

Isolement de *Ceratocystis piceae* (Münch) Bakshi par piégeage à partir de chênes dépérissants de la Forêt de Soignes (Belgique)

Jérôme Degreef, François Malaisse

Au début des années 70, les agents forestiers tiraient la sonnette d'alarme : la santé des forêts européennes devenait préoccupante et de nombreuses essences étaient affectées d'un mal mystérieux. Initialement considérée comme due à la pollution atmosphérique et aux pluies acides, cette perte de vitalité, à présent appelée « dépérissement forestier », résulterait de causes plus complexes. Les résineux furent les premiers touchés, mais plus tard, divers feuillus montrèrent également une dégradation de leur état sanitaire. C'est notamment le cas des chênes autochtones en Europe [*Quercus robur* L. et *Quercus petraea* (Matt.) Lieblin]. Bien que la vague actuelle de dépérissement des chênes européens émeuve l'opinion publique, ce phénomène n'est pas nouveau [1]. Déjà signalées aux Pays-Bas en 1709, des mortalités anormales de chênes se sont succédé par vagues dans la plupart des pays d'Europe, sans que les causes précises de ces altérations aient été identifiées avec certitude.

Depuis 1985, un phénomène analogue de dépérissement des chênes est à nouveau observé en Belgique, où plusieurs

milliers d'arbres ont succombé au cours des dernières années.

Afin de déterminer d'éventuelles causes de ce dépérissement, nous avons utilisé une méthode méconnue de mise en évidence de microorganismes.

Technique de piégeage

Bien qu'elles soient de pratique courante en phytopathologie forestière, les techniques classiques d'isolement sur milieu nutritif ne permettent pas toujours la mise en évidence de l'ensemble des microorganismes présents dans des échantillons de bois. Le développement extrêmement rapide des microorganismes saprophytes sur milieu gélosé peut en effet masquer la présence de certains parasites ayant une incidence phytopathologique mais au développement plus lent *in vitro*. Afin de contourner cette difficulté, une technique de piégeage originale, mise au point par Grosclaude *et al.* [2] s'est avérée très performante pour éviter le masquage des champignons parasites par divers microorganismes secondaires particulièrement compétitifs. Nous avons appliqué au chêne le principe de la méthode, en mettant en contact, en milieu liquide, des échantillons de bois à tester et des rameaux sains de chêne pédonculé (*Quercus robur* L.). Des ramilles écorcées, ou des carottes pré-

levées à l'aide d'une tarière de Pressler dans l'aubier de 18 chênes dépérissants de la Forêt de Soignes, près de Bruxelles, sont plongées dans un Erlenmeyer contenant de l'eau stérilisée (figure 1). Des rameaux-pièges de chênes sains sont écorcés, autoclavés et plongés dans le récipient jusqu'aux deux tiers de leur longueur. L'eau du récipient est oxygénée par barbotage d'air et l'ensemble, fermé par un bouchon en liège percé d'un orifice, est placé en chambre conditionnée à 25 °C.

Résultats

Une à deux semaines après la mise en place du dispositif expérimental, un mycélium blanc se développe dans l'Erlenmeyer et recouvre l'échantillon testé ainsi que la partie immergée de la ramille-piège. Son développement est d'autant plus rapide et abondant que l'oxygénation du milieu est importante.

Quelques jours plus tard, on note la présence de points noirs à la surface de la partie émergée de la ramille. De plus en plus nombreuses, ces punctations noires finissent par couvrir l'ensemble de la zone du bâtonnet située hors du liquide. L'observation à la loupe binoculaire révèle la présence de corémies caractéristiques des champignons du genre *Graphium* (figure 2). Ultérieurement, se forment des péri-

J. Degreef : UER Phytopathologie, Faculté des Sciences Agronomiques, 13 Avenue Maréchal Juin, 5030 Gembloux, Belgique.
F. Malaisse : UR Écologie, Faculté des Sciences Agronomiques, 2 Passage des Déportés, 5030 Gembloux, Belgique.

