



**HAL**  
open science

# Influence des facteurs édaphiques et sylvicoles sur le développement du pourridié à Collybie: "Collybia fusipes", dans la chênaie pédonculée

Cécile Camy

► **To cite this version:**

Cécile Camy. Influence des facteurs édaphiques et sylvicoles sur le développement du pourridié à Collybie: "Collybia fusipes", dans la chênaie pédonculée. Sylviculture, foresterie. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2002. Français. NNT: 2002NAN10263 . tel-01746748

**HAL Id: tel-01746748**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01746748v1>**

Submitted on 22 Jul 2021

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



S.C.D. - U.H.P. NANCY 1  
BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES  
Rue du Jardin Botanique - BP 11  
54601 VILLERS-LES-NANCY Cédex



FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

U.F.R. Sciences et Techniques Biologiques

Ecole doctorale : Sciences et Ingénierie des Ressources, Procédés, Produits, Environnement.

Département de Formation Doctorale : Sciences Agronomiques et Forestières, Biologie, Biotechnologies

## Thèse

Présentée pour l'obtention du titre de

**Docteur de l'Université Henri Poincaré, Nancy - I**

En Biologie Forestière

Par **Cécile CAMY**

---

**Influence des facteurs édaphiques et sylvicoles sur le développement du  
pourridié à Collybie : *Collybia fusipes*, dans la chênaie pédonculée**

---

Soutenance publique prévue le : 13 décembre 2002

Membres du Jury :

Président : B. BOTTON Professeur Université Henri Poincaré, Nancy-I

Rapporteurs : J. L. NOTTEGHEM Professeur ENSAM, Montpellier

A. VANNINI Associate Professor, Università degli della Tuschia, Italie

Examineurs : C. DELATOUR Directeur de recherches INRA, Nancy

BIBLIOTHEQUE SCIENCES NANCY 1 Directeur de recherches INRA, Nancy



D 095 159240 5

Chargé de recherches INRA, Nancy

---

Unité de Pathologie Forestière – INRA Centre de Nancy

F-54280 Champenoux

## REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à remercier Benoît Marçais qui m'a encadrée depuis le DEA. 'Je te remercie de m'avoir initiée au monde merveilleux des pourridiés, au monde un peu moins merveilleux des statistiques, d'avoir corrigé inlassablement les articles pourtant si bien écrits en anglais... Bref, pour ton premier encadrement de thèse, c'était bien !'

Mes remerciements s'adressent ensuite à Claude Delatour. 'Merci pour tous les conseils pertinents, les lectures, les petits mots sympas dans les moments difficiles... Maintenant, à vous le farniente de la retraite, bien mérité !'

Je remercie également Erwin Dreyer, 'merci pour ta disponibilité et tes remarques toujours très constructives'

Merci également à Pascal Frey, pour sa gentillesse, ses conseils, ses lectures d'articles et son humour...

Bien sûr, je remercie Jean Pinon, directeur du laboratoire, pour son accueil et ses encouragements des derniers mois.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance aux membres du jury pour avoir accepté de juger ce travail.

Pour tous les conseils qu'ils m'ont apportés au cours de ma thèse, je remercie Jean-Jacques Guillaumin, Claude Nys, Claude Brechet, Patrick Gross, Bernd Zeller.

Un merci tout particulier à Olivier Caël qui m'a assistée techniquement au cours de ces années. 'Au labo et sur le terrain, ta bonne humeur est irremplaçable ! Les séjours chez mémère me manqueront...'

Bien sûr, j'adresse aussi tous mes remerciements à l'ensemble de l'équipe technique (histoire qu'y en ait pas que pour Olivier, quand même) : Béranger Bertin, Fabienne Bernard, Christine Gehin, Guy Maréchal, Florence Kropp qui ont participé aux différentes manips de la thèse au labo, en serre ou sur le terrain.

Et puis toutes les autres personnes du labo, Arlette Schipfer et Michel Morelet, à qui je souhaite la meilleure des retraites ; Marie Claude, toujours là pour toutes les affaires administratives, disponible et bonne en orthographe en plus ! Y'en a une autre qui n'est pas mal non plus de ce côté, c'est Gilberte Guinot et qui a bien d'autres qualités d'ailleurs... Claude Husson, tout pareil, disponible, sympa. Qu'est ce qu'ils sont bien dans ce labo !

Et puis tous les stagiaires et MOO qui sont de passage, à qui on s'attache, avec qui on se marre bien et qui s'en vont... La miotte (direction Guérande), la vieille crêpe (comme moi, elle sait pas où elle va atterrir), le Nico (en transit à Québec), le Pierrot (en route pour Paris), la Sandra (elle aussi, on sait pas où elle va atterrir), la Souhaila (en dérive à Jarville) le Totoph (implanté à Senlis), Melinda (Orléanaise d'adoption), Eric et Fred (à la capitale), Nora (nancéienne d'adoption). Un merci tout particulier à Sandra et Eric, qui ont participé à une de mes manips de thèse. Je n'oublie pas les Pvistes, Renaud Yo et Carole Saurat (célèbres campussiens) ainsi qu'un certain Jipé (en provenance de Québec).

Merci à tous les pourvoyeurs d'en-cas en tous genres et chocolats des derniers mois de rédaction intenses, qui se reconnaîtront...

J'espère que je n'oublie personne...

À Jérôme D. (je ne sais pas si ça va l'intéresser, au pire il pourra toujours faire du recyclage...)

# SOMMAIRE

<b>Synthèse</b> .....	<b>2</b>
<b>1 Introduction</b> .....	<b>2</b>
1.1 Caractéristiques du chêne pédonculé .....	2
1.2 Les dépérissements de chênes .....	3
1.2.1 Définitions et symptômes .....	3
1.2.2 Les différents 'scénarios' de dépérissements de chênes .....	4
1.3 <i>Collybia fusipes</i> .....	5
1.3.1 Taxonomie et cycle biologique .....	6
1.3.2 Répartition et gamme d'hôtes .....	6
1.3.3 Types d'infections induites et impact sur les systèmes racinaires .....	7
1.3.4 Pouvoir pathogène .....	8
1.3.5 Nuisibilité .....	9
1.4 Vigueur de l'hôte et sensibilité aux pourridiés .....	10
1.5 Impact et distribution des pourridiés en relation avec les facteurs édaphiques .....	12
1.6 Objectifs du travail de thèse .....	13
<b>2 Relations entre <i>C. fusipes</i>, dépérissement et facteurs édaphiques</b> .....	<b>13</b>
2.1 Enquête à large échelle (Publication I) .....	13
2.2 Approche à l'échelle de la parcelle (Publication II) .....	15
2.3 Discussion générale .....	16
<b>3 Sensibilité du chêne pédonculé à <i>C. fusipes</i> dans les stations à risques</b> .....	<b>18</b>
3.1 Inoculations de chênes pédonculés matures en forêt (Publication III) .....	19
3.2 Inoculations de jeunes plants de chênes pédonculés en conditions contrôlées .....	21
3.2.1 Inoculations de jeunes plants de chênes et relation avec l'engorgement et la texture du sol (Publication IV) .....	21
3.2.2 Inoculations de jeunes plants de chênes soumis à une sécheresse (Annexe) .....	23
3.2.3 Discussion générale .....	24
<b>4 Croissance in vitro de <i>C. fusipes</i> sous atmosphère réduite en oxygène (publication IV)</b> .....	<b>26</b>
4.1 Nouveaux apports .....	27
4.2 Discussion .....	27
<b>5 Conclusion et perspectives</b> .....	<b>28</b>
<b>Références bibliographiques</b> .....	<b>31</b>
<b>Publication I</b> .....	<b>39</b>
C. Camy, D. de Villebonne, C. Delatour and B. Marçais, 2003. Soil factors associated with decline of oaks and infection by <i>Collybia fusipes</i> . Forest Pathology (Accepté).	
<b>Publication II</b> .....	<b>54</b>
C. Camy, C. Delatour and B. Marçais, 2003. Relationships between soil factors, <i>Quercus robur</i> health, <i>Collybia fusipes</i> root infection and <i>Phytophthora</i> presence. Annals of Forest Science (Accepté).	
<b>Publication III</b> .....	<b>68</b>
C. Camy, C. Delatour, O. Caël and B. Marçais, 2003. Inoculation of mature pedunculate oaks ( <i>Quercus robur</i> ) with the root rot fungus <i>Collybia fusipes</i> and relationships with tree vigour and soil factors. European Journal of Plant Pathology (Accepté).	
<b>Publication IV</b> .....	<b>81</b>
C. Camy, E. Dreyer, C. Delatour and B. Marçais, 2003. Responses of the root rot fungus ' <i>Collybia fusipes</i> ' to soil waterlogging and oxygen availability. Mycological Research (Soumis).	
<b>Annexe</b> .....	<b>91</b>
Influence de la sécheresse sur la sensibilité du chêne pédonculé à <i>C. fusipes</i> .	

## 1 Introduction

### 1.1 Caractéristiques du chêne pédonculé

Le chêne pédonculé (*Quercus robur* L.) appartient à la famille des Fagacées et au sous-genre *Lepidobalanus*. Il couvre une majeure partie de l'Europe. Son aire naturelle s'étend de l'Irlande à l'Oural et du nord-ouest de la péninsule Ibérique au sud de la Scandinavie. En France la chênaie occupe 4.8 millions d'hectares. Le chêne pédonculé y est l'espèce la plus répandue, occupant 17.5% de la superficie, devant le chêne sessile (*Q. petraea* (Matt) Liebl.) qui occupe en occupe 13%. Ces deux espèces sont d'importance économique prépondérante. Elles fournissent à elles seules 60% des sciages feuillus français et 40% des revenus de la filière graines et plants (Ducouso et Kremer, 1998). En France, le chêne pédonculé se retrouve dans la plupart des départements bien qu'il soit plus rare dans le sud-est, en particulier en région méditerranéenne, et absent de Corse. Il se rencontre de l'étage collinéen à la base de l'étage montagnard, i. e. jusqu'à 1300 m (Rameau *et al.*, 1993).

Sur le plan morphologique, le chêne pédonculé se différencie du chêne sessile notamment d'après la longueur du pédoncule de l'infrutescence, la longueur du pétiole des feuilles, la présence de nervures intercalaires et la présence d'oreillettes à la base du limbe (Dupouey *et al.*, 1990). Les deux espèces se distinguent également par leurs propriétés écologiques et écophysiological. Le chêne pédonculé est une espèce héliophile pionnière à large amplitude écologique en absence de concurrence. Il précède le chêne sessile dans les successions forestières (Rameau, 1990). Le chêne pédonculé se retrouve sur des sols plus riches en nutriments et mieux alimentés en eau que le chêne sessile (Sigaud, 1986 ; Lévy *et al.*, 1992). Il montre une vulnérabilité à la cavitation légèrement supérieure à celle du chêne sessile (Cochard *et al.*, 1992). Epron et Dreyer (1993) ont observé sur arbres adultes une efficacité d'utilisation intrinsèque de l'eau (rapport entre la fixation de carbone et la consommation en eau) inférieure à celle du chêne sessile. Ponton *et al.* (2002) ont ensuite confirmé expérimentalement ces résultats sur jeunes plants. Des études en milieu contrôlé ont mis en évidence des taux de mortalité supérieurs à ceux du chêne sessile, lors de forts stress hydriques (Vivin *et al.*, 1993). En milieu naturel, le chêne pédonculé est particulièrement sensible à la sécheresse lorsqu'elle fait suite à un engorgement du sol par l'eau (Becker et Lévy, 1983a). Il tolère mieux un engorgement temporaire du sol que le chêne sessile (Dreyer *et al.*, 1991 ; Becker *et al.*, 1996 ; Wagner et Dreyer, 1997). Il possède en effet une capacité à prospector les horizons anoxiques et à développer des adaptations racinaires (Belgrand, 1983). Cependant sa régénération naturelle est difficile sur sols hydromorphes acides (Becker et Lévy, 1983b).



