Microflore interne des tissus ligneux de l'épicéa commun sur pied

II. — Etude *in vitro* de la microflore naturelle

C. DELATOUR et Gilberte SYLVESTRE-GUINOT

Laboratoire de Pathologie forestière,
Centre national de Recherches forestières, I.N.R.A.,
Champenoux, 54280 Seichamps

Résumé

Dans la suite logique d'un travail d'inventaire de la microflore naturelle des troncs de l'épicéa commun sur pied (*Picea abies*) (Delatour, 1976), les auteurs ont étudié au laboratoire le comportement des principaux constituants de cette microflore : *Fomes annosus*, *Phialophora* sp., *Nectria fuckeliana* var. *fuckeliana*, *Ascocoryne sarcoides* et trois souches de *Scytalidium* sp. Ils se sont attachés à préciser le comportement de chaque souche vis-à-vis du bois d'épicéa (pouvoir lignivore) ainsi que le type de relations qu'entretient le *F. annosus* avec les autres espèces sur milieu gélosé et surtout dans le bois. Les résultats obtenus montrent que seul le *F. annosus* est capable de provoquer des pertes de masses importantes au bois d'épicéa (jusqu'à $36,4 \cdot 10^{-2}$ p. 100 j), les autres espèces doivent donc être considérées en principe comme inoffensives pour le bois. Parmi les espèces considérées antérieurement en tant que pionniers, le *N. fuckeliana* se révèle incapable d'entraver l'action du *F. annosus* contrairement au *Phialophora* sp. qui présente une certaine aptitude retardatrice lorsqu'il est premier occupant. L'*A. sarcoides*, premier occupant, gêne très largement l'installation du *F. annosus* et pourrait l'éliminer des sites déjà colonisés. Les *Scytalidium* sp. qui ne sont pas des pionniers sont très dépressifs pour le *F. annosus* allant jusqu'à l'éliminer totalement du bois qu'il avait envahi.

Introduction

Nous avons rendu compte dans un article précédent (Delatour, 1976) de l'inventaire que nous avons fait de la microflore qui se développe spontanément dans les tissus ligneux du tronc des épicéas sur pied (*Picea abies* (L.) Karst.).

Nous avons mis en évidence l'existence de trois groupes distincts composés : 1) d'espèces liées préférentiellement au bois sain (*Mollisia* sp., *Nectria fuckeliana* var. *fuckeliana*), 2) d'espèces liées au bois sain comme au bois altéré (*Fomes annosus*, *Ascocoryne sarcoides*), 3) d'espèces liées exclusivement au bois altéré (*Scytalidium*, *Trichoderma*, bactéries, etc...). Analysant ces faits, nous avons avancé l'hypothèse que ces groupes peuvent appartenir à des séquences d'un phénomène de succession. L'étude expérimentale dont nous allons faire état se propose d'apporter des lumières sur cette hypothèse de la succession en précisant notamment les relations entre les diverses espèces et leur comportement dans le bois.

Matériel et méthode

1.1. — Les souches utilisées

1.11. *Le Fomes annosus* (Fr.) Cooke.

Au cours de notre étude, nous avons été amenés à utiliser différentes souches toutes isolées d'arbres sur pied :

Fa AB : isolée d'épicéa le 29/5/69 à Liffol-le-Grand (88) conservée sur malt agar 3 p. 100 pendant 28 mois puis sur bûchettes de bois.

Fa C : isolée d'épicéa le 8/9/71 à Moncel-sur-Seille (54) conservée sur malt agar 3 p. 100 pendant 1 mois puis sur bûchettes.

Fa D : isolée d'épicéa le 16/6/72 à Moncel-sur-Seille (54) conservée sur malt agar 3 p. 100.

Fa E : isolée de sapin le 27/7/72 dans la région de Besançon (25) conservée sur malt agar 3 p. 100.

Fa F : isolée d'épicéa le 21/11/72 à Liffol-le-Grand (88) conservée sur malt agar 3 p. 100.

Fa 210 : isolée d'épicéa le 29/8/74 à Liffol-le-Grand (88) conservée sur malt agar 3 p. 100.

1.12. *Les autres champignons.*

Ascocoryne sarcoides (Jacq. ex Gray) Groves et Wilson : souche isolée d'épicéa sur pied le 7/8/69 à Liffol-le-Grand (88) conservée sur malt agar 3 p. 100 pendant 26 mois puis sur bûchettes.

A. sarcoides 210 : souche isolée d'épicéa sur pied le 29/8/74 à Liffol-le-Grand (88) conservée sur malt agar.

Nectria fuckeliana Booth var. *fuckeliana* Booth, *Phialophora* sp. *, *Scytalidium* sp. : souches S2, S30, S38 isolées et conservées dans des conditions identiques à *A. sarcoides*.

1.2. — Croissances et confrontations sur milieu nutritif

1.21. *Milieu utilisé.*

Malt agar Difco à 3 p. 100 de malt à raison de 20 cm³ par boîte de Petri en polystyrène de 8,5 cm de diamètre. Milieu autoclavé à 120 °C pendant 20 mn.

1.22. *Croissances simples.*

L'inoculum est constitué par une pastille de 5 mm de diamètre prélevée en marge d'une colonie en croissance active ; elle est déposée, mycélium vers le bas, à 12 mm du bord de la boîte de Pétri à ensemençer. Les incubations ont eu lieu à l'obscurité à 25 °C.

