont pas compensées.

Ainsi, la différence entre la souche du pin d'Alep et celle du pin maritime a été retrouvée lors de trois séries distinctes ; malgré la faiblesse de la différence, ce fait doit jouer en faveur de la thèse des deux formes biologiques de la même espèce : *Caliciopsis pinea* Peck.

FIG. 4. — *Fructifications anormales de Caliciopsis pinea obtenues in vitro sur bûchette (dimension maximale 0,5 mm).*

FIG. 5. — *Pycnides de Caliciopsis pinea obtenues in vitro sur bûchette (diamètre 100 μ).*

Si au cours de l'étude de la fructification in vitro nous n'avons pas pu, pour des raisons techniques, étudier l'influence de l'alternance jour-nuit, nous avons pu cependant montrer le rôle primordial du facteur lumière. Il semble d'ailleurs qu'un

FIG. 6. — Fructifications du *Caliciopsis pinea* sur bâchettes de *pin maritime* (échelle 1).

1. Partie exposée à la lumière naturelle. — 2. partie maintenue à l'obscurité par un capuchon opaque.
E : écorce. B : bois.

Ces pycnides ont été obtenues en 10 à 20 jours à la température du laboratoire. Elles sont représentées ici par les pointillés.

séjour prolongé à l'obscurité avant l'exposition à la lumière permet une fructification plus abondante.

Un autre fait, peut-être plus apte à expliquer certaines observations faites en nature, est l'abondance particulière de pycnides sur l'écorce. Nous pensons que cette différence pourrait s'expliquer, au moins partiellement, par la dissemblance structurale qui existe entre le bois d'organisation compacte et l'écorce faite de tissus morts et plus ou moins disloqués.

Cette fructification préférentielle *in vitro* sur l'écorce, support relativement sec, est peut-être en rapport avec l'affinité du *Caliciopsis pinea* Peck. pour les organes déperissants. Ces organes où la circulation de sève est ralentie, sont beaucoup moins

turgescents que les organes parfaitement sains. Cette observation peut donc s'accorder avec le comportement de parasite de faiblesse du champignon, sans qu'elle puisse en constituer une preuve. BIER (1959) montra que l'*Hypoxylon pruinaum* n'attaquait les érables que lorsque la turgescence relative de l'écorce descendait au-dessous de 75-77 %. Peut-être avons-nous ici pour le *Caliciopsis pinea* Peck. un phénomène comparable. Par contre, FUNK (1963) rapporte que le *Caliciopsis pinea* est virtuellement absent des régions sèches de la Colombie Britannique et interprète ce fait par l'impossibilité de la spermatisation naturelle par la pluie des structures appropiées.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Notre travail sur le *Caliciopsis pinea* Peck., entrepris dans le cadre du dépérissement du pin maritime des Landes, nous a permis de nous rendre compte de l'insuffisance des connaissances à son sujet. Connue en France en 1965 uniquement dans le massif landais et le massif du Lubéron (Vaucluse), sur pin maritime et pin d'Alep principalement, nous le connaissons aujourd'hui dans le Jura, la Meuse et la Meurthe-et-Moselle, sur pin noir d'Autriche et pin sylvestre. Ce fait nous permet d'envisager pour cet agent une répartition en France beaucoup moins localisée que nous pouvions le penser au départ.

L'adaptation de différentes formes aux diverses essences n'est pas à exclure compte tenu des résultats que nous avons obtenus avec la souche du pin d'Alep inoculée sur pin maritime.

En accord avec les auteurs américains FUNK (1963) et RAY (1936), nos inoculations ont mis en évidence le caractère de parasite de blessure du *Caliciopsis pinea* Peck. Ainsi nous pouvons ébaucher une partie du cycle biologique de ce champignon : les ascocarpes fournissent un inoculum permanent tout au cours de l'année émettant des ascospores très aptes à l'infection au niveau des blessures accidentelles dues aux insectes ou à tout autre agent et aussi au niveau des cicatrices foliaires. Le cycle peut se réaliser rapidement : à partir de la pollution par ascospores, nous l'avons réalisé expérimentalement en moins de 3 mois.