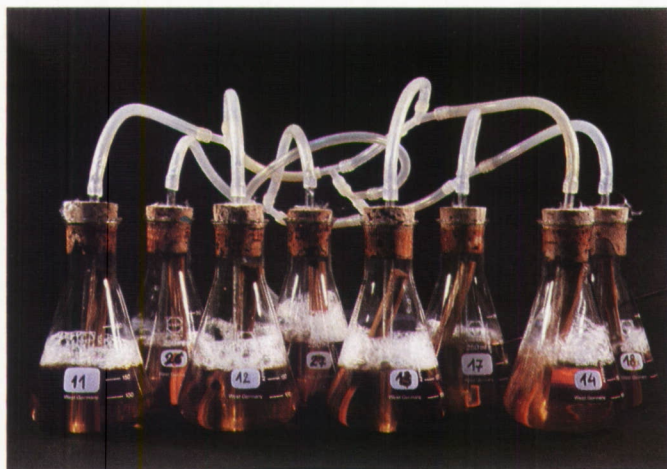


Figure 1. Dispositif de piégeage. Chaque récipient contient une ramille-piège de chêne sain et un échantillon de bois à tester provenant d'un chêne dépérissant. Le barbotage d'air est assuré par une pompe.

Figure 1. Trapping device. Each vessel contained a twig of healthy oak and sample of wood from a declining oak to be tested. Air bubbles were produced by a pump.

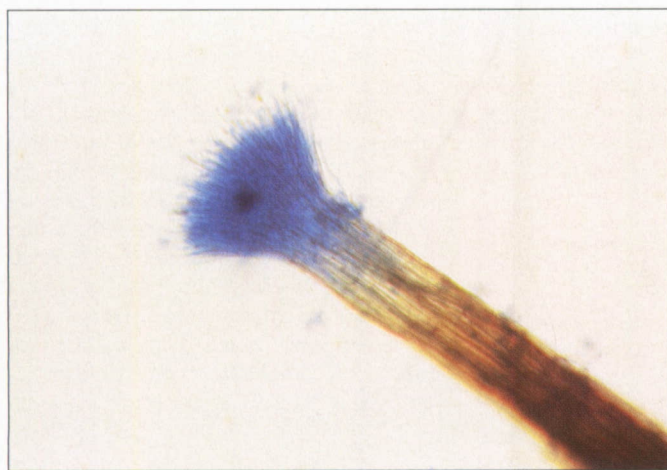


Figure 3. Apex en forme de pinceau des corémies de *Graphium*.

Figure 3. Synnemata brush apex of *Graphium*.

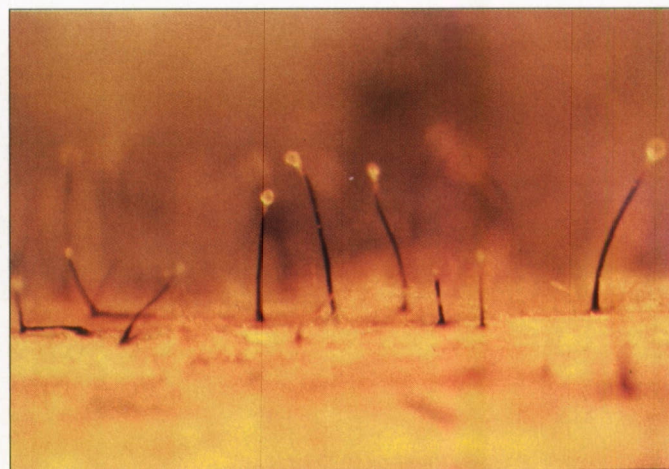


Figure 2. Corémies de la forme asexuée *Graphium* de *Ceratocystis piceae*.

Figure 2. Synnemata from asexual form *Graphium* of *Ceratocystis piceae*.

