

Article de recherche

Observations symptomatologiques et rôles possibles d'*Ophiostoma minus* Hedgc. (ascomycète : Ophiostomatales) et de *Tomicus piniperda* L. (Coleoptera : Scolytidae) dans le dépérissement du pin sylvestre en forêt d'Orléans

D. Piou¹, F. Lieutier² avec la collaboration technique de A. Yart²

¹ ENITEF, Domaine des Barres, 45290 Nogent-sur-Vernisson, France;

² INRA, Station de zoologie forestière, Ardon, 45160 Olivet, France

(reçu le 8-4-1988; accepté le 20-7-1988)

Résumé – Le dépérissement du pin sylvestre en forêt d'Orléans (France) se caractérise par une chute d'écorce, l'existence de granulations noirâtres en surface de l'aubier et un bleuissement en profondeur de celui-ci. Le jaunissement du feuillage est généralement postérieur à la chute d'écorce, mais peut parfois la précéder. Les arbres en situation difficile paraissent préférentiellement atteints, mais de nombreux arbres dominants le sont également. Deux champignons à potentialités pathogènes ont été isolés des arbres malades : *Ophiostoma minus* (Hedgc.) Syd. et Syd. et *Leptographium wingfieldii* Morelet. Les relations entre *O. minus* et le dépérissement ont conduit à formuler l'hypothèse que ce champignon pouvait avoir un rôle dans la maladie, bien que l'on n'ait pu en reconstituer les symptômes par inoculations artificielles localisées. *Tomicus piniperda* joue très vraisemblablement un rôle dans la dissémination de *O. minus* d'une parcelle forestière à l'autre. L'association entre les 2 organismes apparaît cependant fortuite et l'on ignore le rôle de *T. piniperda* dans l'inoculation de *O. minus* aux arbres sains. Une étude des symptômes précoces et des premières phases du dépérissement s'avère nécessaire.

***Ophiostoma minus* – *Leptographium wingfieldii* – *Tomicus piniperda* – *Pinus sylvestris* – dépérissement – bleuissement – dissémination**

Summary – Symptomatological observations and possible roles of *Ophiostoma minus* Hedgc. (ascomycetes : Ophiostomatales) and *Tomicus Piniperda* L. (Coleoptera : Scolytidae) in the dieback of Scots pine in the Orleans Forest (France). The dieback of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in the Orleans Forest (France) are characterized by the fall of the bark, the presence of black granulations on the sapwood surface and with a bluestain inside. The foliage generally turns yellow after the bark has fallen, but sometimes before. The trees located in poor sites seem to be preferentially stuck, but many dominant trees also. Two potentially pathogenic fungi were isolated from the dying trees : *Ophiostoma minus* (Hedgc.) Syd. et Syd. and *Leptogra-*

phium wingfieldii Morelet. The relationships between *O. minus* and the dieback lead to hypothesize that this fungus may have a role in the disease, in spite of the failure to reproduce the symptoms by artificial localized inoculations. *Tomicus piniperda* seems to play a positive role in the dissemination of *O. minus* from one plot to another in the forest. Nevertheless, the relationships between these 2 organisms seems to be fortuitous and the role of the beetle in introducing the fungus in the healthy trees is unknown. A study of the early symptoms and of the first stages of disease is necessary.

***Ophiostoma minus* – *Leptographium wingfieldii* – *Tomicus piniperda* – *Pinus sylvestris* – dieback – blue stain – dissemination**

Introduction

Depuis 1972, on assiste au développement d'un dépérissement assez curieux dans les peuplements de pin sylvestre (*Pinus sylvestris* L.) de la forêt d'Orléans et plus particulièrement du massif de Lorris. La première publication sur ce sujet a souligné le rôle important que paraissaient jouer à cette époque les attaques des scolytes *Tomicus piniperda* L. et *Ips sexdentatus* Boern., qui faisaient suite à celles de la tenthrède défoliatrice *Diprion pini* L. Il était signalé toutefois qu'à côté des arbres attaqués par les scolytes, un certain nombre d'autres individus mouraient sans que l'on puisse y observer, sinon très peu, de traces d'attaques dues à ces insectes. Les arbres dépérissants sans scolytes représentaient néanmoins une minorité, bien que sur certaines parcelles ils fussent très nombreux (Lieutier *et al.*, 1984). Au fil des ans et surtout ces 3 dernières années, il est apparu cependant évident que ce nouveau type de dépérissement prenait de plus en plus d'importance, au point que ce sont maintenant les arbres «scolytés» qui semblent représenter la minorité. Ainsi, si le nombre total d'arbres dépérissants a sans doute sensiblement diminué en forêt d'Orléans, grâce surtout aux coupes sanitaires effectuées par l'Office National des Forêts en forêt domaniale, le dépérissement ne semble en fait pas évoluer vers sa disparition puisqu'il y a eu apparemment glissement d'un phénomène connu (les attaques de scolytes) vers un autre paraissant

complètement différent. Les arbres présentent des chutes d'écorce importantes, alors que le feuillage est souvent encore vert, et le tronc mis à nu apparaît noirâtre.

Des études effectuées dans un autre but avaient montré en 1986 qu'il était possible, à partir des adultes de *T. piniperda* en cours d'attaques, d'isoler un champignon dont l'identification était alors incertaine mais qui paraissait très proche de *Ophiostoma minus* Hedgc. sur un plan systématique. Le pourcentage de contamination du scolyte variait beaucoup d'une parcelle à l'autre et semblait lié à la présence du dépérissement dans la parcelle (Lieutier *et al.*, 1988), suggérant ainsi un lien possible entre l'*Ophiostoma* considéré et l'existence de la maladie.

Nous présentons ici quelques observations symptomatologiques complémentaires ainsi que les résultats préliminaires de nos recherches sur les agents en cause et leurs possibilités de dissémination.

Matériels et Méthodes

Observations symptomatologiques

Une enquête d'observation extensive a d'abord été effectuée en automne 1986 et en hiver 1987 en forêt d'Orléans sur l'ensemble du massif de Lorris, dans des peuplements de différentes essences, afin de décrire le dépérissement avec précision (état du feuillage et du tronc, sondage de l'aubier à la tarière). Après

cette enquête, une typologie simplifiée indiquant l'ampleur du dépérissement a été utilisée pour la suite de notre étude : type 0 : pas de mortalité ni de dépérissement dans le peuplement ; type 1 : mortalité diffuse dans le peuplement, quelques arbres par parcelle sont atteints; type 2 : mortalité se développant en petites taches affectant 3 à 10 arbres, 2 à 3 taches se développant par parcelle; type 3 : mortalité importante, supérieure à 30%, généralisée sur des surfaces de quelques ares.