* Nous avons décrit cette souche précédemment sous le nom de *Mollisia* sp. (Delatour, 1976). Bien que proche de ce genre et après analyses complémentaires, elle ne semble pas pouvoir s'y rattacher selon l'avis de MM. Dennis, Graddon et Spooner, de Kew (G. B.) que nous avons consultés. Nous ne retiendrons donc, pour l'instant, que la dénomination basée sur la forme imparfaite : *Phialophora* sp.

1.23. Croissances doubles (confrontations).

Le mode opératoire est le même que pour les croissances simples mais ici, deux implantations diamétralement opposées ont lieu (distance entre les implants : 60 mm).

1.3. — Comportement in vitro des champignons dans le bois

Cette partie de notre travail a consisté principalement à déterminer le pouvoir lignivore des souches étudiées.

Il s'agit soit du pouvoir lignivore de chaque souche prise isolément, soit de celui d'une association entre deux champignons ceux-ci étant implantés successivement dans un ordre donné.

D'autre part, dans le cas de l'association entre deux champignons, nous avons cherché, en complément du pouvoir lignivore, à déterminer le degré d'implantation de chacun d'entre eux dans le bois.

FIG. 1. — Test d'altération, mode opératoire.

Stade 1. — Dessiccation des éprouvettes. Récipient fermé garni d'un lit de gel de silice sur lequel reposent, ouverture en bas, les tubes de verre bouchés au coton contenant chacun une éprouvette de bois numérotée. Dessiccation obtenue à 100-105 °C pendant 48 h.

Stade 2. — Mesure du poids sec initial de chaque éprouvette (P1).

Stade 3. — Stérilisation des éprouvettes : 100-105 °C pendant 3 h.

Stade 4. — Réhumectation des éprouvettes : 10 mn dans l'eau stérile.

Stade 5. — Inoculation et incubation. Epreuve disposée dans un tube à essais. Ce tube renferme le champignon à étudier, cultivé sur milieu gélosé incliné. Entre l'éprouvette et la culture a été intercalée une baguette de verre de 2 mm de diamètre recourbée en forme de diapason. Le tube est bouché par un coton hydrophile arasé puis operculé par un papier. L'incubation se fait en étuve obscure à 23 °C et 75 p. 100 minimum d'humidité relative, elle dure de 100 à 200 jours.

Stade 6. — Mesure du poids sec final (P2) avec utilisation du dispositif illustré au stade 1.

Test of decay capacity-Method.

Stage 1. — Wood blocks dessiccation. Corked flaske including a layer of silicagel on which are glass tubes plugged with cotton, staying the opening down. Each tube contains one wood-block. Dessiccation is obtained after 48 hrs at 100-105 °C.

Stage 2. — Measurement of the initial dry weight of each wood-block (P1).

Stage 3. — Sterilisation of wood-blocks : 100-105 °C during 3 hrs.

Stage 4. — Rehydration of wood-blocks : 10 mn in sterile water.

Stage 5. — Inoculation and incubation. Wood-block in a test tube : this tube is containing the studied fungus on slope of malt-agar ; between the wood-block and the fungus is a little stick of glass curved like a diapason. The test tube is plugged with a cotton and sealed with a paper. Incubation is conducted in darkness at 23 °C and 75 p. 100 R.H. during 100-200 days.

Stage 6. — Measurement of the final dry weight (P2) by the same procedure used at stage 1.

1.31. Détermination du pouvoir lignivore. Tests d'altération.

Le pouvoir lignivore d'un champignon est défini par la perte de masse qu'il occasionne à un bois pendant un temps donné. Pour le déterminer, la méthode consiste donc à implanter le champignon à tester dans des éprouvettes de bois (ici l'épicéa) de poids sec connu puis de les faire incuber dans des conditions contrôlées de température et d'humidité. Après cette incubation, on détermine le nouveau poids sec des éprouvettes et on calcule l'éventuelle perte de masse.

La méthode que nous avons utilisée (fig. 1) est issue pour une grande part de celle décrite par la norme AFNOR NF $\times$ 41-502.

Les éprouvettes sont en bois de *Picea abies* ($30 \times 10 \times 5$ mm), leur poids sec est déterminé après passage à 100-105 °C pendant 48 h puis, après stérilisation à sec (100-105° pendant 3 h), elles sont réhumidifiées jusqu'à 36-40 p. 100. Chaque éprouvette est ensuite posée sur une colonie du champignon à étudier en tube incliné (15 répétitions par souche). Pour les inoculations doubles, l'éprouvette est retirée après 20 ou 30 j puis posée sur la seconde souche. Chaque tube est bouché et protégé contre les acariens (Rapilly, 1968) puis disposé en étuve obscure à 23 °C et 75 p. 100 d'humidité relative. L'incubation dure en général 4 à 6 mois à l'issue de laquelle le nouveau poids sec est mesuré ; toutes les pertes de masse sont exprimées en valeurs journalières (p. 100 j).

1.32. Degré d'implantation des espèces inoculées successivement.

Pour les associations avec le *F. annosus* dans l'essai n° 4 et entre *F. annosus* et *A. sarcoides* dans l'essai n° 5, nous avons déterminé, par isolement, le degré d'implantation des diverses espèces dans les éprouvettes.

Dans chaque modalité, trois éprouvettes ont été examinées, chacune est fendue par le milieu et plusieurs fragments prélevés dans la profondeur du bois, constituent des implants que l'on dépose sur milieu nutritif gélosé (malt agar 3 p. 100 et éventuellement milieu de Kuhlman et Hendrix, 1962). Le nombre d'implants ainsi prélevés varie entre 12 et 39. Le degré d'implantation de chaque espèce sera exprimé dans chaque modalité par le pourcentage d'implants chez lesquels le réisolement aura été obtenu.