**Figure 1.** Classes d'évaluation de l'aspect du houppier : protocole 'DEPEFEU'.

- 0** : absence de symptômes, ramifications secondaires opaques, houppier dense.
- 1** : Transparence légère à modérée liée à une perte de ramification fine, présence de fenêtres disjointes.
- 2** : Transparence moyenne à forte liée à une perte assez forte de ramification fine (<50%), échancrures dans le houppier, visualisation partielle du squelette de l'arbre.
- 3** : disparition de plus de 50% de la ramification ; visualisation totale du squelette de l'arbre.
- 4** : Houppier mort, arbre mort ou moribond.  
(d'après Nageleisen, 1995)

En mélange, le chêne sessile et le chêne pédonculé sont capables. Dupouey et Badeau (1993) mentionnent une proportion d'individus à morphologie intermédiaire pouvant atteindre un peu moins de 5%. De plus, il a été montré que des transferts de pollen unidirectionnels du chêne sessile vers le chêne pédonculé permettaient au chêne sessile d'utiliser le caractère pionnier du chêne pédonculé pour coloniser de nouveaux milieux (Steinhoff, 1993 ; Bacilieri *et al.*, 1996).

Longtemps, les forestiers ont mené à l'égard du chêne pédonculé une sylviculture traditionnelle en futaie dense, peu différente de celle du chêne sessile. Ceux-ci s'orientent aujourd'hui vers une sylviculture plus dynamique dont l'âge d'exploitabilité a été réduit entre 100 et 140 ans, avec un nombre de tiges à l'hectare de 50 à 70 et un diamètre de 70 à 80 cm (Lafouge, 1990 ; Duplat, 1996).

## **1.2 Les dépérissements de chênes**

### **1.2.1 Définitions et symptômes**

En France et à travers toute l'Europe, depuis le début du siècle dernier, le chêne a subi plusieurs vagues de dépérissements. Dans la plupart des cas, le chêne pédonculé était l'espèce la plus touchée par le phénomène (Delatour, 1983 ; Landmann *et al.*, 1993 ; Nageleisen, 1993 ; Ragazzi *et al.*, 1995). Les symptômes caractéristiques correspondent à une perte de ramification au niveau du houppier, une diminution de croissance pouvant dater de plusieurs années, des mortalités de racines lignifiées ou de racines fines ainsi que des dégénérescences des mycorhizes. Au niveau du houppier, la perte de ramification peut paraître diffuse, suite à un phénomène d'abscission de rameaux verts (décurtation), de croissance réduite ou de mortalités des rameaux secondaires ou suite à un phénomène de mycrophylle. Au contraire, elle peut paraître plus localisée suite à des mortalités de branches maîtresses pouvant aboutir à une descente de cime. La prise en compte de critères tels que l'importance de la réduction de la masse foliaire et l'architecture du houppier a permis de mettre au point une méthode d'évaluation de sa transparence, basée sur 5 classes reflétant le niveau de dépérissement (Figure 1) (Nageleisen, 1995).

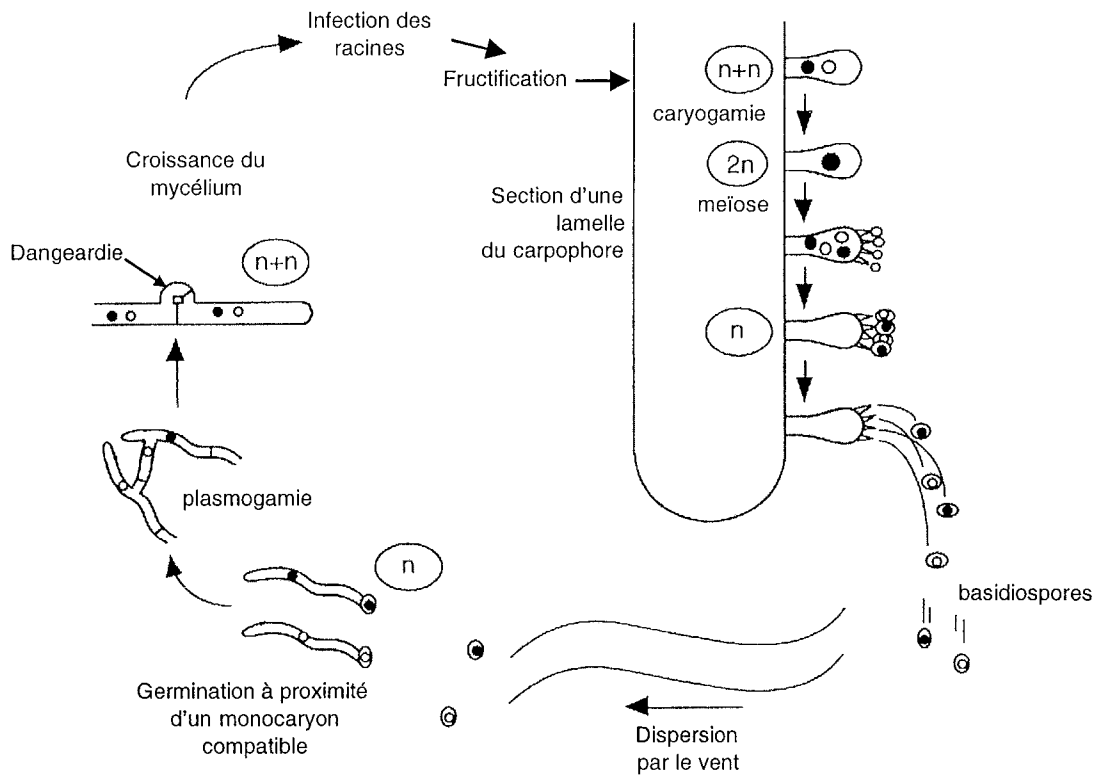
Sinclair (1964) est le premier à définir le dépérissement comme résultant d'un système à trois échelons successifs de facteurs biotiques et/ou abiotiques : les facteurs prédisposants contribuant à l'affaiblissement général des arbres sur le long terme (facteurs stationnels, espèces inadaptées, parasites chroniques ...), les facteurs déclenchants agissant d'une façon prononcée sur une courte période (insectes défoliateurs, sécheresse, froid...) et les facteurs aggravants, augmentant le taux de dépérissement ou de mortalité des arbres déjà affaiblis (essentiellement d'origine biotique, parasites secondaires...). Manion (1991) reprend ce concept tout en ajoutant l'idée que les multiples facteurs impliqués dans les dépérissements diffèrent d'un endroit à l'autre et sont au moins en partie interchangeables. Il définit les dépérissements comme des phénomènes complexes causés par un ensemble de facteurs



interagissant et se succédant de façon particulière, et qui entraînent une détérioration générale (portant notamment sur l'aspect et la croissance) et graduelle, se terminant souvent par la mort de l'arbre. Delatour (1990) inclut également dans le terme de dépérissement une idée d'évolution dans le temps dont l'issue naturelle pour l'arbre dépérissant est problématique mais pas forcément fatale. Il associe également au terme de dépérissement l'idée d'une cause non immédiatement identifiable avec certitude.

### **1.2.2 Les différents 'scénarios' de dépérissements de chênes**

Bien que des dépérissements chroniques soient observés, ils interviennent dans leur grande majorité par vagues, apparaissant brusquement et s'estompant en quelques années. En France, la prise de conscience du phénomène date de la fin des années 1970, alors que plusieurs épisodes de dépérissements de chênes sont rapportés dans diverses régions françaises (Alsace, Bourgogne, Centre, Auvergne, Aquitaine...) (Becker et Levy, 1982 ; Buffet, 1983 ; Durand *et al.*, 1983 ; Macaire, 1984). Des études multidisciplinaires sont alors menées à l'échelle nationale, ayant pour but de déterminer les causes de ce phénomène afin de mieux comprendre sa dynamique et d'en éviter sa répétition. Les premières études significatives menées dans les années 80 ont concerné la forêt domaniale de Tronçais, qui représente une des plus prestigieuses futaies de chênes en France et où les dépérissements étaient particulièrement intenses. Là encore, parmi les deux espèces de chêne prédominantes (*Q petraea* et *Q robur*), c'est le chêne pédonculé qui était le plus touché. Ces dépérissements étaient aggravés sur sols pauvres à faible réserve utile en eau ou sur les types de sols à pseudogley podzoliques, ennoyés en hiver mais susceptibles de se dessécher rapidement et fortement en été (Becker et Levy, 1982). De plus, les études dendrochronologiques révélèrent le fort impact de la sécheresse de 1976, caractérisé par une chute d'accroissement particulièrement marquée chez le chêne pédonculé (Becker et Lévy, 1983a). Le dépérissement du chêne pédonculé est alors apparu comme la résultante d'erreurs sylvicoles ayant poussé ce dernier hors de son optimum écologique (Becker et Le Tacon, 1985 ; Rameau, 1990). En effet, par son caractère héliophile pionnier, il se retrouve naturellement en lisière. De plus, ses glands sont de plus grosse taille que ceux du chêne sessile. Ainsi, la plus grande facilité de récolte de ses graines a engendré sa plantation de façon abusive dans des espaces ouverts dégradés, à régénération difficile et aux propriétés éloignées de ses exigences écologiques (Becker et Lévy, 1982). En plus de ces facteurs abiotiques, il est apparu que des basidiomycètes pourridiés : les armillaires, *Armillaria gallica* Marxmüller & Romagn., *A. mellea* (Vahl.: Fr.) Kumm. et la Collybie, *Collybia fusipes* (Bull.: Fr.) Quéil. avaient joué un rôle non négligeable (Delatour et Guillaumin, 1984 ; Guillaumin *et al.*, 1985). En effet, l'intensité des dépérissements était positivement corrélée avec la gravité des dégâts racinaires provoqués par ces pourridiés. Cependant, le rôle respectif que ces espèces avaient joué dans le processus de dépérissement était alors difficilement interprétable, en particulier pour *C. fusipes* dont la biologie était alors inconnue. En effet, Guillaumin *et al.* (1985) posèrent le problème des 'causes et des conséquences' : l'affaiblissement des arbres a-t-il été à l'origine du développement de ces