Quinze placettes d'observation et d'inventaire, contenant chacune 15 pins sylvestres choisis au hasard parmi des dominants et codominants de plus de 80 ans, ont alors été délimitées dans les zones de dépérissement de type 2 ou 3, sur tout le massif de Lorris. A la fin de l'hiver, le diamètre de chaque arbre de ces placettes a été mesuré et la densité du houppier appréciée par une notation de 0% (absence d'aiguille) à 100% (houppier très dense ne permettant pas la vision du ciel). Pour les arbres dépérissants, on a noté en outre la présence et l'intensité des attaques de *T. piniperda* au niveau du fût selon le barème suivant : 0 = absence d'attaque; 1 = 1 à 5 galeries maternelles par arbre; 2 = quelques galeries maternelles dispersées sur le tronc; 3 = arbre complètement colonisé par *T. piniperda*.

Recherche de champignons associés au dépérissement

Dix parcelles de pin sylvestre correspondant à des dépérissements d'ampleur variée et à divers types de peuplements ont été choisies soit dans le massif de Lorris en forêt domaniale (9 d'entre elles) soit en forêt privée (1 parcelle à Guilly, à une dizaine de kilomètres au sud du massif de Lorris). Les caractéristiques de ces parcelles figurent au Tableau I. Sur chacune d'entre elles, 3 arbres dépérissants (2 seulement pour la parcelle 111) et 2 arbres sans signe de dépérissement (témoins) ont été choisis au hasard, tous dominants. Sur chacun des arbres dépérissants, 2 prélèvements d'aubier, si possible dans des zones colorées en bleu, l'un à 1,30 m, l'autre sur une racine à environ 50 cm du collet, ont été réalisés en janvier. Sur les arbres sans symptôme, un prélèvement d'aubier a eu lieu au niveau du collet, en février sur 1 des 2 arbres de chaque parcelle, en mai sur l'autre arbre témoin. Les prélèvements ont été effectués à la tarière de Pressler, selon une technique inspirée de celle mise au point par Vigouroux (1979). Avant chaque prélèvement, la zone de bois entourant le point choisi a été dégagée au couteau : celui-ci ainsi que le corps et l'extracteur de la tarière avaient été nettoyés à l'alcool à 90° puis passés à la flam-

Tableau I. Caractéristiques des peuplements et du dépérissement dans les parcelles choisies pour les isolements.

N° parcelle	Espèce	Age	Végétation herbacée principale	Notation du dépérissement dans un rayon de	
				50 m (a)	250 m (a)
111	Pin sylvestre	> 90 ans	Fougère dominante	1	1
437	Pin sylvestre	> 90 ans	Molinie en tourradon	2	2
378	Pin sylvestre	> 90 ans	Fougère dominante	1	1
342	Pin sylvestre	> 90 ans	Fougère et callune	2	2
381	Pin sylvestre	> 90 ans	Fougère et molinie	3	2
140	Pin sylvestre	≈ 40 ans	Fougère dominante	2	1
293	Pin sylvestre	> 90 ans	Molinie en tourradon	3	2
291	Pin sylvestre	> 90 ans	Molinie en tourradon	3	3
474	Pin sylvestre	> 90 ans	Molinie en tourradon	3	3
Guilly	Pin sylvestre	≈ 30 ans	Ronce dominante	3	1
159	Pin laricio	15 ans	Fougère et callune	1	1
Boismorand	Pin laricio	30 ans	Ronce dominante	1	1

(a) Note 1 : mortalité diffuse dans le rayon considéré (1 à 5 arbres sont atteints); note 2 : mortalité se manifestant en petites taches affectant 3 à 10 arbres (2 à 3 taches se développent dans le rayon considéré); note 3 : mortalité importante, supérieure à 30% sur des surfaces de quelques ares.

me. Dès leur extraction, les carottes ont été également passées à la flamme puis placées dans un étui stérile. Au laboratoire, elles ont été découpées stérilement en rondelles, et celles-ci ont été déposées sur milieu de culture malt-agar en boîte de Pétri (10 rondelles réparties sur 2 boîtes), puis mises en étuve à 25°C. Après lecture, la présence d'un champignon a été considérée comme réelle quand celui-ci apparaissait dans au moins une des 2 boîtes.

Des prélèvements ont également été effectués dans 2 parcelles de pin laricio (*Pinus nigra* Arn. ssp. *laricio* Poiret) sur certains arbres présentant des symptômes de dépérissement semblables à ceux du pin sylvestre. L'une de ces parcelles (n° 159) était située dans le massif de Lorris, où 2 arbres dépérissants ont été examinés, l'autre en forêt privée (commune de Boismorand-45) où 3 arbres ont été examinés. Les caractéristiques de ces parcelles figurent aussi au Tableau I.

En outre, pour chaque pin sylvestre dépérissant retenu dans cette étude, les granulations noirâtres localisées sous l'écorce et associées au bleuissement ont été isolées et mises également en culture.

Inoculations artificielles de O. minus

Afin de tenter de reconstituer les symptômes du dépérissement, nous avons procédé à des inoculations artificielles de *O. minus* sur des pins sylvestres ne présentant aucun symptôme de dépérissement.

Seize pins sylvestres d'une quarantaine d'années ont été répartis en 2 classes correspondant à 2 niveaux différents de productivité, après calcul d'un indice de productivité des 5 dernières années selon la méthode de Waring *et al.* (1980). La classe A renfermait les arbres dont l'indice, mesuré durant l'hiver, était compris entre 0,108 et 0,165 (circonférence : 51-78 cm), la classe B ceux dont l'indice était compris entre 0,222 et 0,292 (circonférence : 50-78 cm). En juin, chacun de ces 16 arbres a été inoculé par des pastilles de 5 mm de diamètre d'une culture sporulée de *O. minus* âgée de 3 semaines. La technique d'inoculation était inspirée de celle de Wright (1933). Après réalisation à l'emporte-pièce stérile d'un trou de 5 mm de diamètre jusqu'au niveau du cambium, la pastille de culture était introduite dans l'arbre, la face portant la culture étant mise en contact avec l'aubier. Le trou était alors rebouché avec le morceau d'écorce précédemment enlevé par l'emporte-pièce. Deux arbres A et 2 arbres B ont reçu 1 couronne d'inoculation. Trois arbres

A et 3 arbres B ont reçu 3 couronnes d'inoculation chacun. Les 3 arbres A et les 3 arbres B restants ont reçu 6 couronnes d'inoculation chacun. Chaque couronne était séparée verticalement de sa voisine d'une trentaine de centimètres, le milieu de la zone inoculée se situant à environ 1,30 m du sol. Sur une même couronne, les inoculations étaient régulièrement réparties tous les 4 cm. Les arbres ont été ensuite examinés tous les 3 mois pendant 18 mois, pour leurs symptômes externes. Après 18 mois, 2 arbres A correspondant aux densités d'inoculation les plus élevées ont été écorcés, abattus et débités pour examen interne.