De plus, on exprime séparément le mélange de deux espèces par le pourcentage d'implants desquels elles sont isolées simultanément.

Résultats

1. — Croissances et confrontations

Les résultats sont rassemblés dans la figure 2. Chaque couple étudié a été représenté par un graphique sur lequel, outre les courbes représentant les confrontations, nous avons fait figurer les croissances témoin en pointillé.

Parmi nos résultats, nous distinguerons trois groupes :

1.1. — Les couples 1 à 5 qui présentent une barrière d'antagonisme et dans lesquels le *N. fuckeliana* intervient le plus souvent.

FIG. 2. — Comportement des souches étudiées en confrontation sur malt-agar.

Double cultures with the different strains.

Abscisses (abscissa) : croissances en cm (rayons) (growth in cm (rays)).

Ordonnées (ordinate) : temps en jours (time in days).

Abréviations : Nf : *N. fuckeliana* var *fuckeliana*, Ph : *Phialophora* sp., Fa : *F. annosus*, As : *A. sarcoides*, S2, S30, S38 : les *Scytalidium*.

En trait plein sont figurées les confrontations, en pointillé sont figurées les croissances témoin (Continuous line is the growth of double cultures, dotted line is the growth of the control).

1.2. — Les couples 6 et 7 dans lesquels le *F. annosus* subit l'antagonisme de deux *Scytalidium* puis un certain envahissement.

1.3. — Les autres couples chez lesquels aucun effet net à distance n'est observé. Dans ce groupe, nous soulignerons l'aptitude des *Scytalidium* à envahir leurs par-

tenaires (notamment couple 8), ainsi que l'aptitude du *Phialophora* sp. à poursuivre une certaine croissance en mélange avec ses partenaires.

2. — Comportement des champignons dans le bois

2.1. — Pouvoir lignivore des souches étudiées.

Les pertes de masse observées sont consignées dans le tableau 1.

TABLEAU 1

Pouvoir lignivore : pertes de poids journalières enregistrées au cours de cinq essais successifs
Decay capacity : Daily weight losses recorded in five different trials

N° des essais	1		2		3		4		5	
Durée des essais (en jours)	75		119		160		160		171	
	p. 100 j (¹)	âge (²)	p. 100 j	âge	p. 100 j	âge	p. 100 j	âge	p. 100 j	âge
Souches utilisées <i>F. annosus</i>										
A-B	— 5,0	25	— 1,4	42						
C			— 23,9	12						
D			— 24,9	5						
E			— 36,4	4	— 11,8	9	— 9,0	18		
F			— 17,9	0						
210									— 10,7	2
A. sarcoides	+ 2,2	22	— 0,01	40	+ 0,1	45	+ 0,3	53		
A. sarcoides 210									— 0,06	2
N. fuckeliana	+ 2,0	22	— 0,6	40	+ 0,06	45	+ 0,3	53		
Phialophora	— 0,4	22	+ 0,06	40	— 0,2	45	— 0,1	53		
S22	+ 0,2	22	+ 0,1	40	— 0,4	45	— 0,2	53		
S30	— 0,1	22	+ 0,5	40	— 0,3	45	— 0,05	53		
S38	+ 2,0	22	+ 0,8	40	— 0,1	45	— 0,06	53		

(¹) p. 100 j : Perte de poids journalière exprimée en p. 100 du poids sec initial à multiplier par 10^{-2} . (Daily weight losses : p. 100 of the initial dry weight to be multiplied by 10^{-2}).

(²) Âge des souches (en mois) au début de chaque essai (Age of strains (months) at the beginning of each trial).

Ces résultats peuvent se résumer de la façon suivante :

— Seul le *F. annosus* permet d'enregistrer des pertes importantes, la perte la plus grande est celle occasionnée par la souche Fa E dans l'essai n° 2 ; la perte journalière de $36,4 \times 10^{-2}$ p. 100 j correspond à une perte observée de 43,4 p. 100 au bout de 119 j.

— Les autres espèces donnent toujours lieu à des pertes négligeables difficilement interprétables.

— Si l'on examine les pouvoirs lignivores en fonction de l'âge des souches, on constate pour le *F. annosus* que ce pouvoir baisse lorsque les souches vieillissent. Pour les autres espèces, on ne constate rien de tel à l'intérieur de la gamme d'âges disponible.

— Le pouvoir lignivore du *F. annosus* varie d'une souche à l'autre.

2.2. — Pouvoir lignivore des associations de deux espèces.

Les résultats figurent au tableau 2.

TABLEAU 2

Pouvoir lignivore : pertes de poids journalières à la suite d'inoculations doubles
Decay capacity : Daily weight losses following double inoculations