**Figure 2.** Cycle biologique de *Collybia fusipes*

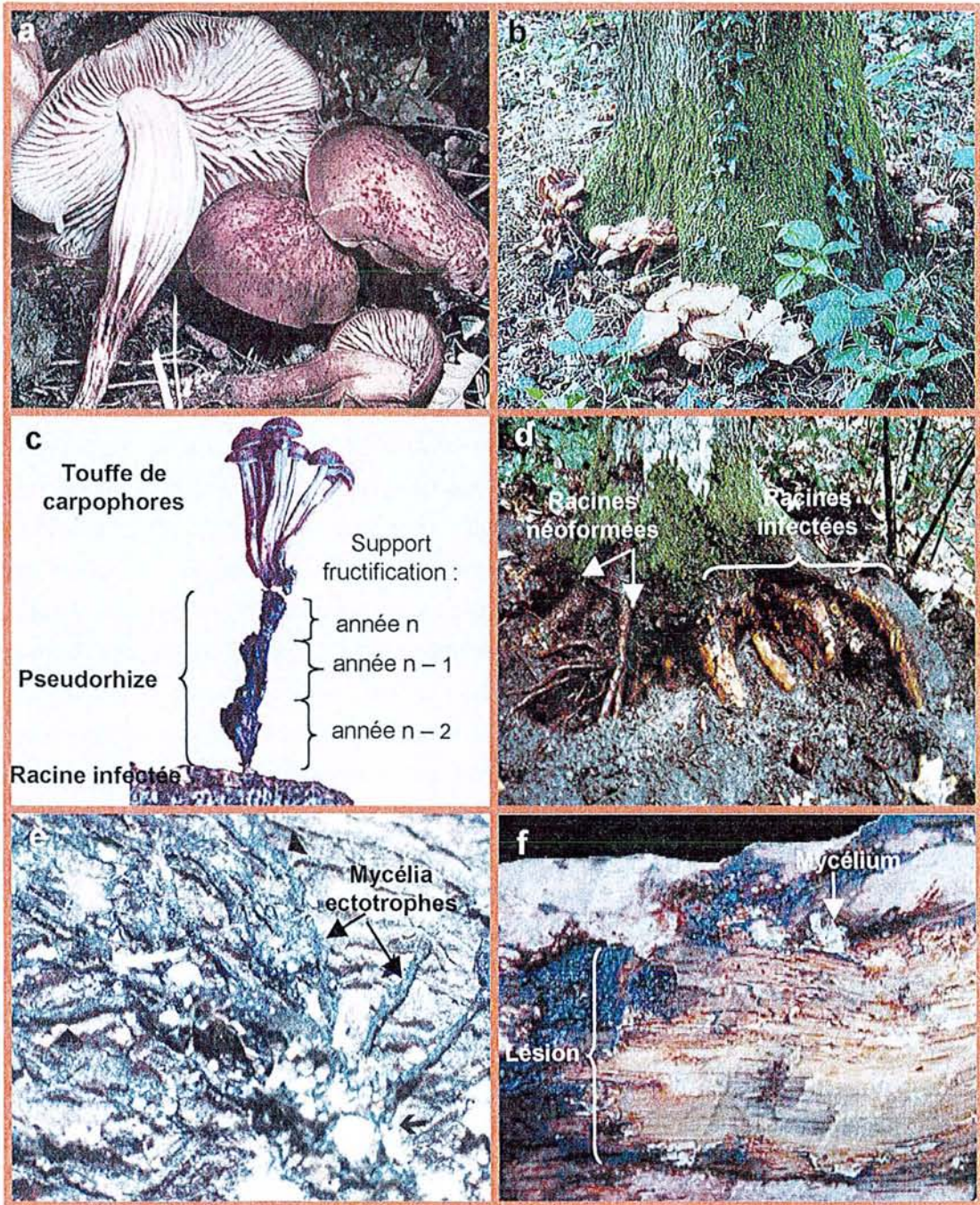
champignons pathogènes ou, au contraire, l'activité permanente des pourridiés au niveau des racines a-t-elle eu des effets tout au long de la vie des chênes, les rendant incapables de résister à un épisode de sécheresse ?

Suite à la prise de conscience des années 80, il est apparu que peu d'informations étaient disponibles concernant le suivi sanitaire des peuplements dans le temps. En 1989, le Département de la Santé des Forêts (DSF) a donc été mis en place avec pour objectif la détection des problèmes phytosanitaires intervenant sur le territoire national et l'évaluation de leur impact et gravité. Un réseau de correspondants observateurs consigne chaque année, dans une base de données, l'ensemble des symptômes et agents causals associés, rencontrés sur l'ensemble du territoire.

La forêt de Tronçais représente un cas spécifique de dépérissement de chêne mais de nombreux autres 'scénarios' ont été rapportés en France et en Europe, mentionnant souvent, comme à Tronçais, l'implication prépondérante des épisodes de sécheresses (Delatour, 1983 ; Ragazzi *et al.*, 1989 ; Siwecki et Ufnalski, 1998 ; Thomas et Hartmann, 1998). Les insectes défoliateurs tels que *Tortrix viridana* L. ou *Lymentria dispar* L. ont été également fréquemment incriminés et semblaient jouer un rôle primordial dans de nombreux dépérissements (Gibbs et Greig, 1997 ; Hartmann et Blank, 1993 ; Nageleisen, 1993 ; Varga, 1993). Certains scénarios ont associé aux dépérissements d'autres facteurs biotiques dont l'importance reste encore mal définie. Il s'agit notamment des insectes sous-corticaux comme les agriles ou de l'oïdium, champignon pathogène foliaire (Delatour, 1983 ; Nageleisen, 1993). Il en est de même pour les *Phytophthora*, notamment responsables de la destruction des fines racines, dont diverses espèces ont pu être associées au dépérissement en Allemagne (Jung *et al.*, 1996 ; Jung *et al.*, 2000), alors qu'en France aucune relation n'a pu être mise en évidence entre l'état de dépérissement des chênes et leur présence (Hansen et Delatour, 1999 ; Delatour, 2002).

### **1.3 *Collybia fusipes***

*C. fusipes* appartient à un groupe de champignons parasites appelés pourridiés. Ces agents pathogènes infectent uniquement les plantes ligneuses, au niveau de leurs racines lignifiées. Le comportement parasitaire de *C. fusipes* a été mentionné pour la première fois par Buller (1958) et Kreisel (1961). Cependant, alors que la Collybie est restée bien connue des mycologues européens, les pathologistes forestiers n'ont repris conscience de son caractère parasitaire qu'à l'occasion du dépérissement massif des chênes de la forêt de Tronçais dans les années 80. Il semblerait que jusqu'alors les palmettes de mycélium émises au niveau des lésions aient pu souvent être confondues avec celles de l'Armillaire. Depuis, le DSF a signalé de nombreuses associations du parasite avec des problèmes de dépérissements, chablis ou mortalité (DSF, 1994). Le rôle probable de *C. fusipes* dans le dépérissement de Tronçais et l'absence totale de connaissance sur la biologie du parasite ainsi que son implication dans d'autres cas à travers toute la France ont justifié la mise en place d'un programme de recherche dans les années 1990. Ce projet avait pour but de mieux comprendre le rôle de cet agent de



**Figure 3.** Signes et symptômes de *C. fusipes* : **a.** carpophores : chapeau étalé (4-10 cm de diamètre) et pied en fuseau (4-9 cm de hauteur) ; **b.** fructifications à la base d'un chêne infecté ; **c.** touffe de carpophores reliée à la racine infectée par la pseudorhize, organe pérenne ; **d.** racines maîtresses infectées présentant une couleur orange typique et racines néoformées ; **e.** mycélium ectotrophes à la surface d'une racine infectée ; **f.** lésion au niveau d'une racine, le liber et le cambium sont infectés, présence de palmettes blanches de mycélium.

pourridié, en caractérisant notamment son pouvoir pathogène et sa répartition. Mon travail de thèse s'est inscrit au sein de ce programme.

### **1.3.1 Taxonomie et cycle biologique**

Le cycle biologique de *C. fusipes* correspond au cycle classique des basidiomycètes (Figure 2). Il s'agit d'une espèce hétérothallique car le mycélium issu d'une seule basidiospore (monocaryon) est toujours non fertile et doit fusionner avec un autre monocaryon de pôle sexuel différent pour donner un dicaryon. Elle est également tétrapolaire car chaque baside possède quatre types sexuels différents (2 loci contrôlent la compatibilité sexuelle, 2 allèles différents par locus). Seuls peuvent fusionner les monocaryons ayant des allèles différents pour chacun des deux gènes. Les mycelia dicaryotiques résultant possèdent toujours des dangeardies (boucle reliant deux articles consécutifs sur le côté de la cloison qui les sépare ; Figure 2).

*C. fusipes* fructifie en touffe à la base de ses hôtes de juin à septembre (Figure 3). Les souches peuvent également être porteuses de fructifications durant plusieurs années, *C. fusipes* étant capable de se maintenir en saprophyte sur celles-ci. La touffe de carpophores est reliée à la racine infectée par une structure végétative pérenne appelée pseudorhize (Buller, 1958) (Figure 3). Il s'agit d'un amas mycélien de forme sphérique ou oblongue entouré d'une croûte de protection noire (1-5 cm). La pseudorhize croît chaque année et est incrémentée d'une nouvelle portion à partir de laquelle se développe la nouvelle fructification. Une étude réalisée dans 6 peuplements de chênes où *C. fusipes* était fréquente a permis de mettre en évidence que la présence de fructifications à la base d'un arbre était toujours liée à de fortes infections sous-jacentes. La recherche de fructification permet de détecter 95% des arbres fortement infectés sur une parcelle. Cependant, la fructification reste un indicateur partiel du niveau d'infection puisque 44% des arbres modérément infectés ne présentent pas de carpophores une année donnée (Marçais *et al.*, 2000).

### **1.3.2 Répartition et gamme d'hôtes**

L'article de Piou *et al.* (2002) fait état des connaissances relatives à la distribution de *C. fusipes* et aux espèces d'hôtes qui lui sont sensibles, en particulier en utilisant les données du DSF. Les mentions de *C. fusipes* sont essentiellement associées à la chênaie. Elles sont très fréquentes sur chêne pédonculé mature. Au contraire, le chêne sessile est beaucoup moins fréquemment cité en tant qu'hôte alors que son importance dans la forêt française est peu différente de celle du chêne pédonculé. *C. fusipes* est également très fréquemment mentionnée sur chênes rouges (*Q. rubra* L.). De rares cas d'infection sur chêne pubescent (*Q. pubescens* Willd.), chêne vert (*Q. ilex* L.) ou chêne liège (*Q. suber* L.) ont été rapportés. Quelques cas d'infections sur châtaignier (*Castanea sativa* Mill.), hêtre (*Fagus sylvatica* L.), noisetier (*Corylus avellana* L.), charme (*Carpinus betulus* L.) ont également été mentionnés. En France, les



**Figure 4.** Présence de *C. fusipes* sur le territoire national. Départements avec mentions de *C. fusipes*  , départements sans mentions de *C. fusipes*  (d'après Piou *et al.*, 2002).

mentions de la Société Mycologique indiquent que *C. fusipes* est très largement répandue sur l'ensemble du territoire (Figure 4). Elle est cependant moins fréquemment mentionnée dans le sud-est, en particulier dans la région méditerranéenne, ce qui pourrait correspondre à la moindre fréquence du chêne pédonculé dans cette région. La présence de ce pourridié a été mentionnée dans un grand nombre de pays d'Europe ainsi qu'en Afrique du Nord (Algérie uniquement). Une enquête de répartition menée dans trois forêts de chênes du nord-est de la France a confirmé le caractère commun de ce champignon, son inféodation à la chênaie pédonculée mature et sa distribution souvent disséminée (Marçais *et al.*, 1998a). Il était présent dans 35 à 45% des sites, selon la forêt, et sur environ 5% des arbres observés. Cependant, dans les parcelles fortement atteintes, il a été montré que jusqu'à 70% des chênes pouvaient être infectés par *C. fusipes* (Marçais *et al.*, 1999).