Isolements à partir de T. piniperda

Sur chacune des parcelles de pin sylvestre précédemment retenues pour la recherche des champignons associés au dépérissement, l'arbre témoin prélevé en février a été abattu le même jour pour servir d'arbre-piège lors de l'essaimage de *T. piniperda*. Une onzième parcelle, non dépérissante et localisée à Saint-Cyr-en-Val (45) à 40 km environ de la zone dépérissante du massif de Lorris, a été ajoutée à ce dispositif; des grumes de pin sylvestre fraîchement entreposées y faisaient office d'arbre-piège.

Peu après l'attaque des arbres (début mars), 50 galeries fraîches ont été prélevées stérilement sur chaque arbre (sauf pour la parcelle 474 exploitée entre-temps) et pour les parcelles 291, 342 et Guilly (pour lesquelles les attaques avaient été peu importantes et où le nombre de prélèvements a été inférieur à 50). Les insectes présents (le couple, ou la femelle seule lorsque le mâle n'était pas encore arrivé) ont été également récoltés stérilement. L'ensemble «galerie + insectes associés» a constitué l'unité de prélèvement, ce qui se justifiait puisque toutes les composantes de cette unité étaient déjà en contact constant entre elles avant d'être prélevées. Trois à 6 fragments de phloème par arbre ont été aussi prélevés entre les galeries forées par les insectes, afin de vérifier que l'arbre n'était pas contaminé au préalable. Au laboratoire, chaque fragment de phloème ou de galerie a été découpé en morceaux qui ont été déposés sur un milieu de culture malt-agar et laissés en étuve à 25°C. Les insectes vivants ont été placés individuellement sur malt-agar et laissés libres de leurs mouvements dans la boîte de Pétri pendant 30 min; ces déplacements s'accompagnaient toujours de chutes sur le dos. Après lecture des cultures, la présence d'un champignon était considérée comme effective dans un prélèvement si ce champignon apparaissait sur l'un au moins des 3 ensemen-

cements (insecte mâle, insecte femelle ou gale-rie), d'une même unité de prélèvement.

Les arbres-pièges ont été examinés à nouveau fin mai, en fin d'évolution des populations de *T. piniperda* et certains d'entre eux débités, afin de noter la présence éventuelle et l'extension de zones de bleuissement en surface et en profondeur de l'aubier; des prélèvements ont alors été faits dans ces zones et mis en culture.

Par ailleurs, en mars, dans une parcelle (n° 488) supportant un dépérissement important et dans laquelle la présence de *O. minus*, *L. wingfieldii* et *Hormonema dematioides* avait été mise en évidence (Lieutier *et al.*, 1988), trois arbres sans symptôme et situés à proximité d'un des arbres dépérissants ont reçu chacun 40 trous de 3 mm de diamètre à la microperceuse, jusqu'au niveau du cambium. Vingt trous étaient situés face à l'arbre dépérissant le plus proche, 20 à l'opposé, à environ 1,30 m du sol. Ces arbres ont été laissés sur pied pour éviter leur attaque par les insectes. En novembre, les zones ayant reçu les trous ont été écorcées et des prélèvements de phloème ont été effectués au niveau de chaque trou, afin de permettre l'isolement d'éventuels champignons sur milieu malt-agar.

Tests statistiques

Les moyennes et les pourcentages sont accompagnés de leur intervalle de confiance au seuil de 95%. Les comparaisons entre moyennes ou entre pourcentages ont été effectuées à ce même seuil par test *t*, celles entre distributions par test χ^2 .

Résultats

Observations symptomatologiques

Description

Les résultats de l'enquête extensive effectuée en 1986-1987 et ceux des 15 placettes d'inventaire nous permettent de rapporter les observations suivantes.

Le dépérissement se manifestait en général par une perte d'écorce sur le tronc, affectant des surfaces variant de

quelques dm² à plusieurs m², le tronc pouvant apparaître même parfois totalement écorcé. Cette perte d'écorce apparaissait surtout à la fin de l'été, mais pouvait également apparaître sur certains arbres à la fin de l'hiver. Dans tous les cas, un bleuissement important du bois en surface accompagnait cette perte d'écorce et l'on observait la présence de nombreuses granulations noirâtres. En profondeur, le bleuissement pouvait avoir atteint la quasi-totalité de l'aubier, des racines aux premières branches basses. Le houppier des arbres atteints restait vert jusqu'à la mi-avril et jaunissait brutalement ensuite. Certains arbres jaunissaient brutalement à la même période sans perte d'écorce; l'examen de leur tronc permettait cependant de constater que l'écorce n'était toutefois pas adhérente et que le bois sous-jacent était bleu. Le bleuissement apparaît donc comme une constante du dépérissement.

Les dépérissements les plus importants semblent se situer dans les milieux les plus hydromorphes (par exemple parcelles 291, 293 et 474), avec toutefois quelques exceptions comme la parcelle «Guilly» (Tableau I). Le dépérissement affecte essentiellement les peuplements âgés de pin sylvestre, mais existe aussi dans les peuplements de 30 ou 40 ans de cette essence. Nous l'avons en outre noté dans quelques peuplements de pin laricio de 8-10 ans et de 35 ans. Chez le pin laricio, les symptômes sont analogues à ceux du pin sylvestre; la perte d'écorce semble cependant moins spectaculaire et plus tardive, au moment de la chute des aiguilles. La mortalité paraît de type diffus.

Liaisons entre le diamètre de l'arbre, la mortalité et la densité du houppier

Nous rappelons que les 225 arbres pris en compte dans cette étude étaient répartis sur 15 placettes, avaient plus de 80 ans et

qu'ils appartaient donc à la catégorie d'âge la plus atteinte par le dépérissement, celui-ci pouvant être cependant plus ou moins intense selon les parcelles. La Figure 1 représente les taux de mortalité observés parmi ces arbres, pour différentes classes de diamètre. La mortalité apparaît plus élevée dans les classes de diamètre faible. Ainsi, le diamètre des

arbres morts est de $39,4 \pm 20$ cm alors qu'il est de $42,2 \pm 13$ cm pour les arbres sans symptômes (différence significative). Néanmoins, il ne semble pas y avoir de différences à ce point de vue en fonction de l'intensité du dépérissement (type 2 ou 3), les 2 types de distribution des mortalités par classe de diamètre ne différant pas significativement.