N° des essais (N° of trials)	3	4	5
<i>Fomes annosus</i>	— 11,8 ⁽³⁾	— 9,0	— 10,7
<i>F. annosus</i> + <i>A. sarcoides</i> ⁽¹⁾	— 11,0	— 2,5	— 10,3
<i>A. sarcoides</i> + <i>F. annosus</i>	— 0,7	+ 0,3	— 3,6
<i>A. sarcoides</i> ⁽²⁾ + <i>F. annosus</i>	— 14,8		
<i>F. annosus</i> + <i>N. fuckeliana</i>	— 11,0	— 6,5	
<i>N. fuckeliana</i> + <i>F. annosus</i>	— 10,1	— 13,2	
<i>N. fuckeliana</i> ⁽²⁾ + <i>F. annosus</i>	— 17,9		
<i>F. annosus</i> + <i>Phialophora</i>	— 7,3	— 8,6	
<i>Phialophora</i> + <i>F. annosus</i>	— 1,2	+ 0,2	
<i>Phialophora</i> ⁽²⁾ + <i>F. annosus</i>	— 14,9		
<i>F. annosus</i> + <i>Scytalidium</i> S2	— 1,8	+ 0,2	
<i>Scytalidium</i> S2 + <i>F. annosus</i>	— 0,3	— 0,1	
<i>F. annosus</i> + <i>Scytalidium</i> S30	— 1,6	— 2,5	
<i>Scytalidium</i> S30 + <i>F. annosus</i>	— 0,5	— 0,1	
<i>F. annosus</i> + <i>Scytalidium</i> S38	— 1,7	— 0,6	
<i>Scytalidium</i> S38 + <i>F. annosus</i>	— 0,3	+ 0,1	

⁽¹⁾ Les espèces sont écrites dans l'ordre d'inoculation (Order of the species is that of inoculation).

⁽²⁾ Le premier occupant a été tué par la chaleur avant inoculation du second (The first fungus was killed by heat before inoculation by the second one).

⁽³⁾ Perte de poids journalière exprimée en p. 100 du poids sec initial à multiplier par 10^{-2} (Daily weight losses : p. 100 of the initial dry weight to be multiplied by 10^{-2}).

On peut les résumer de la façon suivante :

— L'association avec *N. fuckeliana* conduit toujours à des pertes importantes généralement assimilables à la perte occasionnée par *F. annosus* seul sauf dans l'essai n° 4 où le *N. fuckeliana* semble favoriser l'activité lignivore ultérieure du *F. annosus*.

— Pertes importantes lorsque *F. annosus* est le premier occupant mais pertes faibles ou négligeables lorsqu'il est inoculé en second dans les associations avec *A. sarcoides* et *Phialophora*.

— Pertes faibles ou négligeables même lorsque le *F. annosus* est le premier occupant dans tous les cas d'association avec les *Scytalidium*.

— Enfin, lorsque le premier occupant *A. sarcoides*, *Phialophora* ou *N. fuckeliana* est tué par la chaleur avant l'implantation du *F. annosus*, on constate toujours des pertes importantes plus grandes que lorsque *F. annosus* est le premier et seul occupant.

2.3. — Degré d'implantation des espèces inoculées successivement.

Les résultats figurent au tableau 3 que l'on peut résumer comme suit :

— l'association avec le *N. fuckeliana* conduit à la disparition de celui-ci quel que soit le premier occupant,

TABLEAU 3

*Survie dans le bois des espèces inoculées successivement**Survival in the wood of the associated species*

N° de l'essai (N° of trial)	Type d'association (Type of association)	Nombre d'implants (Number of samples)	p. 100 d'implants hébergeant chaque champignon (p. 100 of sample including each species)	p. 100 d'implants hébergeant les deux espèces en mélange (p. 100 of sample including the two species mixed)
4	<i>F. annosus</i> + <i>A. sarcoides</i>	36	86 + 22	13
	<i>A. sarcoides</i> + <i>F. annosus</i>	18	16 + 11	5
	<i>A. sarcoides</i> (1) + <i>F. annosus</i>	18	0 + 77	0
5	<i>F. annosus</i> + <i>A. sarcoides</i>	39	71 + 48	25
	<i>A. sarcoides</i> + <i>F. annosus</i>	36	58 + 50	11
4	<i>F. annosus</i> + <i>N. fuckeliana</i>	36	75 + 0	0
	<i>N. fuckeliana</i> + <i>F. annosus</i>	12	0 + 83	0
	<i>N. fuckeliana</i> (1) + <i>F. annosus</i>	18	0 + 100	0
4	<i>F. annosus</i> + <i>Phialophora</i>	36	91 + 13	13
	<i>Phialophora</i> + <i>F. annosus</i>	18	38 + 100	38
	<i>Phialophora</i> (1) + <i>F. annosus</i>	18	0 + 83	0
4	<i>F. annosus</i> + <i>Scytalidium</i> S2	30	0 + 56	0
	<i>Scytalidium</i> S2 + <i>F. annosus</i>	36	100 + 0	0
4	<i>F. annosus</i> + <i>Scytalidium</i> S30	36	30 + 30	0
	<i>Scytalidium</i> S30 + <i>F. annosus</i>	36	100 + 0	0
4	<i>F. annosus</i> + <i>Scytalidium</i> S38	36	0 + 91	0
	<i>Scytalidium</i> S38 + <i>F. annosus</i>	36	100 + 0	0

(1) Le premier occupant a été tué par la chaleur avant inoculation du second (The first fungus was killed by heat before inoculation by the second one).

— les deux espèces associées cohabitent :

- Quel que soit le premier occupant, avec une possibilité de mélange assez importante : *A. sarcoides*, *Phialophora* sp.

- Elles ne cohabitent que si le *F. annosus* est le premier occupant mais celui-ci est absent s'il a été inoculé en second : *Scytalidium* S30.

— Exclusion du *F. annosus* quel que soit le premier occupant : *Scytalidium* : S2 et S38.