### 1.3.3 **Types d'infections induites et impact sur les systèmes racinaires**

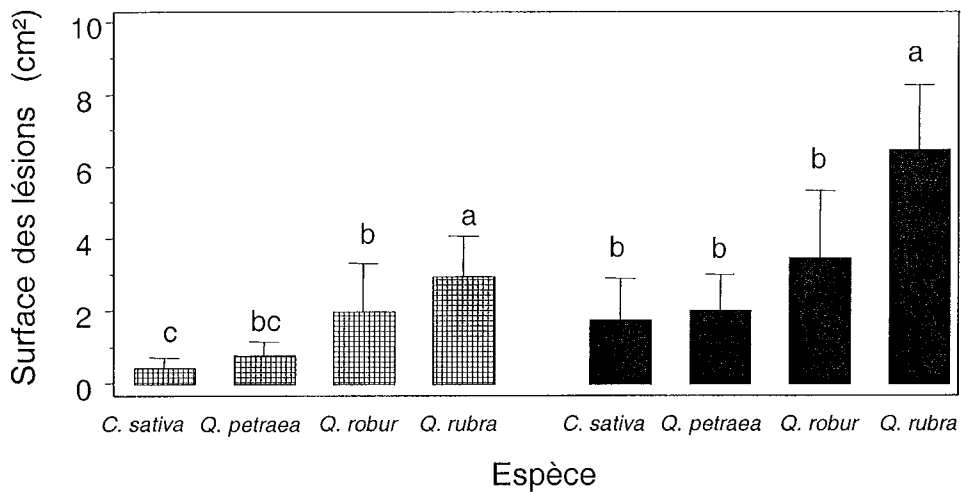
Le mode d'infection des hôtes par *C. fusipes* n'est pas connu. La dispersion se fait probablement essentiellement par basidiospores. En effet, il a été montré que deux arbres atteints, même séparés de quelques mètres, ne sont jamais infectés par le même genêt de *C. fusipes* (Marçais *et al.*, 1998b). Jusqu'à 6 genets différents ont pu être identifiés sur un même arbre. Ceci a été montré en utilisant comme outil la compatibilité somatique et des marqueurs moléculaires (région IGS de l'ADN ribosomique). Ces résultats corroborent sa distribution en forêt, souvent éparse, et non pas en foyer (Marçais *et al.*, 1998a). Il est fort probable que l'infection ait lieu par voie mycélienne suite à la germination de spores directement au contact des racines ou suite à leur germination dans le sol. Ce dernier mode d'infection a d'ailleurs été décrit à propos d'un autre pourridié, *Phaeolus schweinitzii* (Fr. : Fr.) Pat. (Barrett et Greig, 1984). La dispersion par basidiospores contraste avec le mode de dispersion d'autres pourridiés, tels que les Armillaires, *Heterobasidion annosum* sensu lato ou *Phellinus weirii* (Murr.) Gilb. qui se disséminent essentiellement par voie mycélienne suite à des contacts racinaires (Hansen et Hamelin, 1999).

*C. fusipes* se dissémine en premier lieu à la surface des racines, grâce à des structures mycéliennes ectotrophes (Figure 3), puis infecte le liber en différents points (Marçais et Delatour, 1996). Les lésions induites sont de couleur jaune à orange vif (Figure 3). Le mycelium est fréquent sous forme de petites palmettes blanches (Figure 3). L'attaque des parenchymes entraîne une réaction des tissus vivants se traduisant par une hypertrophie de ces tissus chez les chênes indigènes, le liber peut alors atteindre 3 à 5 cm d'épaisseur (Delatour et Guillaumin, 1984 ; Marçais *et al.*, 1999 ; Marçais et Caël, 2000). Le champignon peut être restreint au liber mais le plus souvent le cambium est atteint et le bois dégradé. *C. fusipes* est en effet un champignon dit de pourriture blanche, comme les Armillaires. Il dégrade préférentiellement la lignine. Bien que l'hôte semble incapable d'éliminer

**Tableau 1.** Sensibilité des chênes à *C. fusipes* à la suite d'inoculations (d'après Marçais *et al*, 1998a).

	<i>Quercus robur</i> 4 ans (serre)	<i>Quercus rubra</i> 2 ans (serre)	<i>Quercus robur</i> 120-160 ans (Haute-Saône)
Délais après inoculation	18 mois	14 mois	2.5 ans
Traitement	Témoin	Défolié <sup>(1)</sup>	
% infections réussies	100	100	50
Tailles moyennes des lésions induites (cm <sup>2</sup> )	22.6	11.4	4.9

(1) Jeunes plants défoliés totalement début Août, 2 ans de suite.



**Figure 5.** Sensibilité de 3 espèces de chênes et du châtaignier à *C. fusipes*, 20 mois après inoculation. ▨, lésion au niveau du cambium ; ■, lésion au niveau du liber. Les espèces avec la même lettre ne présentent pas de taille de lésions statistiquement différentes (d'après Marçais et Caël, 2000).



complètement l'agent pathogène, les lésions paraissent pouvoir être contenues et des réitérations de racines permettent de pallier partiellement la destruction du système racinaire (Figure 3). Une méthode simple d'évaluation de l'état des systèmes racinaires des arbres matures a été mise au point par Marçais *et al.* (1999). Elle repose sur un système de notation des racines maîtresses proches du collet de l'arbre. Une note d'infection variant de 0 (racine saine) à 4 (racine morte) est attribuée à chaque racine. La note de l'arbre correspond à la moyenne de la note des racines pondérée par leur diamètre. L'arbre est considéré comme fortement infecté lorsque cette note est supérieure à 2. Cette méthode a été validée en comparant la note attribuée à plusieurs arbres en place, aux dégâts quantifiés sur l'ensemble de leurs systèmes racinaires, après arrachage.

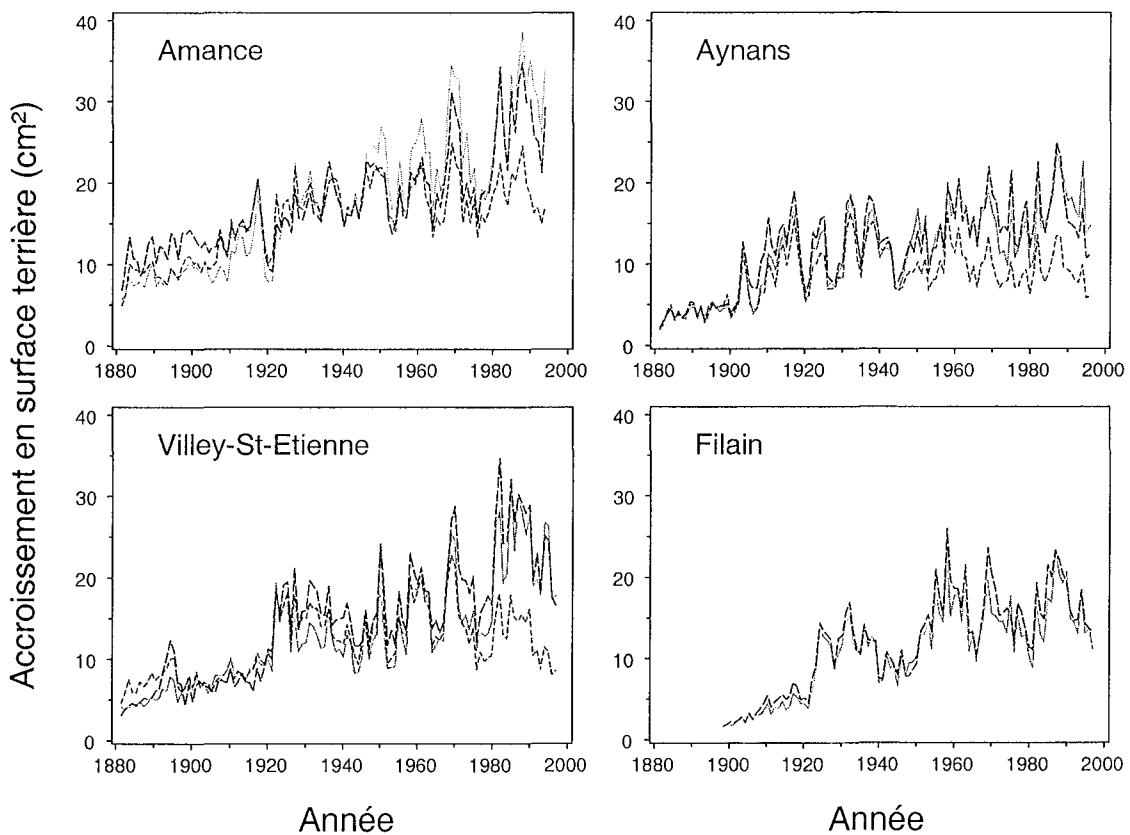
#### **1.3.4 Pouvoir pathogène**

Une technique d'inoculation artificielle par *C. fusipes* a été mise au point par Marçais et Delatour (1996). Elle consiste à apposer des bûchettes de noisetier colonisées par *C. fusipes* directement contre l'écorce, sans blessure, dans la zone du collet chez de jeunes plants ou sur les racines des arbres adultes. Grâce à cette technique, le pouvoir pathogène de *C. fusipes* a été étudié sur chênes pédonculés, rouges et sessiles et sur châtaigniers en conditions contrôlées sur de jeunes plants ainsi que sur arbres adultes (Marçais et Delatour, 1996 ; Marçais et Caël, 2000). Dans tous les cas, *C. fusipes* se comporte en parasite primaire, ne nécessitant pas l'affaiblissement préalable de son hôte pour induire des lésions significatives avec une fréquence élevée (Tableau 1). Le chêne pédonculé présentait une sensibilité assez forte au parasite et intermédiaire entre celle du chêne sessile, faiblement sensible, et celle du chêne rouge, fortement sensible (Figure 5). Le châtaignier, quant à lui, était encore moins sensible au parasite que le chêne sessile. Ces résultats concordent avec la répartition du parasite en forêt.