Il n'est pas certain que dans les conditions naturelles le cycle se réalise obligatoirement dans ces délais. Certaines observations nous permettent de penser que le *Caliciopsis pinea* peut se maintenir dans les tissus en ne produisant que de rares fructifications, celles-ci ne devenant très abondantes chez les sujets sains qu'au niveau des ouvertures accidentelles ou naturelles, à tous les niveaux chez les sujets dépérissants. Sans doute le champignon joue-t-il un rôle dans le processus de dépérissement. Cependant, la lenteur d'apparition des symptômes expérimentaux ne nous permet pas actuellement de définir son rôle pathogène réel.

REMERCIEMENTS

Notre travail a été entrepris au Laboratoire de Pathologie végétale du Centre de Recherches agronomiques du Sud-Ouest. Nous remercions particulièrement son Directeur, Monsieur GROSCLAUDE, qui nous a fait profiter de son expérience en matière d'inoculation sur végétal ligneux et qui nous a conseillé dans ce premier travail.

Nous remercions également Monsieur GUINAUDEAU, Directeur de la Station de Recherches forestières du Sud-Ouest, qui nous a fourni le matériel à inoculer et qui a porté un grand intérêt à notre activité en région bordelaise.

Nous remercions enfin Monsieur LANIER, Directeur du Laboratoire de Pathologie forestière de Nancy, qui nous a posé le problème du *C. pinea*, qui nous en a fait sentir l'intérêt et qui a suivi nos recherches avec attention et bienveillance.

SUMMARY

CONTRIBUTION TO THE STUDY OF *Caliciopsis pinea* PECK :
RESULTS OF ARTIFICIAL INOCULATIONS AND TRIALS *in vitro*

Caliciopsis pinea Peck was studied with regard to its role in the decay of the maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) in the Landes region.

Artificial inoculations were carried out in the natural habitat. Inoculations were performed with and without injury ; the inoculum was used in both mycelial and spore forms. Two different strains of *C. pinea* were used, one isolated from *Pinus halepensis* and the other from *Pinus pinaster*. Pines of two origins were studied, one of Portuguese origin and one from the Landes region.

The results are as follows :

When inoculated into *P. Pinaster*, *C. pinea* from *P. halepensis* only produced sporiferous forms, while that from *P. pinaster* produced sporiferous forms and ascocarps. It clearly has two distinct biological forms.

With regard to the fungus, the pines of both origins behave in a closely similar manner.

C. pinea is a typical injury parasite : the success of inoculations on injured areas is 100 %, that on artificial leaf scars 80 %, and that on intact bark, 0 %.

C. pinea partially inhibits cicatrization of injuries : the level of complete healing at the end of 15 months is 25 % in five-year trees, 52.7 % in two-year trees, and 100 % in controls.

Symptoms connected with the presence of *C. pinea* in nature are not reconstituted at the end of 15 months ; the presence of abnormal crevices around the injured area suggests the beginning of chancrous process.

In vitro, *C. pinea* cultivated on sticks of dry wood produces only sporiferous forms. Light is essential to their formation ; they appear in 10 to 20 days under natural light ; they form abundantly on the bark, much less on the wood.

Cultivated on maltose agar (4 %), the two strains studied are distinguished by a slight difference in growth.

ZUSAMMENFASSUNG

DIE UNTERSUCHUNG VON *Caliciopsis pinea* PECK STELLT EINEN BEITRAG
ZUR ERFORSCHUNG DES ABSTERBENS DER SEESTRANDKIEFER (*Pinus pinaster* AIT.)
IN DEN LANDES DAR

Um die Wirkungsweise dieses Pilzes bei der Seestrandkiefer festzustellen, wurden Impfungen mit Sporen und Myzelium, mit und ohne Verletzung der Bäume, im Freiland durchgeführt. Zwei verschiedene Stämme von *C. pinea*, — der eine wurde an *Pinus halepensis*, der andere an *Pinus pinaster*

isoliert — wurden an einer Kiefernprovenienz aus Portugal und einer Provenienz aus den Landes untersucht.

Folgende Ergebnisse wurden erzielt :

Impfungen mit *C. pinea* des *P. halepensis* — Stammes bringen an der Seestrandkiefer nur Pyknidien hervor ; der *P. pinaster*-Stamm bildet jedoch Pyknidien und Aszi aus. Es scheint sich zweifelsohne um zwei verschiedene biologische Formen zu handeln.

Die beiden Kiefernprovenienzen zeigen dem Pilz gegenüber ein sehr ähnliches Verhalten.