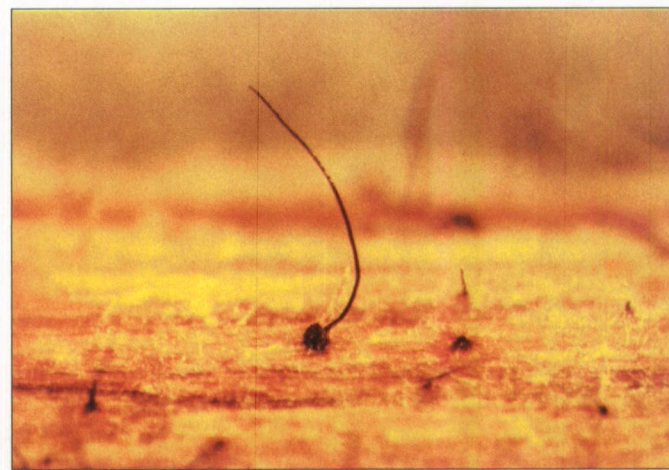


Figure 4. Périthèce à long col de la forme sexuée de *Ceratocystis piceae*.

Figure 4. Long-necked perithecia from the sexual form of *Ceratocystis piceae*.

thèces noirs au long col (figures 3 et 4), typiques des espèces du genre *Ceratocystis*. Les bâtonnets-pièges sont également couverts d'hyphes, à l'extrémité desquels se différencient des cellules conidiogènes.

Ces différentes formes constituent le stade sexué ou télomorphe (*Ceratocystis*) et les stades asexués ou anamorphes (*Graphium*, *Sporothrix*, *Hyalodendron*) d'un même champignon, *Ceratocystis piceae* (Münch) Bakshi, agent d'une mycose vasculaire chez le chêne. Ce Plectoascomycète appartient à l'ordre des Ophiostomales (ou Ceratocystales) et son effet pathogène est reconnu chez l'épicéa commun [*Picea*

abies (Karst.)] [3]. Il envahirait les vaisseaux à la faveur d'une blessure, ou suite à son inoculation par un insecte vecteur [4-6]. La description des formes fongiques observées est donnée ci-contre. Tous les caractères envisagés sont semblables à ceux décrits par Hunt [7] et Upadhyay [4].

Discussion et conclusions

La mise en évidence de *Ceratocystis piceae* dans l'aubier de chênes dépérissants de la Forêt de Soignes (Belgi-

que), pose la question du rôle que pourraient jouer ce *Ceratocystis*, ainsi que des espèces voisines, dans le processus de dépérissement des chênes indigènes en Europe occidentale. De nombreux auteurs [8-17], principalement en Europe orientale et dans les Balkans, ont décrit divers champignons isolés de l'aubier de chênes dépérissants, dont certains furent rattachés au genre *Ceratocystis* [4, 7, 18]. C'est notamment le cas de *Ceratostomella quercus* Georgev., décrit en 1927 et aujourd'hui considéré comme synonyme de *Ceratocystis piceae*. Aucun caractère morphologique ne permet de distinguer ces deux taxons,

mais la teinte bleue du bois des épicéas colonisés diffère des stries brunes qui apparaissent dans le cambium des chênes infectés.

Les *Ceratocystis* sur chênes semblaient, jusqu'il y a peu, limités aux pays d'Europe de l'Est et du Sud-Est. Plus récemment, ils ont été signalés de façon sporadique dans le Sud de l'Angleterre [5] et dans le Nord de

l'Allemagne [6]. Les auteurs concernés ne leur ont cependant attribué qu'un rôle secondaire, alors qu'en Roumanie, ils avaient été associés à des dépérissements chroniques de chênes [14]. En Europe occidentale, rares sont les cas de chênes présentant des symptômes aigus de dépérissement. Des dépérissements ont toutefois été signalés dans le cantonnement de Thuin, en Belgi-

Summary

Isolation of *Ceratocystis piceae* (Münch) Bakshi by trapping on declining oaks in the « Forêt de Soignes » (Belgium)