*C. fusipes* est un parasite qui se développe lentement et les dommages induits s'évaluent à long terme. Ainsi, lorsque des inoculations artificielles sont réalisées sur de jeunes plants de chênes, aucune mortalité ne survient après deux années, alors que d'autres pourridiés, tels qu'*A. ostoyae* (Romagn.) Herink. ou *A. mellea* sont à l'origine de mortalités dans les mêmes conditions sur leurs hôtes respectifs (Guillaumin et Lung, 1985 ; Rishbeth, 1982). De plus, un suivi sur plusieurs années de l'évolution d'infections naturelles sur arbres adultes dans deux peuplements de chênes rouges a permis d'évaluer le temps nécessaire à ce parasite pour infecter sévèrement un arbre sain. Cette période a été estimée à une trentaine d'années (Tableau 2)(Luis, 2001). Cette longue période correspond au 1/4 du temps de révolution du chêne pédonculé et au 1/3 de celui du chêne rouge, tous deux très sensibles au parasite.

**Tableau 2.** Nombre d'années nécessaires chez le chêne rouge pour passer d'un état sain (note d'infection de 0) à un état fortement infecté par *Collybia fusipes* (note d'infection de 2). D'après un suivi sur 6 années de la maladie dans deux peuplements de chênes rouges : Les Barres et Agre (d'après Luis, 2001)

(en années)	1 <sup>er</sup> quantile	Médiane	3 <sup>ème</sup> quantile
Barres	17	35	80
Agre	17	27	70



**Figure 6.** Accroissement de la surface terrière des arbres étudiés dans quatre peuplements de chênes pédonculés. Arbres non endommagés (—); arbres faiblement endommagés par *C. fusipes* (---); arbres fortement endommagés (-.-.) (d'après Marçais et Caël, 2001).

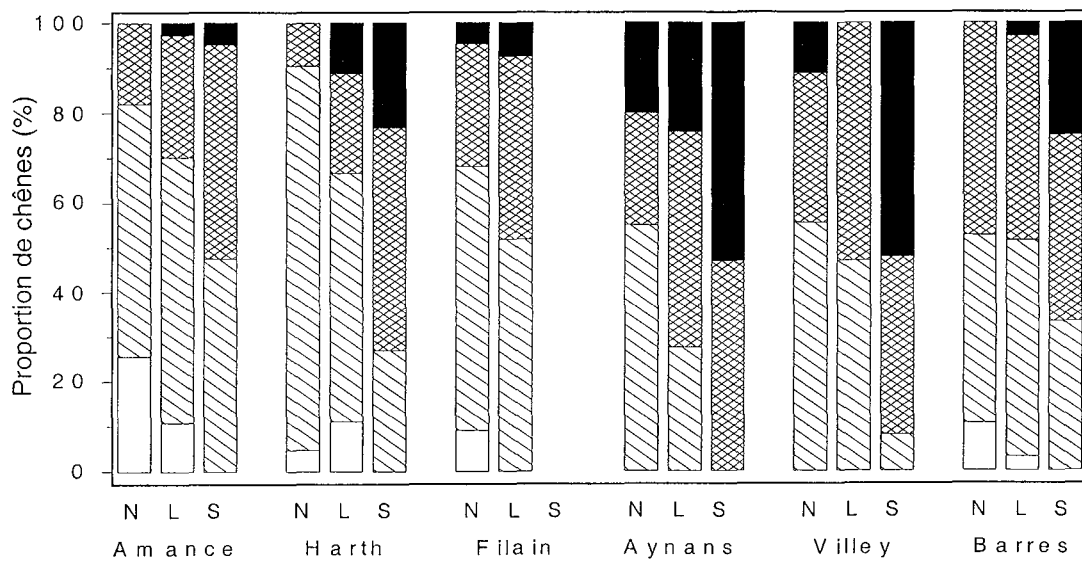
### 1.3.5 Nuisibilité

L'impact d'un pourridié en terme de nuisibilité peut classiquement être de trois types : perte de croissance, risques de chablis et dépérissement/mortalité. Cet impact a été étudié sur un échantillon de 430 arbres, dont le niveau d'infection a été déterminé préalablement, dans six peuplements (Marçais *et al.*, 2000).

L'impact de *C. fusipes* sur la croissance a été évalué dans 5 des 6 peuplements précédents (4 peuplements de chênes pédonculés et un de chênes rouges) (Marçais et Caël, 2001). Les chênes sévèrement infectés avaient une croissance faible depuis 15 à 50 ans selon le peuplement (Figure 6). Quel que soit le peuplement, une forte dégradation du système racinaire était associée à une réduction de l'accroissement en surface terrière de 30 à 50% dans les dix ans précédant l'étude. Cependant, dans tous les peuplements, les arbres faiblement infectés avaient un accroissement en surface terrière similaire à celui des arbres non infectés. Ceci pourrait laisser supposer que *C. fusipes* se développe lentement sur des arbres vigoureux et qu'elle n'affecte leur croissance que tardivement dans le processus infectieux. De plus, une autre expérimentation a permis de mettre en évidence que l'accroissement de chênes rouges, pendant une période de six ans, était significativement lié à leur niveau d'infection en début de période, avec des réductions de croissance du même ordre de grandeur que dans l'étude rétrospective précédente (Luis, 2001). Diverses études dendrochronologiques ont permis de démontrer que les arbres infectés par des pourridiés (*H. annosum*, *A. mellea* ou *Inonotus tomentosus* (Fr.) Teng.) avaient une croissance radiale d'autant plus réduite que les dégâts racinaires étaient importants (Froelich *et al.*, 1977 ; Hrib *et al.*, 1983 ; Lewis, 1997)

Le lien entre le niveau d'infection induit par *C. fusipes* et la probabilité de chablis a été étudié sur le même échantillon d'arbres (5 des 6 peuplements) suite à la tempête de décembre 1999. Il s'est avéré que le défaut d'enracinement provoqué par l'infection entraînait un risque surajouté de chablis surtout pour les arbres situés dans les parcelles dont le sol a une texture fine et où la profondeur d'enracinement n'est pas limitée. L'attaque des racines par le pourridié n'entraîne pas de risque accru de chablis lorsque les arbres ont déjà un défaut d'enracinement lié à la présence d'une couche de galets (sols alluviaux) (Marçais, 2001). De plus, il faut préciser que dans ces parcelles les arbres infectés dépérissent et présentent également moins de prise au vent.

Le lien entre l'état de dépérissement des chênes, évalué par la transparence du houppier, et le niveau d'attaque des systèmes racinaires par *C. fusipes* a aussi été étudié (Marçais *et al.*, 2000). Ce lien est apparu réel mais inconstant. En effet, l'état du houppier des arbres se dégrade toujours avec une sévérité croissante des attaques de *C. fusipes*. Toutefois, dans certains peuplements, on observe une faible dégradation du houppier sur les arbres fortement infectés (Amance et dans une moindre mesure, Barres ; Figure 7). Ces différences entre sites pourraient être expliquées par la nature plus ou moins filtrante des sols.



**Figure 7.** Relation entre l'infection par *C. fusipes* et l'apparence du houppier des chêne : (□) sain; (▨) légèrement dépérissant; (▩) modérément dépérissant; (■) sévèrement dépérissant. (N) chênes non infectés ; (L) chênes légèrement infectés ; (S) chênes sévèrement infectés (d'après Marçais *et al*, 2000).

#### 1.4 Vigueur de l'hôte et sensibilité aux pourridiés

Nous avons vu que le rôle de *C. fusipes* dans le dépérissement de Tronçais était mal compris. A-t-elle été une cause du dépérissement ou une conséquence (développement sur des arbres préalablement affaiblis) ? Cette question est très générale et se pose pour la plupart des pourridiés.

Le terme de vigueur est employé pour décrire la vitalité globale d'un arbre. La vigueur dépend à la fois des caractéristiques génétiques intrinsèques de l'arbre et des conditions écologiques auxquelles il est soumis (Wargo et Harrington, 1991). Elle peut être évaluée en caractérisant notamment le statut social de l'arbre (dominant, co-dominant ou dominé), la vitesse de croissance ou l'état du houppier (Landmann, 1988 ; Wargo et Harrington, 1991). L'attaque d'un arbre par un agent pathogène est fréquemment considérée comme le symptôme d'une baisse de vigueur de l'hôte. Or, les relations hôte-parasite ne sont pas aussi simples.

Les pourridiés ont souvent été considérés comme des parasites de faiblesse, uniquement capables d'infecter des arbres de moindre vigueur. Cette conception trouvait notamment son origine dans le fait que les Armillaires, largement étudiées, étaient historiquement considérées comme tels. En fait, la compréhension des relations existant entre vigueur de l'hôte et pouvoir pathogène des Armillaires a été profondément gênée par le fait qu'elles ont été considérées comme appartenant à une seule espèce, *A. mellea*, jusque dans les années 1970. La distinction entre les différentes espèces n'a été faite que dans les années 1970 par Romagnesi (1973), sur la base de critères morphologiques, puis par Korhonen (1978) sur la base de critères d'inter-fertilité. Depuis, il a été démontré notamment grâce à des inoculations artificielles que certaines espèces, comme *A. gallica* ou *A. calvegens* Bérubé & Dessureault sont de véritables parasites secondaires, incapables d'infecter un hôte vigoureux (Redfern, 1978 ; Guillaumin et Berthelay, 1981 ; Rishbeth, 1982 ; Davidson et Rishbeth, 1988). Cependant, le pouvoir pathogène d'autres espèces reste encore difficile à définir. Ainsi, certaines expériences d'inoculations montrent qu'*A. mellea* et *A. ostoyae* peuvent être très agressives sur certaines espèces d'arbres, induisant des taux de mortalité importants sur des hôtes vigoureux (Desray *et al*, 1998 ; Lung-Escarmant *et al*, 2002). D'autres expériences d'inoculations montrent que, sur des espèces différentes d'arbres, ces mêmes espèces d'Armillaire peuvent, tout en restant des parasites primaires, se montrer plus agressives sur des hôtes affaiblis par une sécheresse, un faible éclaircissement ou une déficience en azote (Anselmi et Puccinelli, 1993 ; Entry *et al*, 1991a). De telles différences d'expression de pouvoir pathogène selon l'espèce d'arbre attaquée entretiennent une certaine confusion à propos de l'agressivité des pourridiés. Ainsi, *Phellinus weirii* a longtemps été considéré comme un parasite de faiblesse attaquant différentes espèces de conifères, spécifiquement dans les peuplements vieillissants où la disponibilité en azote est faible et la vigueur des arbres moindre. Or, il a été démontré, grâce à des inoculations en milieu naturel au sein et hors des sites dits 'à risques' que le succès d'inoculation et l'importance des lésions induites n'étaient pas liés à la vigueur

des hôtes (Hansen et Goheen, 2000). Comme beaucoup d'autres pourridiés primaires *P. weirii* se développe très lentement et la maladie se retrouve de ce fait beaucoup plus fréquemment sur arbres âgés.