Discussion

Au cours de nos travaux, nous avons d'abord utilisé la température de 25 °C pour les croissances et confrontations *in vitro*. Il s'agissait de la température utilisée par Klingstrom *et al.* (1960) pour leurs études sur *Scytalidium* spp. et *F. annosus* ; à plus basse température d'ailleurs (10 °C), les mêmes antagonismes étaient observés. Nous sommes revenus par la suite à la température de + 23 °C qui est celle de l'optimum de croissance pour le *F. annosus* ; nous sommes cependant bien conscients de l'imperfection qui peut entacher des études faites à une seule température, en particulier lorsqu'il s'agit de relations entre espèces car il est possible qu'à basses températures notamment, certains effets s'estompent (Hyppel, 1963).

Cette question rejoint le problème plus général qui est de savoir dans quelle mesure les résultats que nous avons obtenus *in vitro* permettent d'éclairer ce qui se passe dans la nature ; les tests que nous avons mis en place sont en fait très simplificateurs par rapport aux conditions naturelles : températures constantes, populations fongiques réduites à l'effectif 2, éprouvettes de bois entièrement sorties de leur contexte, etc...

Malgré leur aspect artificiel lié à tout essai *in vitro*, nos résultats ne sont pas en désaccord avec nos observations *in situ* (Delatour, 1976) et au contraire ils semblent les compléter généralement d'une façon cohérente comme nous le verrons par la suite cas par cas.

En matière de pouvoir lignivore, nous avons vu que seul le *F. annosus* dans les conditions de nos essais est capable d'occasionner des pertes de masse importantes au bois d'épicéa pouvant aller jusqu'à $-36,4 \cdot 10^{-2}$ p. 100 j ; une altération encore plus importante ($-48 \cdot 10^{-2}$ p. 100 j) a été obtenue par Kaarik *et al.* (1957) et on peut estimer qu'entre -30 et $-50 \cdot 10^{-2}$ p. 100 de pertes journalières, il s'agit d'altération très fortes. Des pertes moins importantes sont plus courantes : $-27,2 \cdot 10^{-2}$ p. 100 j (Kaarik *et al.*, 1957) — $-22,6 \cdot 10^{-2}$ p. 100 j (Delatour, 1975) — $-14,2 \cdot 10^{-2}$ p. 100 j (Peek *et al.*, 1976) — $-12 \cdot 10^{-2}$ p. 100 j (Shain, 1971) — $-8,0 \cdot 10^{-2}$ p. 100 j (Perrin *et al.*, 1975). Nous avons nous-même obtenu des chiffres très différents y compris des pertes très faibles. Nos résultats font apparaître deux sources de variations distinctes : variation d'une souche à l'autre, variation dans le temps. Les variations du pouvoir lignivore entre les souches de *F. annosus* ont été peu étudiées. Cobb *et al.* (1967) ont observé une plus grande aptitude lignivore d'une souche isolée de *Pinus ponderosa* Laws comparée à une souche d'*Abies concolor* (Gord. et Glend) Lindl. Courtois (1973) mentionne également de telles variations. L'affaiblissement du pouvoir lignivore au cours du temps est un fait très important sur le plan expérimental et il serait intéressant de chercher à le stabiliser par des méthodes de conservation adaptées. Quoi qu'il

en soit, ces variations expliquent l'hétérogénéité des chiffres cités par les divers auteurs. De plus, une autre source de variation est constituée par l'hétérogénéité du bois lui-même à l'intérieur d'un même arbre et probablement aussi entre les arbres.

Les constituants de la microflore interne de l'épicéa autres que le *F. annosus* ont un comportement bien différent puisqu'aucun ne présente de pouvoir lignivore net.

Nous remarquerons que, pour ces espèces, nous avons toujours opéré après un temps de conservation *in vitro* assez long sauf pour l'*A. sarcoides* 210. Au cours de l'essai n° 1 où toutes les souches avaient un âge comparable, nous avons vu cependant que seul le *F. annosus* manifeste un certain pouvoir lignivore (-5.10^{-2} p. 100 j) contrairement aux autres souches de telle sorte que l'on peut maintenir l'opinion que par rapport au *F. annosus*, les autres espèces sont peu ou pas lignivores. Pour l'*A. sarcoides*, cette opinion est renforcée par le résultat de l'essai n° 5 qui révèle son caractère non lignivore deux mois seulement après l'isolement.

Nous discuterons successivement du comportement de chaque espèce étudiée vis-à-vis du bois et du *F. annosus*.

N. fuckeliana var. *fuckeliana*

L'antagonisme de cette espèce vis-à-vis du *F. annosus* sur milieu gélosé a été signalé avant nous par Henriksen *et al.* (1953), Shain (1971) et probablement aussi par Ricard (1970) (*Cephalosporium* sp.). Le pouvoir lignivore quant à lui n'a jamais été étudié, Roll-Hansen (1962) remarque seulement qu'en nature, cette espèce provoque très peu ou pas de changement à la qualité du bois d'épicéa, ce qui est en accord avec nos résultats *in vitro* et nos observations *in situ* (Delatour, 1976). Les interactions dans le bois n'ont pas été étudiées antérieurement mais nos résultats montrent, contrairement aux résultats sur milieu gélosé, la supériorité du *F. annosus* qu'il soit ou non premier occupant et son activité lignivore non seulement n'est pas affectée mais pourrait être stimulée par l'occupation préalable du *N. fuckeliana*. Le caractère pionnier du *N. fuckeliana* dans les troncs d'épicéa tel que nous l'avons envisagé en 1976 aboutirait donc à favoriser l'action ultérieure du *F. annosus* ou au moins, ne la freinerait pas, si le comportement observé *in vitro* se reproduit effectivement *in situ*.

Phialophora sp.