J. Degreef, F. Malaise

Forest rangers have been observing symptoms of visible decline in European forests since the early 1970s. Conifers were the first victims but, more recently, hardwoods have been presenting symptoms of damage too. This is especially so for indigenous oaks (*Quercus robur* L. and *Q. petraea* (Matt.) Lieblin). Decline of oak forests has been reported periodically in Europe since the early eighteenth century. The present situation of decline started in the 1980s. In Belgium, several thousands of oaks have died since 1985 and thousands more are seriously threatened with initially associated with dieback. This sudden decrease in vitality, associated initially with air pollution and acid rain, results from more complex causes in which, as a result of a weakening of natural tree defense mechanisms, several fungi could be involved.

Ceratocystis piceae (Münch) Bakshi was isolated from declining oaks in the « Forêt de Soignes » (Belgium), by means of a particular trapping technique. Wood samples from declining oaks to be tested were placed in a liquid medium together with twigs of healthy oaks previously uncorked and sterilized. Air bubbling in the system favours the development of *Ceratocystis piceae*, despite the presence of secondary microorganisms which are very competitive on agar gel. The presence of *Ceratocystis piceae* was revealed

after 1-2 weeks by the formation of synnemata and perithecia on the emerging part of the twigs.

The simplicity of the trapping technique used, since it does not require conditions of perfect sterility, makes it a useful isolation method for practical purposes. Its selectivity was also a positive feature: the growth conditions enabled *C. piceae* to overcome competition from the secondary agents inevitably, necessarily present in tested samples. It should be pointed out, however, that the presence of *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., associated with *C. piceae*, was recorded in several isolates of declining oak sapwood.

A few years ago the distribution of oak *Ceratocystis* appeared to be limited to eastern and south-eastern Europe. More recently, its presence has been sporadically reported in southern England and northern Germany. Our observations confirmed the presence of *C. piceae* in western Europe.

Although the members of the *Ceratocystis* genus have been considered as responsible for oak decline in eastern Europe and the Balkans, where it was mainly known for its pathogenic effect on Norway spruce, their pathogenicity has not been confirmed. The predisposal effect of water stress and possible synergy with *Fusarium solani* remain to be evaluated.

Cahiers Agricultures 1992 ; 2 : 109-12.