En forêt, les arbres peuvent être soumis à un certain nombre de stress, d'origine biotique (défoliation par insectes ...) ou abiotique (disponibilité en eau, nutriments, lumière...). La réponse physiologique à ces stress a un coût métabolique qui peut se traduire par une perte de vigueur. L'allocation des réserves est souvent perturbée. Au niveau des racines, les changements en quantité et qualité des hydrates de carbone peuvent favoriser les pourridiés. Ainsi, Wargo (1972, 1984) démontre que, suite à une défoliation, la teneur en amidon des racines diminue au profit de la teneur en sucres solubles, particulièrement celle du glucose. Il fait l'hypothèse que de tels changements pourraient être bénéfiques aux espèces d'Armillaires se comportant en parasites secondaires. En effet, leur croissance *in vitro* ainsi que leur capacité à dégrader la lignine est stimulée en présence de glucose (Garraway, 1975 ; Entry *et al.*, 1993). Au contraire, chez *C. fusipes*, on observe la tendance inverse, puisque de jeunes plants défoliés pendant deux années consécutives ont présenté une sensibilité inférieure à celle des témoins vigoureux (Tableau 1) (Marçais et Delatour, 1996). Cette observation montre que *C. fusipes* ne se comporte pas en parasite secondaire. De plus, un suivi sur plusieurs années des infections naturelles sur chênes rouges a mis en évidence que le développement du pourridié, évalué par l'évolution des lésions et la fréquence de nouvelles infections, n'était pas lié à la vigueur des arbres, évaluée par la croissance durant la période d'étude (Luis, 2001).

La disponibilité en azote, souvent limitante dans les peuplements forestiers, peut être à l'origine d'une baisse de vigueur des arbres pouvant les rendre plus sensibles aux attaques de pourridiés. L'expérimentation de Entry *et al.* (1991a) va effectivement dans ce sens puisque les infections de jeunes plants par *A. ostoyae* sont favorisées lors de traitements carencés en azote. Cependant, dans plusieurs autres cas, la fertilisation azotée, en stimulant la croissance et en induisant une augmentation de la teneur en sucres solubles ainsi qu'une diminution de la teneur en composés phénoliques de défense des racines, peut également favoriser l'infection et l'extension des lésions induites par *H. annosum* ou *A. ostoyae* (Dimitri et Shuman, 1989 ; Wahlström et Barklund 1994 ; Entry *et al.*, 1991b).

Les épisodes de sécheresse, en altérant l'activité photosynthétique et donc la disponibilité en assimilats, peuvent être à l'origine d'une baisse de vigueur des hôtes. Anselmi et Puccinelli (1993) ainsi que Parks *et al.* (1994), suite à des inoculations artificielles par différentes espèces d'Armillaires, observent un pourcentage de mortalité plus élevé chez les plants soumis à la sécheresse. Cependant, la sensibilité des hôtes aux agents de pourridiés n'est pas toujours accrue en situation de déficit hydrique. Ainsi, *A. ostoyae* est apparue moins agressive sur de jeunes pins maritimes soumis à la sécheresse que sur témoins bien alimentés en eau (Lung-Escarmant *et al.*, 2002). Concernant *H. annosum*, toujours par le biais d'inoculations artificielles sur de jeunes plants, on observe une sensibilité accrue au parasite

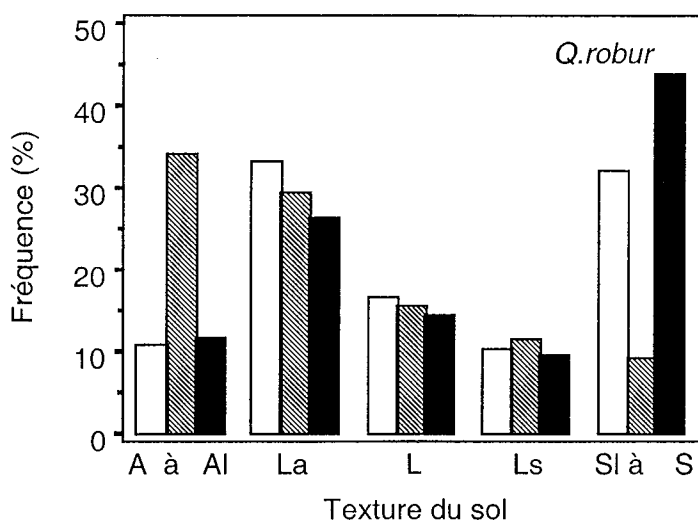
jusqu'à un certain seuil. Ainsi lorsque le déficit hydrique est trop prononcé, les taux d'infection et l'extension du parasite sont réduits (Wahlström et Barklund, 1994).

### **1.5 Impact et distribution des pourridiés en relation avec les facteurs édaphiques**

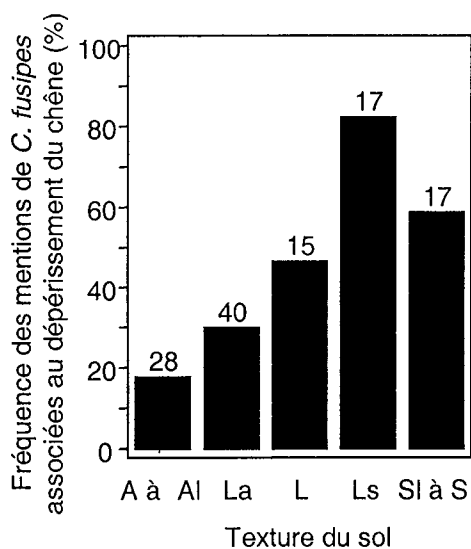
Nous avons vu que l'impact de *C. fusipes* en terme de dépérissement, pour des niveaux d'infections élevés et équivalents, variait en fonction des parcelles étudiées. Ces différences pourraient être liées à la nature du sol. En effet, dans la littérature, l'impact des pourridiés en terme de dégâts racinaires, fréquence de maladie ou mortalité est souvent corrélé avec les facteurs du sol, tels que le pH, l'humidité ou la texture ; ces facteurs édaphiques étant d'ailleurs souvent liés et cités en association. La teneur en sable du sol est sans aucun doute le facteur édaphique le plus souvent mentionné en association aux problèmes induits par des pourridiés tels qu'*I. tomentosus*, *H. annosum*, *A. ostoyae* ou *Phellinus noxius* (Corner) Cunn. Dans les sols légers à textures sableuses grossières, les études rapportent une prévalence plus élevée des pourridiés (Froelich *et al.*, 1966 ; Côté et Dessureault, 1994 ; Bernier et Lewis, 1999), un nombre de mentions plus élevées (Blodgett et Worrall, 1992 ; Termorshuizen et Arnolds, 1994 ; Chang et Yang, 1998 ; McLaughlin, 2001) ou l'induction de dommages plus sévères, en terme d'infections racinaires, de dépérissements ou de mortalité (Alexander *et al.*, 1975 ; Whitney, 1984 ; Baker *et al.*, 1993 ; Wienscyk *et al.*, 1997 ; Mallett et Maynard, 1998). Blenis *et al.* (1989), lors d'inoculations artificielles de terrain, observent que *A. ostoyae* survit mieux dans la bûchette servant d'inoculum dans les sols à textures grossières et suggèrent que cet effet est lié à la bonne disponibilité en oxygène de ce type de sols. L'effet de la texture est souvent indissociable du régime hydrique des sols. Ainsi McLaughlin (2001) et Whitney (1984) mentionnent une distribution préférentielle d'*A. ostoyae* sur des sols à texture sableuse grossière, qui sont aussi des sols secs à frais et à drainage rapide. Contrairement à *A. ostoyae*, *A. mellea* et *A. gallica* semblent être plus fréquemment mentionnées sur les sols à texture fine (Termorshuizen et Arnolds, 1994).

Cruickshank *et al.* (1997) observent une distribution plus marquée de *A. ostoyae* sur sols plutôt secs, alors qu'*A. sinapina* se retrouve dans des sols plus humides. Cependant, aucune de ces deux espèces ne se retrouve sur sols ennoyés ou très secs. L'anoxie rencontrée dans les sols gorgés d'eau est mentionnée comme un élément défavorisant. Le caractère défavorable de la saturation en eau du sol sur l'incidence d'*I. tomentosus* et d'*H. annosum* a également été rapporté (Redfern, 1998 ; Bernier et Lewis, 1999). Pourtant, dans certain cas *H. annosum* peut être favorisé par la présence d'une nappe temporaire, celle-ci accentuant l'enracinement horizontal, favorisant ainsi les contacts racinaires et donc la propagation de l'agent pathogène d'arbre en arbre (Redfern, 1983).

Le pH du sol est également corrélé aux dommages induits par plusieurs pourridiés et à leur incidence. Ainsi, *A. ostoyae* semble induire plus de mortalité et être plus fréquemment



**Figure 8.** Distribution des mentions de la base de donnée du DSF et du réseau Européen, concernant *Quercus robur*, en fonction de différentes catégories de textures du sol. Réseau européen (□) ; mentions de la base DSF concernant des problèmes autres que *C. fusipes* (▨), concernant *C. fusipes* (■). La texture dominante correspond à A : argile, L : limon or S : sable et la texture secondaire à a : argile, l : limon or s : sable (cf. Tableau 2, Publication I).



**Figure 9.** Fréquence des mentions de *Collybia fusipes* associées avec des problèmes de dépérissement du chêne. A, argile ; Al, argile limoneuse ; L, limon ; Ls, limon sableux ; Sl, sable limoneux ; S, sable. Le nombre de mentions à partir desquelles les fréquences sont calculées est donné au dessus des barres (Publication I).



mentionnée sur les sols à pH acide ; ceux ci sont souvent des sols à texture sableuse (Redfern, 1978 ; Rishbeth, 1982 ; Blodgett et Worrall, 1992 ; Termorshuizen et Arnolds, 1994). Le caractère favorable pour les pourridiés des sols à pH bas pourrait également être dû à leur faible disponibilité en nutriments ou en azote (Shields et Hobbs, 1978 ; Singh, 1983).

## **1.6 Objectifs du travail de thèse**

Il a été montré que *C. fusipes* est un champignon largement distribué en forêt (Marçais *et al.*, 1998a). Pourtant, comme nous l'avons vu, elle n'est associée que ponctuellement à des problèmes de dépérissement de chênes (Marçais *et al.*, 2000). Ceci semble pouvoir être relié à la nature du sol .

L'objectif de ce travail de thèse était de définir les situations écologiques où *C. fusipes* pose des problèmes sur chênes pédonculés, en caractérisant notamment les facteurs édaphiques et sylvicoles liés à sa distribution et à son impact en terme de dépérissement, puis de comprendre par quels mécanismes ces facteurs agissaient.

Deux approches ont plus particulièrement été développées :

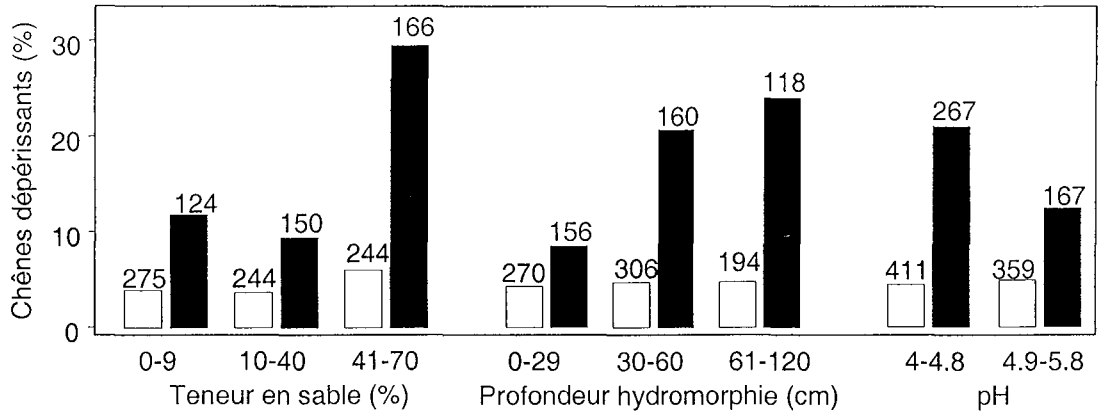
- la première visait à caractériser, par le biais d'observations de terrain, le type de sol associé à sa distribution et à son impact en terme de dépérissement.
- la deuxième visait à définir si les caractères édaphiques favorables à la maladie définis par la première approche pouvaient augmenter la sensibilité du chêne pédonculé au parasite, ou si au contraire, leur action se situait directement sur le champignon. Cette approche a été abordée en inoculant le parasite en forêt et en conditions contrôlées.