Malgré son identité non encore précisée, cette espèce n'a probablement pas été étudiée antérieurement du point de vue qui nous préoccupe (Delatour, 1976). Son pouvoir lignivore est généralement nul. Non antagoniste du *F. annosus* sur milieu gélosé, il ne freine pas la colonisation du bois par celui-ci s'il y est implanté avant mais peut coloniser, dans une certaine mesure, le bois déjà envahi par le *F. annosus*. Dans ce dernier cas, l'activité lignivore du *F. annosus* se développe normalement alors que dans le cas précédent, elle est nulle malgré un bon envahissement. Ce résultat ne manque pas de surprendre et plusieurs hypothèses peuvent être avancées. Il est possible que le *F. annosus* comme deuxième occupant colonise des sites bien répartis dans l'ensemble du bois mais de faible volume, de telle sorte que son activité lignivore demeure imperceptible. D'autres hypothèses seraient d'ordre enzymatique,

Le *Phialophora* sp. pourrait bloquer des précurseurs des cellulases ou ligninases du *F. annosus*, il pourrait également rendre inopérantes ces enzymes notamment par modification du pH. Il est clair que des études complémentaires seraient nécessaires pour élucider le mécanisme.

Quoi qu'il en soit, compte tenu du caractère pionnier du *Phialophora* sp. dans les troncs d'épicéa (Delatour, 1976), les résultats rapportés ici permettent d'envisager l'effet au moins retardateur de cette espèce contre l'action du *F. annosus*.

A. sarcoides

Le pouvoir lignivore de cette espèce a donné lieu à des recherches depuis de nombreuses années. Etheridge (1956-1957) n'a pas obtenu de pertes notables chez le bois de divers épicéas canadiens (max. — $1,1 \cdot 10^{-2}$ p. 100 j), nous avons nous-même déjà signalé un fait analogue chez *Picea abies* (L.) Karst (Delatour *et al.*, 1976). Chez *Pinus contorta* Dougl., des pertes négligeables (— $0,6 \cdot 10^{-2}$ p. 100 j) sont signalées par Bouchier (1961) et Whittaker (1962) ; chez *P. banksiana* Lamb. une perte maximum de — $2,1 \cdot 10^{-2}$ p. 100 j a été obtenue par Basham (1966). Basé sur ces faits, le caractère non lignivore de l'*A. sarcoides* semble bien établi expérimentalement même si sa situation dans les arbres vivants peut faire penser à un lignivore (Delatour, 1976).

Une substance toxique vis-à-vis du *F. annosus* a été décelée par Ricard (1970) en culture liquide. Contre d'autres lignivores, un certain antagonisme a souvent été observé bien qu'il évolue le plus souvent au détriment de l'*A. sarcoides* (Etheridge, 1957 ; Bouchier, 1961 ; Whittaker, 1962 ; Soloviev, 1967).

Chez l'épicéa, nos résultats ont montré que, installé dans le bois, l'*A. sarcoides* freine l'implantation ultérieure du *F. annosus* et surtout l'empêche d'y provoquer des pertes de masse importantes ; un phénomène analogue a été observé par Etheridge (1957) contre *Coniophora puteana* (Schum.) Karst. et *Polyporus tomentosus* Fr. Chez le bois d'autres résineux, des résultats allant dans le même sens avec d'autres lignivores ont été obtenus par Bouchier (1961), Whittaker (1962), Basham (1966). Ce dernier auteur cependant enregistre chez le bois de *P. banksiana* Lamb. une légère stimulation de l'altération par *Trametes pini* (Thore) Fr. lorsqu'il agit à la suite de l'*A. sarcoides*. Nous avons noté une telle stimulation mais seulement dans le cas où l'*A. sarcoides* est tué avant la colonisation du *F. annosus*.

Comme envahisseur secondaire, l'*A. sarcoides* est capable de s'implanter dans une certaine mesure dans le bois à la suite du *F. annosus* l'éliminant quelque peu mais sans affecter généralement son activité lignivore ; dans un cas seulement (essai 4), le *F. annosus* et son activité sont affectés de façon importante par la colonisation secondaire de l'*A. sarcoides*.

En complément des observations effectuées en nature (Delatour, 1976), nos résultats *in vitro* permettent de penser que dans les troncs d'épicéa sur pied, la colonisation primaire du bois par l'*A. sarcoides* non seulement n'aboutit pas à son altération par ce champignon mais encore rendrait difficile sa colonisation ultérieure par le *F. annosus*. L'aptitude à la colonisation secondaire est également en accord avec nos observations *in situ* mais la possibilité d'élimination par l'*A. sarcoides* du *F. annosus* déjà installé demeure incertaine.

Les *Scytalidium*

Nos résultats montrent la non-agressivité de ce groupe de champignons vis-à-vis du bois d'épicéa comme d'autres auteurs l'ont montré pour des résineux également. Hulme *et al.* (1972) pour *Pinus resinosa* Ait. avec *S. lignicola* Pesante ($-1,1 \cdot 10^{-2}$ p. 100 j), Klingström *et al.* (1973) pour *Picea abies* (L.) Karsten avec dix souches de *S. lignicola*, *S. album* Klingström et Beyer, *S. aurantiacum* Klingström et Beyer ($-2 \cdot 10^{-2}$ p. 100 j). Des pertes importantes peuvent cependant être enregistrées chez des feuillus : $-19,7 \cdot 10^{-2}$ p. 100 j chez *Populus tremula* L. par *S. lignicola* (Nilsson, 1973).