Caliciopsis pinea ist ein typischer Wundparasit und der Erfolg der Impfungen beträgt bei Stammverletzungen 100 %, bei künstlichen Blattverletzungen 80 % und bei unverletzter Rinde 0 %.

C. pinea verhindert teilweise die Wundheilung. Nach 15 monatiger Beobachtung konnte eine vollständige Wundheilung bei 25 % der fünfjährigen Bäume, bei 52,7 % der zweijährigen Bäume und bei 100 % der Bäume des Blindversuches festgestellt werden.

Die durch die Anwesenheit von *C. pinea* in der Natur hervorgerufenen Symptome zeigen sich noch nach 15 Monaten ; Abnormale Risse in der Umgebung der Verletzungen lassen auf den Beginn einer krebsartigen Entwicklung schiessen.

Bei Kultur von *C. pinea* in vitro auf kleinen Stammab schnitten werden nur Pyknidien ausgebildet ; Licht ist für ihre Bildung unumgänglich notwendig. Die Pyknidien erscheinen nach 10 bis 20 Tagen bei natürlicher Beleuchtung und bilden sich sehr zahlreich vor allem auf der Rinde und in weitaus geringerem Masse auch am Holz.

Bei Gelatinekulturen mit Malzzusatz (4 %) differenzieren sich die beidem Stämme von *Caliciopsis pinea* durch einen geringen Unterschied im Wachstum.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES (1)

- ARNAUD G., 1930. — Les Astérinées. V. Etude sur les champignons parasites. Caliciacées, Hemisphaeriaceées... *Ann. Epiphyties*, **16**, 235-302.
- BIER J.E., 1961. — The relation of bark moisture to the development of canker diseases caused by native, facultative parasites. VI. Pathogenicity studies of *Hypoxylon pruinaum* and *Septoria musiva* on species of *Acer*, *Populus* and *Salix*. *Canad. J. Bot.*, **39**, 1555-1561.
- BONNEAU M. et LE TACON F., 1966. — *Le rôle du facteur sol dans le dépérissement du pin maritime dans les Landes de Gascogne. Premiers résultats.* (Données non publiées).
- BOUVAREL P., 1960. — Note sur la résistance au froid de quelques provenances de pin maritime. *Rev. forest. fr.*, **7**, 495-508.
- BOYCE J.S., 1948. — *Forest Pathology*. 572 p., 3^e éd., McGraw Hill Book Company, London.
- CHADEFAUD M., 1960. — *Les végétaux non vasculaires*. 553, Masson et Cie, Paris.
- CLEMENTS E. et SHEAR L., 1957. — *The genera of fungi*. 496 p., Hafner publishing Co, New York.
- FITZPATRICK H.M., 1920. — Monograph of the *Coryneliaceae* *Mycologia*, **12**, 206-207.
- FITZPATRICK H.M., 1942. — Revisionary studies in the *Coryneliaceae*. *Mycologia*, **34**, 464-514.
- FUNK A., 1963. — Studies in the genus *Caliciopsis*. *Canad. J. Bot.*, **41**, 503-543.
- FUNK A., 1964. — Extensions of the host ranges and distribution of *Caliciopsis* species on western conifers. *Plant. Dis. Rept.*, **48**, 9, 677-678.
- LANIER L., 1965. — Note sur une espèce cryptogamique nouvelle pour la France sur différents pins dont le pin maritime des Landes. *Rev. forest. fr.*, **1**, 34-41.
- MCCORMACK H.W., 1936. — The morphology and development of *Caliciopsis pinea*. *Mycologia*, **28**, 188-196.

(1) Outre les auteurs cités dans cette étude, nous avons fait figurer des références concernant le *Caliciopsis pinea* Peck.

- OVERHOLTS L.O., 1930. — Mycological notes for 1928-1929. *Mycologia*, **22**, 232-246.
- PEACE T.R., 1962. — Pathology of trees and shrubs. 753, p. Clarendon Press, Oxford.
- PECK C., 1880. — *Annual Report. New York State Museum*, **33**, 32.
- RAY W.W., 1936. — Pathogenicity and cultural experiments with *Caliciopsis pinea*. *Mycologia*, **28**, 201-207.
- REHM H., 1896. — *Rabenhorst Kryptogamen Flora*, **1**, 3, 382.
- SACCARDO P.A., 1899. — *Sylloge fungorum*, **8**, 825.
- SACCARDO P.A., 1891, *Sylloge fungorum*, **9**, 1073.
-