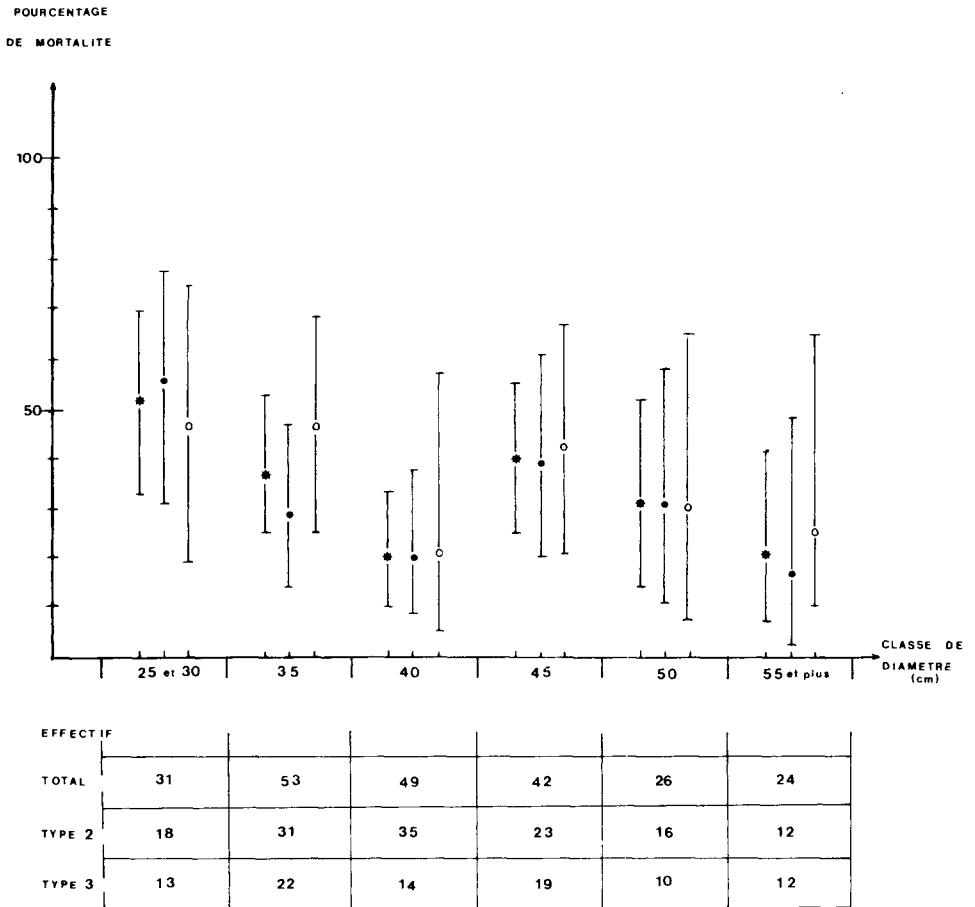


Fig. 1. Répartition de la mortalité du pin sylvestre par classe de diamètre, dans les peuplements de plus de 80 ans. Les traits verticaux symbolisent l'intervalle de confiance au seuil de 5%. * : effectif total ($\chi^2_{total} = 11,31 > \chi^2_{0,05(5)} = 11,07$); ● : dépérissement de type 2; ○ : dépérissement de type 3.

INDICE DE TRANSPARENCE

DU HOUPPIER

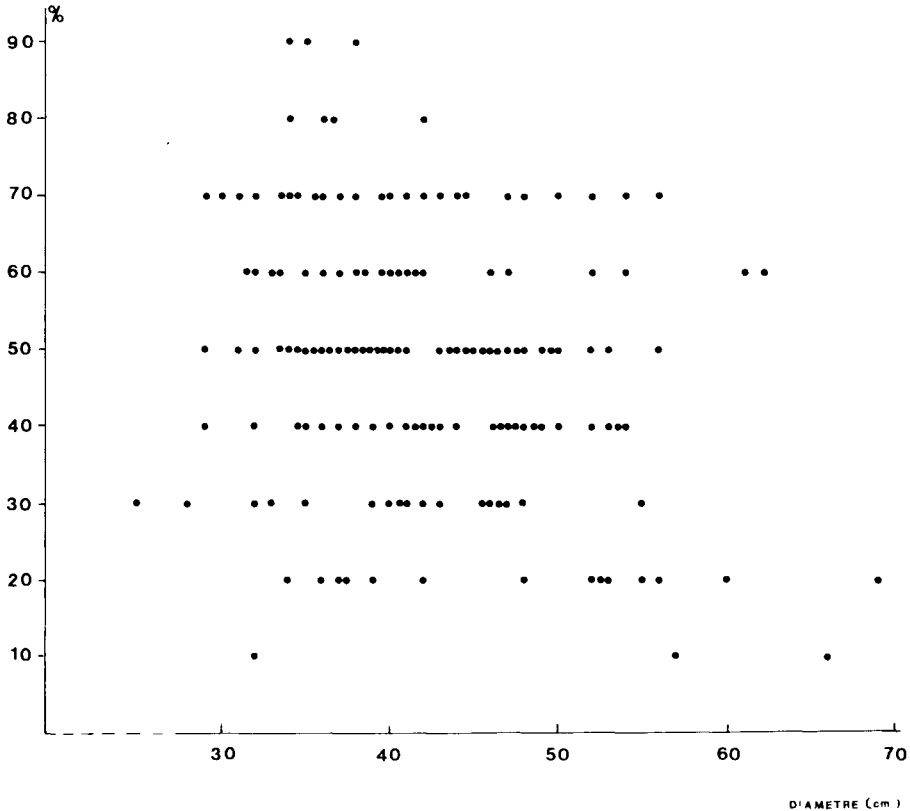


Fig. 2. Répartition de la densité des houppiers des arbres sains en fonction du diamètre à 1,30 m (chaque point représente un arbre).

A la période des observations, 19 seulement des 75 arbres morts portaient encore des aiguilles vertes et correspondaient donc à un dépérissement récent; la densité de leur houppier était faible mais présentait une grande variabilité (moyenne : 28%) puisqu'elle atteignait jusqu'à 60% pour 4 d'entre eux. Pour les arbres sans symptômes (Fig. 2), la densité du houppier n'apparaît pas avoir de liaison avec le diamètre.

Liaisons entre attaques de scolytes sur fût et mortalité

Sur les 75 arbres morts, 29 portaient des galeries de scolytes sur le fût; 8 (soit 11%) avec la note 1; 12 (soit 16%) avec la note 2 et 9 (soit 12%) avec la note 3. Il existe donc un pourcentage élevé d'arbres morts sans aucune trace d'attaques de scolytes, et il apparaît nettement que la colonisation totale du tronc par *T. piniperda* (note 3) est rare.

Tableau II. Isolements et attaques de scolytes sur arbres dépérissants. Isolements sur les témoins.