Sur milieu nutritif artificiel, Klingström *et al.* (1965), Ricard *et al.* (1965) ont décelé l'activité antagoniste de divers *Scytalidium* spp. contre le *F. annosus*. Klingström *et al.* (1973) ont mis en évidence, comme nous l'avons observé nous-même (Delatour, 1976), deux types de comportement, l'un étant inhibition à distance, l'autre un envahissement du *F. annosus*. L'action à distance s'effectue grâce à l'élaboration d'une substance hydrosoluble (la Scytalidine) isolée et étudiée par Strunz *et al.* (1972) et Stillwell *et al.* (1973).

Les résultats obtenus *in vitro* se confirment dans le bois auquel les *Scytalidium* étudiés assurent une protection efficace contre le *F. annosus*. Des résultats semblables ont été obtenus contre *F. annosus*, *Poria vaporaria* Fr., *Lentinus lepideus* Fr., *Coniophora puteana* (Schum.) Karst. grâce au *S. album* dans le bois de *Picea abies* (Klingström *et al.*, 1965, Klingström *et al.*, 1973), contre *Peniophora* sp. grâce au *S. lignicola* dans le bois de *Pinus resinosa* Ait. (Hulme *et al.*, 1972). De plus, nos résultats montrent que les deux types de *Scytalidium* sont capables d'éliminer le *F. annosus* dans le bois déjà colonisé, ce qui aboutit à l'annulation de son activité lignivore.

Nous savons qu'en fait dans les troncs d'épicéa, les *Scytalidium* sont des colonisateurs secondaires que l'on rencontre généralement dans des zones de bois altéré desquelles le *F. annosus* est absent (Delatour, 1976). Les résultats rapportés ici sont donc en accord avec ces observations. De plus, si les *Scytalidium* succédaient au *F. annosus* assez rapidement, ne pourraient-ils pas l'éliminer jusqu'à son front de progression ?

Conclusion

L'observation de la microflore interne des troncs de l'épicéa commun (Delatour, 1976) nous avait amené à formuler un certain nombre de conclusions ou d'hypothèses dont certaines sont confirmées ou éclairées par les études rapportées ici.

Le caractère lignivore du *F. annosus* s'exprime de façon très nette dans nos tests d'altération mais nous avons décelé des variations possibles de ce caractère.

Pour l'*A. sarcoïdes*, nous évoquons la possibilité d'un comportement lignivore chez l'épicéa, hypothèse maintenant très improbable au vu de nos résultats. Nous notions également que ses relations avec le *F. annosus* n'entraient pas dans le cadre d'une succession car les deux espèces occupent généralement des territoires distincts. En fait, nous savons maintenant que si les deux espèces entrent en concurrence dans un même site, l'avantage demeure très généralement au premier occupant et la séparation territoriale dans les troncs pourrait résulter de ce phénomène. Nous avons vu cependant que nous ne pouvons pas exclure l'hypothèse de l'élimi-

nation du *F. annosus* par l'*A. sarcoides*, hypothèse déjà évoquée antérieurement (Delatour, 1976).

Le *N. fuckeliana* var. *fuckeliana* et le *Phialophora* sp. *in situ* sont tous deux localisés dans des zones de bois sain en avant du *F. annosus* et nous avons confirmé expérimentalement leur caractère non lignivore. De plus, nous avons montré que leurs relations avec le *F. annosus* peuvent entrer dans le cadre d'une succession mais que le *N. fuckeliana* var. *fuckeliana* semblerait pouvoir favoriser le développement du lignivore alors qu'au contraire le *Phialophora* sp. semble pouvoir retarder son action.

Enfin, les *Scytalidium* qui figurent parmi les successeurs du *F. annosus* dans les troncs montrent une aptitude très grande à l'éliminer des tissus attaqués, liée à un caractère non lignivore.

Reçu pour publication en février 1978.

Summary

Internal microflora of the wood tissues of the standing Norway spruce.

II. — *In vitro* studies of the natural microflora

In a previous paper (Delatour, 1976) an inventory was given of the stem microflora in standing Norway spruces; authors have studied here the *in vitro* behaviour of the microflora main species: *Fomes annosus*, *Phialophora* sp., *Nectria fuckeliana* var. *fuckeliana*, *Ascocoryne sarcoides* and three strains of *Scytalidium* sp. The decay capacity of each strain was studied on spruce wood. Relationships between these strains and *F. annosus* were studied on malt agar and in wood.

Results:

Amongst the studied species only *F. annosus* is able to cause important weight losses (up to $36.4 \cdot 10^{-2}$ p. 100 per day); the other species must be considered harmless. Regarding the two species considered previously as pioneer, *N. fuckeliana* proves unable to check the action of *F. annosus* in wood, whereas *Phialophora* sp. is able to delay it to some extent. When *A. sarcoides* is the first invader, it prevents largely the settling of *F. annosus* and seems to be able to exclude it from sites already colonised. The non pioneer species *Scytalidium* sp. have a strongly depressive effect on *F. annosus* and are able to eliminate it completely from wood in which it has settled.