## **2 Relations entre *C. fusipes*, dépérissement et facteurs édaphiques**

C'est la première des approches décrites dans les objectifs qui sera développée ici.

### **2.1 Enquête à large échelle (Publication I)**

Une analyse de la base de données du DSF nous a permis de définir, à large échelle, la distribution de *C. fusipes* et son association avec des phénomènes de dépérissement dans les chênaies en fonction des textures de sols. Les caractéristiques des peuplements de chênes de la base DSF où *C. fusipes* a été signalée ont d'abord été comparées aux caractéristiques de tous les peuplements de chênes répertoriés pour des problèmes phytosanitaires autres que *C. fusipes*, puis à celles des peuplements de chênes de la partie française du réseau européen de suivi des dommages forestiers.



**Figure 10.** Pourcentage de chênes pédonculés dépérissants pour différentes catégories de teneurs en sable du sol, de profondeur de l'hydromorphie (traces reflétant le niveau d'engorgement du sol par l'eau) ou de pH. Chênes sans signes extérieurs d'infection par *C. fusipes* (□) et chênes avec carpophores ou pseudorhizes de *C. fusipes* (■). La quantité de chênes dans chaque catégorie est donnée au-dessus des barres (Publication II).

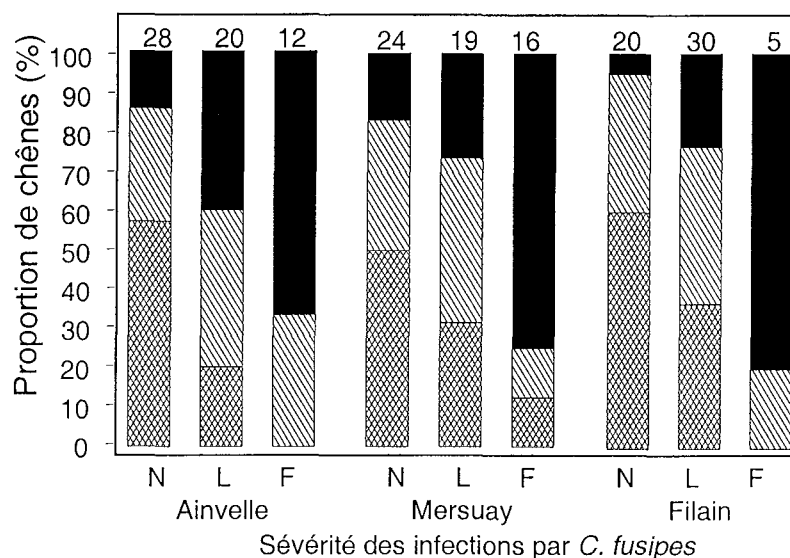
Les textures de sols des mentions de la base DSF où *C. fusipes* était associée à un dépérissement de chêne ont ensuite été comparées à celles où *C. fusipes* n'était pas mentionnée en association avec un dépérissement. Nous avons aussi réalisé une enquête spécifique sur 30 parcelles du nord-est de la France pour caractériser le sol des peuplements de chênes où *C. fusipes* est associée à un dépérissement des arbres. Sur chaque parcelle, un groupe de chênes pédonculés contigus a été sélectionné. L'état de dépérissement des houppiers a été répertorié ainsi que la présence de signes d'infection par *C. fusipes* (carpophores et/ou pseudorhizes). Les caractéristiques du sol, telles que la profondeur d'apparition de l'hydromorphie (traces liées à la mobilité du fer) correspondant au niveau supérieur d'engorgement du sol par l'eau, la nature d'un plancher susceptible de limiter l'enracinement (couche de galets, argile indurée, fragipan) ont été notées. Les teneurs en azote et carbone, la capacité d'échange cationique, le pH et la texture ont été analysés en laboratoire après prélèvement d'échantillons de sol.

### **2.1.1 Nouveaux apports**

Nous avons observé que *C. fusipes* est plus fréquemment mentionnée dans les sols à texture grossière, limono-sableuse à sableuse (Figure 8). De plus, les deux méthodes utilisées ont clairement mis en évidence que l'impact de *C. fusipes* en terme de dégradation du houppier des arbres infectés est également lié à la teneur en éléments grossiers du sol (Figures 9 et 10). La dégradation du houppier des arbres atteints par *C. fusipes* s'aggrave également quand le pH diminue et quand les traces d'hydromorphie apparaissent plus profondément (sols moins engorgés). Texture, pH du sol et sévérité d'engorgement étaient fortement corrélés entre eux et la part prise par chacun dans la dégradation du houppier des arbres atteints est difficile à mettre en évidence. Cependant, c'est la teneur en sable du sol qui semble la mieux corrélée avec le dépérissement des arbres infectés. L'estimation du risque relatif de dépérissement du chêne en fonction de la teneur en sable du sol montre que les chênes visiblement infectés par *C. fusipes* ont environ 2 fois plus de risques de dépérir que les chênes sans signes extérieurs d'infection (carpophores ou pseudorhizes) lorsque la teneur en sable ne dépasse pas 10%, alors que ce risque atteint 6-7 lorsque la teneur en sable dépasse 60%.

### **2.1.2 Discussion autour de la méthodologie employée**

Dans l'étude de la distribution de *C. fusipes* à partir de la base DSF, nous avons pris comme image de la chênaie française, soit les mentions de la base DSF portant sur un problème autre que *C. fusipes*, soit les placettes de chênes du réseau européen. La première solution a l'avantage de fournir une comparaison à partir de données équivalentes, puisque les caractéristiques des sites sont mesurées de la même façon. Cependant l'image de la forêt française fournie peut être biaisée puisque cette base de données n'est pas élaborée systématiquement mais seulement à partir de signalements de problèmes phytosanitaires. Il faut toutefois souligner que la grosse majorité des problèmes rapportés correspond à des



**Figure 11.** Relations entre l'infection par *C. fusipes* et le niveau de dépérissement du houppier chez le chêne pédonculé. Niveau d'infection N, correspondant à un arbre non infecté ayant une note de 0 à 0.3, L correspondant à un arbre légèrement infecté ayant une note de 0.3 à 2 et F correspondant à un arbre fortement infecté ayant une note supérieure à 2. (XXXXXX) houppier sain ; (XXXXXX) houppier modérément dépérissant ; (■■■■) houppier dépérissant. Le nombre d'arbres dans chaque catégorie est donné au-dessus des barres (Publication II).

**Tableau 3.** Relation entre le pourcentage de chênes dépérissants et le niveau d'infection par *C. fusipes*, profondeur de l'hydromorphie (traces reflétant le niveau d'engorgement du sol par l'eau), profondeur d'un lit de galets et rapport teneur en sable/teneur en argile (régression logistique).

Parcelle	Ainvelle			Mersuay			Filain			
	Source	Ddl	X <sup>2</sup>	Pr>X <sup>2</sup>	Ddl	X <sup>2</sup>	Pr>X <sup>2</sup>	Ddl	X <sup>2</sup>	Pr>X <sup>2</sup>
Infection par <i>C. fusipes</i>		1	5.30	<b>0.021</b>	1	2.81	0.094	1	8.71	<b>0.003</b>
Profondeur hydromorphie		1	3.46	0.063	1	3.54	0.060	1	0.40	0.525
Profondeur galets		1	0.31	0.575	1	0.10	0.746	-	-	-
Sable / Argile		1	2.17	0.141	1	1.31	0.252	-	-	-

défoliations par les insectes, des infections par l'oïdium ou des dégâts de gels, c'est à dire des problèmes peu connus pour dépendre de la station. La base de données du réseau européen représentait quant à elle une meilleure image de la chênaie française puisqu'elle est établie d'après un maillage régulier. Malheureusement, il est difficile de comparer les textures rapportées par observation de terrain dans la base DSF et celles mesurées par analyse de granulométrie dans le réseau européen. Leur comparaison en terme de distribution en fonction des textures donne toutefois des résultats similaires.

## **2.2 Approche à l'échelle de la parcelle (Publication II)**

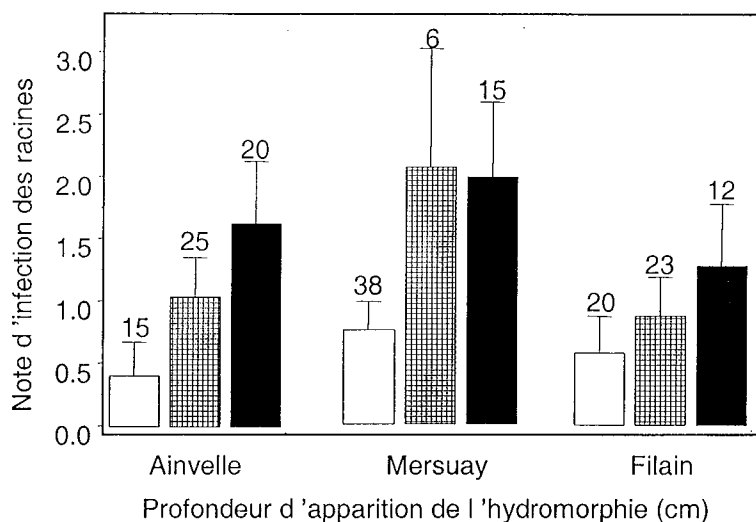
Les situations où *C. fusipes* a été associée à des problèmes de dépérissement de chênes sont des stations avec un sol à texture grossière où la sévérité de l'engorgement peut limiter l'enracinement des arbres. Il s'agit souvent de situations alluviales. Dans ces types de sol, la présence d'un lit de galets peut aussi représenter une limite importante pour l'enracinement. Ce genre de sols est défavorable aux chênes pédonculés car l'alimentation en eau ou en nutriments peut y faire défaut. D'autres facteurs biotiques, tels que les *Phytophthora*, peuvent également y être présents et représenter un danger pour la vigueur des arbres. Ces facteurs pourraient donc également être à l'origine du dépérissement observé.

Le but de cette étude était donc de chercher à définir la part prise par *C. fusipes* dans le phénomène de dépérissement, en cherchant lequel de ces facteurs, biotiques (*Phytophthora* ou *C. fusipes*) ou abiotiques (édaphiques essentiellement) pouvait être le mieux corrélé à la dégradation du houppier des arbres.