N° parcelle	N° arbre	Note attaque scolyte	Isolements obtenus		
			Collet	Tronc	Racine
111	1	2		<i>O. minus</i>	—
	2	0		<i>O. minus</i>	—
P. s.	témoin-piège abattu		—		
	2° témoin sur pied		—		
437	1	0		<i>O. minus</i>	<i>L. wingf.</i>
	2	1		<i>O. minus</i>	<i>L. wingf.</i>
	3	0		<i>O. minus, L. wingf.</i>	—
P. s.	témoin-piège abattu		—		
	2° témoin sur pied		—		
378	1	0		<i>O. minus</i>	—
	2	0		<i>O. minus</i>	—
	3	2		<i>O. minus</i>	—
P. s.	témoin-piège abattu		—		
	2° témoin sur pied		—		
342	1	0		<i>O. minus</i> (A)	—
	2	0		<i>O. minus</i> (A)	—
	3	2		<i>O. minus, L. wingf.</i> (A)	<i>O. minus</i>
P. s.	témoin-piège abattu		—		
	2° témoin sur pied		—		
381	1	0		<i>O. minus</i>	—
	2	2		<i>O. minus</i>	<i>O. minus, L. wingf.</i>
	3	3		<i>O. minus</i> (A)	—
P. s.	témoin-piège abattu		—		
	2° témoin sur pied		—		
140	1	2		<i>O. minus</i>	—
	2	3		<i>O. minus</i>	—
	3	1		<i>O. minus</i>	—
P. s.	témoin-piège abattu		<i>O. minus</i>		
	2° témoin sur pied		—		
293	1	0		<i>O. minus</i>	<i>L. wingf.</i>
	2	0		<i>O. minus</i>	<i>O. minus, L. wingf.</i>
	3	0		<i>O. minus, L. wingf.</i>	<i>O. minus</i>
P. s.	témoin-piège abattu		<i>O. minus</i>		
	2° témoin sur pied		—		
291	1	2		<i>O. minus</i>	<i>O. minus, L. wingf.</i>
	2	1		<i>O. minus</i>	<i>L. wingf.</i>
	3	0		<i>O. minus</i>	<i>L. wingf.</i>
P. s.	témoin-piège abattu		—		
	2° témoin sur pied		—		
474	1	2		<i>O. minus</i>	
	2	0		<i>O. minus</i>	<i>O. minus</i>
	3	0		<i>O. minus</i>	<i>L. wingf.</i>
P. s.	témoin-piège abattu		—		
	2° témoin sur pied		—		
Guilly	1	0		(A)	(A)
	2	0		<i>O. minus</i>	(A)
	3	0		<i>O. minus</i>	<i>L. wingf.</i>
P. s.	témoin-Piège abattu		—		
	2° témoin sur pied		—		
Boismorand	1	0		<i>O. minus</i>	
	2	0	<i>O. minus</i>	<i>L. wingf.</i>	
P. l.	3	0	<i>O. minus</i>	<i>O. minus</i>	
159	1	0	<i>O. minus</i>	<i>O. minus, L. wingf.</i>	
	P. l.	2	0	<i>O. minus</i>	

O. minus : *Ophiostoma minus*; *L. wingf.* : *Leptographium wingfieldii*; (A) : espèce indéterminée (mycélium stérile); P. s. : pin sylvestre; P. l. : pin laricio.

Champignons associés au dépérissement (Tableau II)

En plus de divers saprophytes, 3 espèces ont pu être isolées. *Ophiostoma minus* Hedgc., identifié de façon certaine après examen des périthèces et des ascospores, apparaît quasi systématiquement à partir des carottes prélevées dans les zones colorées en bleu de l'aubier du tronc (28 cas sur 29 pour le pin sylvestre, 5 cas sur 5 pour le pin laricio). Il apparaît dans 10 cas sur 29 au niveau des racines de pin sylvestre. *Leptographium wingfieldii* et un champignon indéterminé et dénommé A (ne se présentant en culture que sous forme de mycélium stérile) sont parfois isolés mais de façon irrégulière, bien que plus fréquemment au niveau des racines. Les granulations noirâtres localisées sous l'écorce et associées au bleuissement ont toujours fourni *O. minus* en culture. En boîte de Pétri, nous avons également observé la formation de granulations identiques sur des rondelles de bois bleui mises en culture et porteuses de *O. minus*.

Seuls 2 des arbres témoins testés en février ont permis l'isolement de *O. minus* au niveau de leur collet (parcelles 140 et 293); ils étaient situés en limite de taches actives de dépérissement.

Inoculations de O. minus

Aucun des 16 arbres inoculés n'a montré de symptômes de dépérissement après 18 mois. A l'écorçage, aucune trace de bleuissement n'a été notée, mais le phloème et la surface de l'aubier des 2 classes ont révélé l'existence de réactions de défense très importantes à l'introduction du champignon. Ces réactions, de couleur brune et totalement cicatrisées, mesuraient jusqu'à 15 cm suivant l'axe vertical et étaient parfois coalescentes avec leurs voisines, formant alors de larges plages de nécrose imprégnées de résine. D'importantes poches de résine accompagnaient fréquemment ces plages de réaction à l'interface phloème/aubier. Dans ces zones, aucune production de bois n'avait eu lieu en 18 mois. La section transversale des arbres au niveau des zones d'inoculation a également montré l'existence d'une réaction de défense cicatrisée, se manifestant par une imprégnation résinique des dernières années d'aubier, localisée aux zones réactionnelles déjà visibles en surface de celui-ci. Aucune trace de bleuissement n'a pu y être notée.

Isolements à partir des insectes et de leurs galeries (Tableau III)

A côté d'un certain nombre de champignons saprophytes, 4 espèces ont été iso-

Tableau III. Fréquence d'isolement (en %) des différentes espèces de champignons à partir d'arbres-pièges.

N° parcelle	N° d'insectes examinés	Ophiostoma minus	Leptographium wingfieldii	H. dematioides	Champignon B
111	50	2	6	30	2
437	50	14	4	60	0
378	50	6	1	58	6
342	20	10	0	30	2
381	50	12	2	72	4
140	50	8	0	30	1
293	50	16	0	28	2
Guilly	33	0	3	18	21
291	47	74	0	53	4
St-Cyr-en-Val	48	0	2	63	2

lées : *O. minus*, *L. wingfieldii*, *H. dematioides* et une espèce indéterminée (appelée B) ne se présentant que sous forme de mycélium stérile.

O. minus a pu être isolé dans 8 parcelles déperissantes sur 9 : sa fréquence d'isolement varie d'une parcelle à l'autre et semble en général plus élevée dans les parcelles situées dans une zone de déperissement important (Fig. 3). En outre, *O. minus* n'a pas été isolé de la parcelle non déperissante de Saint-Cyr-en-Val. *L. wingfieldii* est réparti de façon irrégulière selon les parcelles, mais toujours à une très faible fréquence d'isolement; il est présent dans la parcelle non déperissante de Saint-Cyr-en-Val. *H. dematioides* a été isolé avec une fréquence très élevée dans toutes les parcelles. Le champignon B a

été isolé dans 8 parcelles sur 10, y compris la parcelle de Saint-Cyr-en-Val, à une fréquence généralement très faible. Les prélèvements de phloème situés entre les galeries n'ont fourni que très rarement des champignons : 3 fois sur 57 isolements au total pour *H. dematioides* et le champignon B, 1 fois sur 57 isolements pour *O. minus* et jamais pour *L. wingfieldii*.