Références bibliographiques

- ANONYME, 1961. Méthodes d'essais des produits fongicides pour la protection des bois des régions boréales utilisés dans ces mêmes régions. Paris, Afnor N FX 41-502.
- BASHAM J. T., 1966. Heart rot of Jack pine in Ontario II. Laboratory studies on the pathogenicity and interrelationships of the principal heartwood inhabiting fungi. *Canad. J. Botany*, **44**, 849-860.
- BOURCHIER R. J., 1961. Laboratory studies on microfungi isolated from the stems of living lodgepolepine, *Pinus contorta* Dougl., *Canad. J. Botany*, **39**, 1373-1385.
- COBB F. W., WILCOX W. W., 1967. Comparison of susceptibility of *Abies concolor* and *Pinus ponderosa* wood to decay by *Fomes annosus*. *Phytopathology*, **57**, 12, 1312-1314.
- COURTOIS H., 1973. Zur Variabilität der parasitären Leistungsfähigkeit des *Fomes annosus*, des wichtigsten Rotfäulerregers der Fichte. *Allg. Forst. -u. J. Ztg*, **144**, 2, 32-35.
- DELATOUR C., 1975. Comportement *in vitro* du *Sparassis crispa* Wulf. ex Fr. et du *Sparassis laminosa* Fr. *Europ. J. For. Pathol.*, **5**, 240-247.
- DELATOUR C., 1976. Microflore interne des tissus ligneux de l'épicéa commun sur pied. I. Inventaire de la microflore naturelle. *Ann. Sci. forest.*, **33**, 4, 199-219.
- DELATOUR C., SYLVESTRE Gilberte, 1976. L'*Ascocoryne sarcoides* chez *Picea abies*. *Comm. XVI^e Congrès Mondial IUFRO Oslo*, 3 p.
- ETHERIDGE D. E., 1956. Occurrence of *Coryne sarcoides* with heartrot fungi on spruce in Alberta, Canada. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, **39**, 3, 385-386.
- ETHERIDGE D. E., 1957. Comparative studies of *Coryne sarcoides* and two species of wood-destroying fungi. *Canad. J. Botany*, **35**, 595-603.

- HENRIKSEN H. A., JORGENSEN E., 1953. Rodfordaerverangreb i relation til udhugningsgrad. *Forstl. Forsogsv. Danm.*, **21**, 215-251.
- HULME M. A., SHIELDS J. K., 1972. Interaction between fungi in wood blocks *Canad. J. Botany*, **50**, 6, 1421-1427.
- HYPPEL A., 1963. The influence of temperature on the antagonistic effect of *Trichoderma viride* Fr. on *Fomes annosus* (Fr.) Cke. *Studia Forestalia Suecica* **4**, 13 p.
- KAARIK A., RENNERFELT E., 1957. Investigations on the fungal flora of spruce and pine stumps. *Medd. Fran. Stan. Skog. for. Inst.*, **47**, 7, 88 p.
- KLINGSTRÖM A., BEYER L., 1965. Two new species of *Scytalidium* with antagonistic properties to *Fomes annosus* (Fr.) Cke. *Sv. Bot. Tidskr.*, **59**, 1, 30-36.
- KLINGSTRÖM A. E., JOHANSSON S. M., 1973. Antagonism of *Scytalidium* isolates against decay fungi. *Phytopathology*, **63**, 4, 473-479.
- KUHLMAN E. G., HENDRIX F. F., 1962. A selective medium for isolation of *Fomes annosus*. *Phytopathology*, **52**, 1310-1312.
- NILSSON T., 1973. Studies on wood degradation and cellulolytic activity in microfungi. *Studia forestalia suecica* **104**, 40 p.
- PEEK R. D., LIESE W., 1976. Schadwirkung von *Fomes annosus* im Stammholz der Fichte. *Forstwiss. Forschung.*, **36**, 39-46.
- PERRIN R., SYLVESTRE Gilberte, 1975. Etude comparative *in vitro* de l'aptitude lignivore de quelques basidiomycètes agents de pourritures de cœur chez l'épicéa. *Europ. J. For. Pathol.* **5**, 6, 344-348.
- RAPILLY F., 1968. Les techniques de mycologie en pathologie végétale. *Annales des Epiphyties*, 19 N° H.S., 102 p.
- RICARD J. L., 1970. Biological control of *Fomes annosus* in Norway spruce (*Picea abies*) with immunizing commensals. *Studia forestalia suecica*, **84**, 50 p.
- RICARD J. L., WILSON M. M., BOLLEN W. B., 1969. Biological control of decay in Douglas-fir poles. *Forest. Prod. J.*, **19**, 41-45.
- ROLL-HANSEN F., 1962. *Nectria cucurbitula* sensu Wollenweber, its *Cephalosporium* state and some other *Cephalosporium* spp. from stems of conifers. *Meddelelser fra. Det norske Skogforsoksvesen*, **61**, 17, 293-312.
- SHAIN L., 1971. The response of sapwood of Norway spruce to infection by *Fomes annosus*. *Phytopathology*, **61**, 301-307.
- SOLOVIEV V. A., 1967. Recherche des antagonistes du *Phellinus tremulae* Bond. et Bariss. (en russe). *Mikol. Fitopatol.* (Akad. nauk. SSSR) Leningrad **1**, 2, 179-182.
- STILLWELL M. A., WALL R. E., STRUNZ G. M., 1973. Production, isolation and antifungal activity of *Scytalidin* a metabolic of *Scytalidium* sp. *Canad. J. Microbiol.*, **19**, 597-602.
- STRUNZ G. M., KAKUSHIMO M., STILLWELL M. A., 1972. *Scytalidin* : a new fungitoxic metabolite produced by *Scytalidium* sp. *J. Chem. Soc.*, **18**, 2280-2283.
- WHITTAKER Elizabeth L., 1962. The interaction of *Coryne sarcoides* and fungi associated with red heart in lodgepolepine. *Canad. J. Botany*, **40**, 255-256.
-