Références

1. Delatour C. Les dépérissements de chênes en Europe. *Rev for fr* (XXXV) 1983 ; 4 : 265-82.
2. Grosclaude C, Olivier R, Pizzuto JC, Romiti C, Madec S. Détection par piégeage du *Ceratocystis fimbriata* f. *platani*. Application à l'étude de la persistance du parasite dans du bois infecté. *Eur J For Path* 1988 ; 18 : 385-90.
3. Boyce JS. *Forest Pathology*. New-York, London : McGraw-Hill, 1938 ; 600 p.
4. Upadhyay HP. A Monograph of *Ceratocystis* and *Ceratocystiopsis*. Athens : University Georgia Press, 1981 ; 176 p.
5. Gibbs JN. An Oak Canker caused by a Gall Midge. *Forestry* 1982 ; 55 : 69-78.
6. Hartmann G, Blank R, Lewark S. Eichensterben in Norddeutschland-Verbreitung Schadbilder, mögliche Ursachen. *Forst und Holz* 1989 ; 44 : 475-87.
7. Hunt J. Taxonomy of the genus *Ceratocystis*. *Lloydia* 1956 ; 19 : 1-58.
8. Georgevitch P. *Ceratostomella quercus* n. sp. Ein Parasit der Slavonischen Eichen. *Biologia Generalis* 1927 ; 3 : 245-52.
9. Georgevitch P. Krankheit der Slavonischen Eichen. *Ceratostomella merulinensis* n. sp. Forstliche Rundschau 1933 : 250.
10. Krahl-Urban J, Liese J, Schwerdtfeger F. Das Eichensterben im Forstamt Hellefeld. *Zeitschrift für das gesamte Forstwesen* 1944 ; 76/70 : 70-86.
11. Georgescu CC, Teodoru L, Badea M. Le desèchement en masse du chêne. *Analele Institutului de Cercetari Forestiere* 1948 ; 11 : 185-223.
12. Potlaychuk VI. Sur la biologie de l'agent causal du flétrissement du chêne. *Trudy vsesoyuznogo. Instituta Zashchity Rastenii* 1957 ; 8 : 227-37.
13. Ivanchenko YN. Les causes du flétrissement du chêne dans le jardin Lipetsky en forêt de Savalsky. *Trudy vsesoyuznogo. Instituta Zashchity Rastenii* 1957 ; 8 : 221-5.
14. Petrescu M. Recherches phytopathologiques dans les forêts présentant des phénomènes de dépérissement. In : Marcu, éd. *Étude des causes et des méthodes pour prévenir le dépérissement du chêne*. Bucarest, 1966 : 319-64.
15. Haring P, Crisan A, Harsian I. La maladie du flétrissement du chêne sessile, provoquée par *Ceratocystis fagacearum*. *Contributii Botanice, Cluj-Napoca* 1982 : 77-85.
16. Kowalski T, Bartnik C. *Ceratocystis* species on *Quercus robur* with oak decline symptoms in Southern Poland. *Bull OEPP/EPPO* 1990 ; 20 : 221-8.
17. Kowalski T. Oak decline. I : Fungi associated with various disease symptoms on overground portions of middle aged and old oak (*Quercus robur* L.). *Eur J For Pathol* 1991 ; 21 : 136-51.
18. Kowalski T, Butin H. Taxonomie bekannter und neuer *Ceratocystis*-Arten an Eiche (*Quercus robur* L.). *J Phytopathol* 1989 ; 124 : 236-48.
19. Minkevitch II. Rôle de la phase saprophyte de l'*Ophiostoma roboris* dans le développement de la mycose vasculaire du chêne. *Lesnoi zhurnal* 1963 ; 3 : 16-8.
20. Eisenhauer DR. Zur Taxonomie und Pathogenität von *Ophiostoma piceae* (Münch) Syd. im Zusammenhang mit Absterbeerscheinungen in Trauben- und Stieleichenbeständen des mittel- und nordostdeutschen Diluviums. *Eur J For Path* 1991 ; 21 : 267-78.

que (Burgeon, communication personnelle), où les divers symptômes de décoloration foliaire, de défoliation et de chute d'écorce se succèdent pendant 2 à 3 mois à l'issue desquels les chênes concernés moururent sur pied. La systématique du genre *Ceratocystis* pose problème et le pouvoir pathogène de ces champignons n'a pas été clairement établi. Peu d'auteurs ont réalisé des inoculations et les résultats mettant en évidence la pathogénie des souches isolées restent ambigus [13, 14, 19]. Cependant, Eisenhauer [20], en Allemagne, a mis en évidence l'effet du stress hydrique sur la réaction de jeunes chênes à l'inoculation d'*Ophiostoma piceae* (Münch.) Sydow, synonyme de *Ceratocystis piceae*.

La simplicité de la technique de piégeage que nous avons utilisée et le fait qu'elle ne nécessite pas de conditions de parfaite stérilité, en font une méthode d'isolement commode pour le praticien. Sa sélectivité, par ailleurs, a retenu notre attention : le *Ceratocystis piceae* y trouve des conditions actives de croissance en permettant de surmonter la compétition avec des agents secondai-

res, inévitablement présents dans les échantillons testés. Il faut mentionner que, dans de nombreux isolats obtenus à partir de l'aubier de chênes dépérissants, nous avons relevé également la présence de *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., associé au *Ceratocystis piceae*. En URSS, Ivanchenko [13] a montré la nécessité d'inoculer ensemble *Ceratocystis* sp. et *Fusarium* sp., préalablement isolés de chênes dépérissants, pour provoquer des symptômes typiques de dépérissement.