Fin mai, l'examen des arbres-pièges a permis d'observer la présence de taches noirâtres sous l'écorce et l'existence de plages de bleuissement en surface de l'aubier, à l'emplacement de certaines des galeries de *T. piniperda*. En section transversale, l'aubier situé au niveau de ces galeries «bleues» est apparu également bleu en profondeur. Les isolements effectués à partir de ces zones (10 en surface

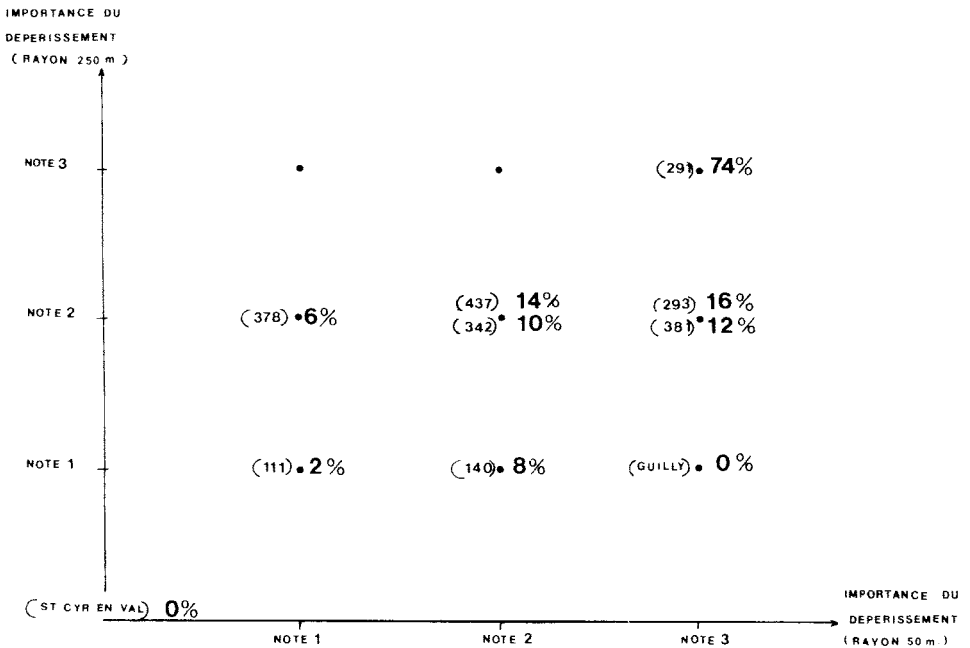


Fig. 3. Pourcentage de *Tomicus piniperda* porteur d'*Ophiostoma minus* en fonction de l'intensité du déperissement. Les numéros des parcelles sont indiqués entre parenthèses (pour la notation du déperissement, voir Tableau I).

et 10 en profondeur) ont fourni *O. minus* dans 9 cas et *L. wingfieldii* dans un cas.

En novembre, sur les 3 arbres de la parcelle 488, des écoulements de résine étaient visibles extérieurement, à partir de la plupart des trous de perceuse. A l'écorçage, seules des réactions cicatrisées de 1 à 3 cm de long étaient visibles dans le phloème; aucune réaction de défense importante n'a pu être notée. Les isollements réalisés à partir du phloème prélevé autour de chaque trou ont fourni *H. dematioides* dans 4 cas sur 120 et le champignon B dans 3 cas; ils n'ont jamais fourni *O. minus* et *L. wingfieldii*.

Interprétation et discussion

Symptomatologie

Les symptômes apparus en 1985 et 1986 sur le massif de Lorris sont considérés comme localement nouveaux. Si la perte d'écorce s'accompagne toujours d'un bleuissement de l'aubier, seul ce dernier symptôme est permanent. Il apparaît que ce bleuissement important est dû à *O. minus* et que les granulations noirâtres qui apparaissent sous le phloème sont dues à la présence de sclérotas et de périthèces de ce champignon. Cette apparence granuleuse du phloème, lequel se détache de l'écorce, est caractéristique de *O. minus* (Rumbold, 1931). Elle permet même, dans certains cas au moins, de distinguer le bleuissement provoqué par ce champignon de celui causé par d'autres espèces (Bridges *et al.*, 1985). Le fait que 60% des arbres possèdent un aubier bleu sans traces de galeries de scolytes, et que certains de ces arbres puissent malgré tout conserver un houppier vert plusieurs mois ne semble pas avoir été signalé jusqu'à présent dans les dépérissements associés à *O. minus*.

Le dépérissement du pin sylvestre paraît plus important dans les vieux peuplements installés en condition d'hydromorphie et semble affecter plus facilement les arbres peu vigoureux. Cependant, de nombreux arbres dominants sont également touchés. La transparence du houppier du pin sylvestre ne peut être considérée comme un stade initial du dépérissement. Il convient toutefois de signaler que 2 attaques importantes de la tenthrède défoliatrice *Diprion pini* ont eu lieu sur le massif de Lorris en 1981 et 1984, ce qui a pu masquer le rôle éventuel de la transparence du houppier en tant que symptôme associé au dépérissement. Des observations plus fines sont évidemment nécessaires pour décrire de façon précise les symptômes du dépérissement en cause, en particulier les symptômes précoces au niveau de l'individu.

Rôle de Ophiostoma minus et de Leptographium wingfieldii

Les résultats de nos prélèvements, tant à partir des arbres malades que des arbres pièges attaqués par les scolytes, conduisent à attribuer à *O. minus* la responsabilité du bleuissement de l'aubier et de la présence des granulations noirâtres sous l'écorce. En outre, parmi les champignons à potentialités pathogènes isolés des arbres dépérissants, la constance de *O. minus* dans les prélèvements issus de ces arbres et sa quasi-absence sur les arbres sans symptômes suggèrent que ce champignon pourrait être impliqué, d'une manière ou d'une autre, dans le dépérissement. Les résultats concernant les contaminations d'insectes, importantes dans les parcelles dépérissantes et absentes dans la parcelle témoin de Saint-Cyr-en-Val, vont dans le même sens. L'existence de *O. minus* sur 2 des arbres témoins sans symptômes et situés en limite de taches de dépérissement pourrait alors être due à un début de contamination de ces sujets.

Le fait que nous n'ayons pu reproduire les symptômes du dépérissement par inoculations artificielles conduit évidemment à émettre des réserves quant à la responsabilité de *O. minus* en tant qu'agent causal de la maladie. Le grand développement des réactions de défense sur les sujets inoculés montre toutefois que *O. minus* possède une agressivité très élevée pour le pin sylvestre. C'est aussi ce qui ressort d'inoculations comparatives effectuées dans des expérimentations menées lors d'autres études (Lieutier *et al.*, en préparation).

La nocivité de *O. minus* a été démontrée chez diverses espèces de pins nord-américains : *Pinus rigida* et *Pinus echinata* (Nelson et Beal, 1929; Nelson, 1934; Bramble et Holst, 1940), *Pinus ponderosa* (Mathre, 1964), *Pinus taeda* (Basham, 1970). Dans ces cas, la mortalité des arbres a été obtenue par inoculations massives de cultures de champignons sur de grandes surfaces de tronc après décollement de l'écorce; il est donc possible que les quantités d'inoculum que nous avons utilisées aient été trop faibles. Il se peut que la date et les conditions d'inoculation aient une action sur le pouvoir pathogène. Il est également possible que nos inoculations ponctuelles multiples ne permettent pas une extension latérale suffisante du champignon, comme l'ont suggérée Nelson et Beal (1929).

L. wingfieldii mérite également une certaine attention puisque des espèces de ce genre, notamment *L. procerum*, ont provoqué en Europe des dépérissements souvent importants (Morelet, 1986). Ce dernier *Leptographium* est toutefois très différent de *L. wingfieldii* et la rapidité du flétrissement ne correspond pas aux observations rapportées ici. En outre, *L. wingfieldii* a été isolé de façon très irrégulière des arbres malades, et il est présent dans la parcelle non dépérissante de Saint-Cyr-en-Val. Très récemment, néan-

moins la présence de *L. procerum* a été rapportée sur 2 individus en forêt d'Orléans (Morelet, 1988); sa recherche devra à l'avenir être associée à la description des symptômes précoces.

Dans l'état actuel de nos recherches, il convient donc d'être prudent mais nos résultats, ainsi que la nocivité démontrée de *O. minus* pour plusieurs espèces de pins, nous conduisent à avancer l'hypothèse que ce champignon pourrait jouer un certain rôle dans le dépérissement de la forêt d'Orléans, d'autant plus que nous l'avons observé aussi sur quelques pins laricio présentant les mêmes symptômes que les pins sylvestres. On ne peut toutefois écarter la possibilité d'un rôle secondaire de *O. minus*, lequel masquerait un autre pathogène véritable responsable du dépérissement. A ce sujet, il conviendrait d'étudier les stades précoces du dépérissement, avant l'apparition des premiers symptômes, ainsi que d'effectuer une autopsie complète des sujets atteints, en particulier au niveau des racines.

Rôle de *Tomicus piniperda*

La présence de *O. minus*, *L. wingfieldii*, *H. dematioides* et du champignon B sur *T. piniperda* et dans ses galeries, leur absence ou leur fréquence très réduite en dehors des galeries sur les arbres-pièges attaqués prouvent que ces champignons peuvent être transportés par *T. piniperda*. Cela est conforme aux observations de Lieutier *et al.* (1988) qui ont également observé ces champignons sur des *T. piniperda* en essaimage, et est confirmé par l'expérimentation réalisée sur les arbres ayant reçu des trous de perceuse dans la parcelle 488. Contrairement même à *H. dematioides* et aux champignons B, *O. minus* et *L. wingfieldii* n'ont jamais été isolés de ces 3 arbres, ce qui semble éliminer la possibilité de leur transport par le vent et suggérer une propagation par contact. Dowding (1969) a démontré à ce

propos que le vent ne joue aucun rôle dans la dissémination des conidies de *O. minus*. Celles-ci, entourées d'un mucilage hydrosoluble, pourraient être dispersées par l'eau de pluie, mais leur pouvoir germinatif diminuerait alors très vite après dessiccation de quelques dizaines de minutes ou exposition à la lumière du jour. Les ascospores sont produits dans une matière visqueuse insoluble dans l'eau et ne pourraient être propagés que par contact (Dowding, 1969). Le même auteur signale par ailleurs (1973) que des grumes de pin sylvestre traitées à l'insecticide ne sont pas envahies par *O. minus* et ne bleussent pas, contrairement aux grumes non traitées et attaquées par *T. piniperda* et *H. ater*. Nos observations sur la présence de *O. minus* et d'un bleuissement de l'aubier autour de certaines galeries de *T. piniperda* sont également en accord avec un transport de *O. minus* par ce scolyte.

L'ensemble de nos observations et les données bibliographiques permettent donc de considérer comme très vraisemblable le transport de *O. minus* par *T. piniperda*. Il est intéressant à ce sujet de remarquer que c'est également un scolyte, *Dendroctonus frontalis*, qui véhicule *O. minus* dans le sud des États-Unis (Barras et Perry, 1972; Barras et Taylor, 1973).

L'association de *O. minus* et de *T. piniperda* est cependant assez lâche (elle varie de 0 à 74%) et le taux de contamination des insectes capturés sur les arbres pièges est grossièrement relié à l'intensité du dépérissement, liaison sans doute masquée par les possibilités d'attraction à distance des arbres-pièges. Cette association apparaît donc relativement fortuite et ne semble pas correspondre à une quelconque symbiose entre les 2 organismes, telle que celle existant entre divers autres scolytes et *Ophiostoma* (Raffa et Berryman, 1983; Hornvedt *et al.*, 1983; Lieutier et Levieux, 1985). On peut, dans ces conditions, penser que la conta-

mination des insectes s'effectue lors de leur reproduction sur les arbres affaiblis par le dépérissement. A ce titre, d'autres xylophages, scolytides ou non, pourraient également être contaminés.

Si l'association entre *O. minus* et *T. piniperda* apparaît fortuite, il n'en reste cependant pas moins que ce scolyte s'avère être un vecteur important du champignon d'une parcelle à l'autre de la forêt. En effet, non seulement la proportion de *T. piniperda* contaminés est importante dans les parcelles dépérissantes, mais cet insecte a des possibilités de déplacement en vol non négligeables et montre chaque année une redistribution de ses populations à l'échelle du massif, en fonction des foyers de reproduction disponibles (Sauvard *et al.*, 1987). Les grumes et les tas de bois fraîchement coupés et non écorcés représentent en ce sens une masse attractive importante susceptible d'attirer les *T. piniperda* contaminés hors des parcelles dépérissantes et d'introduire ainsi le champignon dans de nouvelles parcelles. Le fait que la proportion de scolytes contaminés est importante dans les parcelles dépérissantes pourrait laisser penser que les déplacements de *T. piniperda* sont au contraire réduits. Toutefois, comme toutes les populations de scolytes en phase endémique, celles de *T. piniperda* ne peuvent réussir les attaques que sur des arbres très déficients ou abattus. Le dépérissement fournirait régulièrement de tels arbres dans les parcelles déjà atteintes, et les insectes pourraient donc trouver sur place le matériel et la nourriture nécessaires à leur développement, ce qui augmenterait localement le pourcentage de contamination, en limitant les déplacements à grande distance.