La technique de piégeage utilisée a donc permis de confirmer la présence sur chêne en Europe occidentale de *Ceratocystis piceae* (Münch) Bakshi. Il reste cependant à déterminer si les isolats de ce champignon sont réellement pathogènes, notamment à la faveur d'un stress hydrique leur permettant de coloniser les sujets affaiblis.

Des essais d'inoculation devraient révéler le rôle de la sécheresse dans la dynamique de développement de ce champignon et l'éventuel effet synergique entre *Ceratocystis piceae* (Münch) Bakshi et *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. ■

Résumé

L'isolement de *Ceratocystis piceae* (Münch) Bakshi à partir de chênes dépérissants de la Forêt de Soignes (Belgique) a été rendu possible par l'utilisation d'une technique particulière de piégeage. Les échantillons de bois de chênes dépérissants à tester sont mis en présence, en milieu liquide, de ramilles-pièges de chêne sain écorcées et stérilisées. Un système de barbotage d'air favorise le développement de *Ceratocystis piceae* par rapport aux microorganismes secondaires lesquels sont par contre très compétitifs sur milieu gélosé. La présence de *Ceratocystis piceae* est révélée au bout d'une à deux semaines par l'apparition de corémies et de périthèces sur la zone émergée de la ramille. Ces observations confirment la présence de *Ceratocystis piceae* en Europe occidentale. Bien que des représentants du genre *Ceratocystis* aient été tenus pour responsables de dépérissements de chênes en Europe orientale et dans les Balkans, leur pathogénie n'a pas été clairement démontrée. A cet égard, l'action prédisposante d'un stress hydrique et l'éventuel effet synergique de *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. restent à évaluer.

Description des formes fongiques observées

Ceratocystis piceae (Münch) Bakshi (Brit. Myc. Soc. Trans. 33 : 113, 1950).

Mycélium à hyphes septés, 1-3,5 μm de diamètre, blanc puis gris à brun. Périthèces à base globuleuse, noirs, de 90-180 μm de diamètre, peu ornementés de poils bruns et rigides pouvant atteindre 200 μm x 3 μm ; col noir plus clair à l'apex, droit, parfois courbé dans sa partie supérieure, 1-1,8 mm de longueur, 10-40 μm de diamètre à la base, 5-25 μm de diamètre au sommet. Hyphes ostiolaires hyalines, divergents, au nombre de 10-20, atteignant 10-30 μm x 1-3 μm . Ascospores incolores, unicellulaires, elliptiques à réniformes, 3-4,5 μm x 1,5-2,5 μm .

- Forme *Pesotum* (genre regroupant les formes *Graphium* de champignons présentant plusieurs stades anamorphes).

Conidiophores en forme de corémies noires, constituées d'hyphes agglomérés, 250-750 μm de longueur; base ramifiée, 45-60 μm de diamètre; sommet hyalin en pinceau très élargi et surmonté d'une goutte de mucosité de 70-120 μm x 55-100 μm . Conidies hyalines, unicellulaires, ellipsoïdes à ovoïdes, 3-4 μm x 1-2 μm .

- Forme *Sporothrix*. Conidiophores hyalins, souvent ramifiés, 10-70 μm x 2 μm ; conidies hyalines, unicellulaires elliptiques, 5-7 μm x 2 μm , groupées par 2-4 au sommet des ramifications secondaires.

- Forme *Hyalodendron*. Conidies hyalines, unicellulaires, elliptiques à globuleuses, 8-13,5 μm x 1-2 μm , disposées en chaînettes.

Remerciements

Ce travail entre dans le cadre de la convention « Dépérissement forestier » entre la Faculté des Sciences Agronomiques de Gembloux et la Région de Bruxelles-capitale que nous tenons à remercier ici. Nos remerciements vont également au Professeur J. Semal et au Docteur P. Lepoivre, maître de Conférences à l'UER de Phytopathologie de la Faculté des Sciences Agronomiques de Gembloux, sans les remarques et les précieux conseils desquels ce travail n'aurait pu être mené à bien.