Dans l'hypothèse d'un réel pouvoir pathogène de *O. minus* pour le pin sylvestre, se pose alors la question de savoir comment s'effectue la contamination des arbres sains. L'extension circulaire de cer-

taines taches de dépérissement peut correspondre à une contamination par contacts racinaires, mais très souvent le dépérissement se présente de façon diffuse. La contamination des arbres par les attaques de *T. piniperda* sur les fûts nous paraît peu probable, car l'état endémique des populations de cet insecte ne lui permet de réussir ses attaques que sur les arbres déjà très déficients, alors que le dépérissement, bien que touchant plus facilement des arbres peu vigoureux, atteint de nombreux arbres dominants. En outre, aucune relation apparente n'existe entre la présence des galeries de scolytes sur le fût et le dépérissement. Il est cependant possible, comme l'ont supposé Hodges *et al.* (1985) pour les attaques de *Dendroctonus frontalis* et *O. minus* sur *Pinus taeda*, que les réactions de défense de l'arbre aient pu stopper très précocement les attaques, ne laissant pas de traces de galeries, mais que l'inoculation ait pu quand même être réalisée. Les toxines sécrétées par le champignon finirait alors par tuer l'arbre, même si l'attaque du scolyte a échoué. Néanmoins, à la différence de *D. frontalis*, *T. piniperda* possède une phase de nutrition dans les pousses et une phase d'hibernation à la base du fût des arbres, pouvant s'effectuer toutes deux sur des sujets en bonne santé et vigoureux. Il nous semble qu'il y a là une possibilité de contamination des arbres qui expliquerait que des sujets dominants puissent être atteints par le dépérissement. Le caractère dangereux de *T. piniperda* dans ce dépérissement en serait renforcé par rapport aux autres insectes vecteurs potentiels, s'il se confirmait que *O. minus* est bien le pathogène responsable.

Conclusions

Il est bien sûr prématuré de conclure à une responsabilité certaine de *O. minus*

dans le dépérissement de la forêt d'Orléans. De nouvelles expérimentations doivent être entreprises pour étudier la maladie à ses stades précoces et pour tenter de reproduire, par inoculations artificielles, les symptômes observés. L'hypothèse de cette responsabilité peut cependant être avancée. Le rôle de *T. piniperda* dans la dissémination de *O. minus* d'une parcelle à l'autre apparaît en revanche extrêmement probable, même s'il n'est pas sûr que cet insecte soit responsable de l'inoculation du champignon aux arbres sains.

Remerciements

Les auteurs remercient Claude Delatour et Michel Morelet, de la Station de pathologie forestière de l'INRA (Nancy) pour leurs conseils et l'aide qu'ils leur ont apporté dans l'identification des champignons. Ils remercient également l'Office National des Forêts (Direction Régionale Centre et le Centre de Gestion d'Orléans) pour la mise à disposition de parcelles d'études.

Références

- Barras S.J. & Perry T. (1972) Fungal symbionts in the prothoracic mycangium of *Dendroctonus frontalis* (Coleopt : Scolytidae). *Z. Angew. Entomol.* 71, 95-104
- Barras S.J. & Taylor J.J. (1973) Varietal *Ceratocystis minor* identified from mycangium of *Dendroctonus frontalis*. *Mycopathol. Mycol. Applic.* 50, 293-305
- Basham H.G. (1970) Wilt of Loblolly pine inoculated with blue stain fungi of the genus *Ceratocystis*. *Phytopathology* 60, 750-754
- Bramble W.C. & Holst E.C. (1940) Fungi associated with *Dendroctonus frontalis* in killing shortleaf pines and their effect on conduction. *Phytopathology* 30, 881-899
- Bridges J.R., Nettleton W.A. & Conner M.D. (1985) Southern pine beetle (Col-Scol) infestations without the blue stain fungus *Ceratocystis minor*. *J. Econ. Entomol.* 78, 325-327

- Dowding P. (1969) The dispersal and survival of spores of fungi causing blue stain in pine. *Trans. Br. Ecol. Soc.* 52, 125-137
- Dowding P. (1973) Effects of felling time and insecticide treatment on the interrelationships of fungi and arthropods in pine logs. *Oikos* 24, 422-429
- Hodges J.D., Nebeker T.E., Deangelis J.D., Karr B.L. & Blanche C.A. (1985) Host resistance and mortality : a hypothesis based on the southern pine beetle – microorganisms – host interactions. *Bull. Entomol. Soc. Am.* 31, 31-35
- Hornvedt R., Christiansen E., Solheim H. & Wang S.G. (1983) Artificial inoculation with *Ips typographus* associated blue stain fungi can kill healthy Norway spruce trees. *Medd. Nor. Inst. Skogf.* 38, 1-20
- Lieutier F. & Levieux J. (1985) Les relations conifères-scolytides : importance et perspectives de recherches. *Ann. Sci. For.* 42, 359-370
- Lieutier F., Geri C., Goussard F. & Rousseau G. (1984) Problèmes entomologiques actuels du pin sylvestre en région Centre. *Forêt Priv.* 155, 25-36
- Lieutier F., Yart A., Garcia J., Ham M.C. & Morelet M. (1988) Champignons phytopathogènes associés à *Ips sexdentatus* Boern. et *Tomicus piniperda* L. (Coleoptera : Scolytidae) et étude préliminaire de leur agressivité pour le pin sylvestre (en préparation)
- Lieutier F., Yart A., Garcia J., Poupinel B. & Levieux J. (1988) Do fungi influence the establishment of bark beetles on Scots pine ? In : *Mechanisms of Woody Plant Defenses against Insects. Search for Pattern* (W.J. Mattson, J. Levieux & C. Bernard-Dagan, eds.), Springer-Verlag, pp. 321-334
- Mathre D.E. (1964) Pathogenicity of *Ceratocystis ips* and *Ceratocystis minor* to *Pinus ponderosa*. *Contrib. Boyce Thompson. Inst.* 22, 363-388
- Morelet M. (1986) Les *Verticicladiella* des pins en liaison avec les phénomènes de dépérissement. *Bull. OEPP* 16, 473-478
- Morelet M. (1988) Observations sur trois deutéromycètes inféodés aux pins. *Ann. Sci. Nat. Archeol. Toulon Var* 40, 41-45
- Nelson R.M. (1934) Effect of blue stain fungi on southern pines attacked by bark beetles. *Phytopathol Z.* 7, 327-353
- Nelson R.M. & Beal J.A. (1929) Experiments with blue stain fungi in southern pines. *Phytopathology* 19, 1101-1106
- Raffa K.L. & Berryman A.A. (1983) The role of host resistance in the colonization behavior and ecology of bark beetles (Coleoptera : Scolytidae). *Ecol. Monogr.* 53, 27-49
- Rumbold C.T. (1931) Two blue-staining fungi associated with bark beetle infestation of pines. *J. Agric. Res.* 43, 847-873
- Sauvard D., Lieutier F. & Levieux J. (1987) Répartition spatiale et dispersion de *Tomicus piniperda* L. (Coleoptera : Scolytidae) en forêt d'Orléans. *Ann. Sci. For.* 44, 417-434
- Vigouroux A. (1979) Une méthode simple de recherche de *Ceratocystis fimbriata* f. *platani* sur arbres en place. *Eur. J. For. Path.* 9, 316-320
- Waring R.H., Thies W.G. & Muscato D. (1980) Stem growth per unit of leaf area : a measure of tree vigor. *For. Sci.* 26, 112-117
- Wright E. (1933) A cork-borer method for inoculating trees. *Phytopathology* 23, 487-488