Cette étude a été focalisée sur 3 parcelles du nord-est de la France où la Collybie semblait importante : Ainvelle, Filain, Mersuay. Sur chacune des parcelles, entre 55 et 60 chênes pédonculés ont été sélectionnés sur la base de la transparence de leur houppier, afin d'obtenir la même proportion d'arbres sains, modérément dépérissants et fortement dépérissants. Le niveau d'infection par *C. fusipes* de leur système racinaire a été évalué. Une carotte de sol a été prélevée à la base de chaque arbre et la profondeur d'apparition de l'hydromorphie a été mesurée. De plus, à Ainvelle et Mersuay nous avons mesuré la profondeur d'apparition d'un plancher de galets susceptible de limiter l'enracinement. Huit échantillons de sol ont également été prélevés à Ainvelle et Mersuay afin d'évaluer la variabilité des textures au sein des placettes. Dans chacune des parcelles, la présence de *Phytophthora* dans le sol au pied des arbres a été évaluée par piégeage.

### **2.2.1 Nouveaux apports**

La dégradation du houppier est liée à l'hydromorphie et augmente lorsque les signes d'engorgement du sol par l'eau apparaissent plus profondément. Le lien entre dégradation du houppier et profondeur du plancher de galets est inconstant, le houppier étant plus dégradé lorsque celui-ci est plus proche de la surface uniquement dans la parcelle de Mersuay. De



**Figure 12.** Note moyenne d'infection des racines par *C. fusipes* dans les trois parcelles étudiées en fonction des catégories d'engorgement du sol par l'eau, évaluées par la profondeur d'apparition de l'hydromorphie : (□) 0-40 cm ; (▨) 41-60 cm ; (■) >60 cm. L'intervalle de confiance des moyennes est indiqué pour chaque catégorie. Les effectifs sont donnés au dessus des barres (Publication II).

**Tableau 4.** Relation entre le niveau d'infection par *C. fusipes* la profondeur de l'hydromorphie (traces d'engorgement du sol par l'eau), la profondeur d'apparition d'un lit de galets et le rapport teneur en sable/teneur en argile (analyse de variance).

Plot	Ainvelle				Mersuay				Filain				
	Source	Ddl	Carré moyen	F	P > F	Ddl	Carré moyen	F	P > F	Ddl	Carré moyen	F	P > F
Modèle		3	6.43	11.14	< 0.001	3	5.86	9.36	< 0.001	1	8.55	10.8	0.002
Erreur		56	0.57	-	-	55	0.62	-	-	53	0.79	-	-
Profondeur hydromorphie		1	13.23	22.91	< 0.001	1	6.47	10.32	0.002	1	8.55	10.8	0.002
Profondeur galets		1	1.37	2.37	0.129	1	0.39	0.63	0.433	-	-	-	-
Sable / Argile		1	0.61	1.06	0.307	1	0.01	0.02	0.888	-	-	-	-

même à Mersuay, le houppier apparaît plus dégradé lorsque le rapport sable/argile augmente (Likelihood  $X^2=4.12$ ,  $df=1$ ,  $p=0.043$ )<sup>1</sup>. Cependant, un des nouveaux apports de l'étude a été de montrer que dans la majorité des parcelles étudiées, la sévérité des attaques par *C. fusipes* est mieux corrélée aux dépérissements de chênes que les autres facteurs étudiés (Figure 11, Tableau 3). A Mersuay, c'est l'hydromorphie qui semble la mieux corrélée, cependant lorsque le rapport sable/argile n'est plus entré comme variable indépendante dans le modèle statistique, c'est l'infection par la Collybie qui présente la meilleure corrélation au dépérissement (cf. Tableau V, Publication II). Par contre, dans les deux parcelles où des *Phytophthora* sont présents, leur présence dans le sol au pied des arbres n'est pas corrélée à l'état de dépérissement du houppier.

De plus, nous avons confirmé le résultat de Piou *et al.* (2002) qui montrent que la gravité des infections augmente avec la profondeur d'apparition de l'hydromorphie. A Mersuay et à Ainvelle, elle augmente également avec la teneur en sable du sol (l'analyse de variance donne respectivement :  $F= 15.02$  et  $3.93$ ,  $df =1$ ,  $P < 0.001$  et  $P= 0.052$ ). Cependant, la profondeur d'apparition de l'hydromorphie est la mieux corrélée avec la sévérité des attaques du système racinaire par la Collybie (Figure 12, Tableau 4). Aucun lien significatif n'a pu être mis en évidence entre la gravité des infections et la profondeur d'apparition du plancher ou la présence du *Phytophthora*.

### **2.2.2 Discussion autour de la méthodologie employée**

La mise en évidence des dommages induits par *C. fusipes* est assez facile du fait du développement lent de l'agent pathogène et donc du caractère permanent des symptômes racinaires. Ceci présente en effet un avantage en comparaison avec des agents pathogènes qui se développent de façon sporadique, tels que l'oïdium ou le *Phytophthora*, dont la présence et les dommages peuvent être difficiles à mettre en évidence. Cela dit, l'évaluation des dommages, bien que facilitée par la méthode d'observation des racines maîtresses développée par Marçais *et al.* (1999), reste quand même une méthode lourde puisque cela nécessite notamment de creuser pour avoir accès aux symptômes, ce qui peut limiter son application à large échelle.

### **2.3 Discussion générale**

Le caractère favorable des textures grossières et le caractère défavorable de l'engorgement des sols par l'eau sur la distribution et l'impact de *C. fusipes* que nous avons mis

---

<sup>1</sup> Comme les facteurs édaphiques étaient très corrélés nous avons choisi de ne pas faire figurer dans la publication II l'effet texture du sol. De plus ce facteur n'avait pas été évalué à la base de tous les arbres.

en évidence ici, se retrouve chez un bon nombre de pourridiés, tels qu'*A. ostoyae*, *I. tomentosus*, *H. annosum* ou *P. noxius*. Ces caractères ont en effet été liés à leur distribution, et à leur impact en termes de dommages racinaires, dépérissements et/ou mortalité (cf. § 1.5). Nous avons mis en évidence que *C. fusipes* n'était pas associée à une forte dégradation du houppier des chênes pédonculés dans les sols à textures fines, à fort engorgement ou à pH élevé. Cependant il faut mentionner que même dans ces situations, de fortes infections par *C. fusipes* sont liées à de fortes réductions de croissance de l'hôte. Ceci est indépendant du type de sols (Marçais et Caël, 2001).

Comme nous l'avons déjà souligné, les stations où *C. fusipes* pose des problèmes de dépérissement correspondent à des stations où le chêne pédonculé n'est pas à sa place. On peut donc faire l'hypothèse que la Collybie s'y développe car les chênes affaiblis par les conditions inadéquates sont plus sensibles au parasite. Toutefois, nos données ne supportent que partiellement cette hypothèse. En effet, les dépérissements ont souvent été mentionnés sur des sols à engorgement temporaire ou des sols sableux épais (Delatour, 1983 ; Becker et Levy, 1982 ; Oosterbaan et Nabuurs, 1991 ; Landmann *et al.*, 1993 ; Thomas *et al.*, 2002). Dans le premier cas, une des raisons invoquées était que la nappe d'eau, en limitant l'enracinement des chênes en profondeur, pouvait les rendre plus sensibles à la sécheresse. La présence d'une couche de galets limitant l'enracinement des arbres peut jouer le même rôle. Dans le second cas, c'est la moindre disponibilité en eau des sols à nature filtrante qui était incriminée. Pourtant, dans les parcelles que nous avons étudiées, ce sont plutôt les chênes dont l'enracinement n'est pas limité par une nappe d'eau superficielle qui se font infecter par la Collybie et il n'y a pas vraiment de lien entre le niveau d'infection par la Collybie et la profondeur du blocage de l'enracinement par la couche de galets. D'autre part, les infections par la Collybie peuvent être sévères même dans les sols présentant une bonne réserve utile en eau (cas de Filain) ou une bonne fertilité (cas de Mersuay et Filain). Une autre hypothèse peut être avancée, selon laquelle le chêne pédonculé présente une moindre tolérance à la maladie dans les sols à texture sableuse. En effet, la destruction progressive et lente des systèmes racinaires pourrait entraîner une diminution accrue de l'accessibilité à l'eau et aux nutriments, déjà réduite dans les sols sableux, et entraîner à long terme le dépérissement. En effet, Marçais *et al.* (2000) ont observé que des chênes fortement infectés par *C. fusipes* ne montraient pas de houppiers dégradés lorsque le sol était riche et à forte réserve utile en eau et qu'il ne présentait pas de limites à l'enracinement. Cette hypothèse permet de bien expliquer la liaison entre Collybie et dépérissement mais pas la distribution préférentielle de *C. fusipes* dans les sols à textures grossières.

Dans les sols à textures grossières, les chênes infectés par *C. fusipes* présentent des houppiers plus dégradés que dans les sols à texture fine. Ils sont donc plus facilement repérés et éliminés par les forestiers et l'on peut supposer que cela limite l'accumulation au cours du temps d'arbres infectés sur ce type de sols. Ainsi la fréquence importante des mentions de



*C. fusipes* dans les sols à texture grossières traduit probablement une incidence (nombre de cas d'infection par unité de temps) plus élevée de la maladie dans ce type de sol.

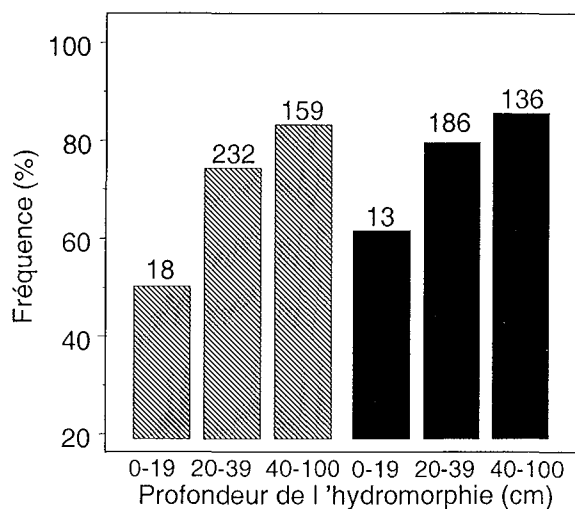
La distribution préférentielle de *C. fusipes* dans les sols à textures grossières pourrait être liée à un effet direct des conditions édaphiques sur le parasite. Ces conditions pourraient notamment intervenir en favorisant son maintien au sein de l'écosystème ou son pouvoir pathogène. Cette hypothèse est d'autant plus plausible, que *C. fusipes* se dissémine en surface des racines par le biais de mycélium ectotrophes, avant d'infecter le liber en différents points. Elle se situe donc à l'interface sol/racine pendant une période prolongée et pourrait donc être plus particulièrement sensible aux conditions du sol. De même, la dispersion de *C. fusipes* se faisant essentiellement par les basidiospores, on peut imaginer que les conditions du sol peuvent jouer un rôle important sur leur germination ou leur migration jusqu'aux racines. Ainsi, plusieurs études ont mis en évidence un impact direct des conditions édaphiques sur les pourridiés. Blenis *et al.* (1989), lors d'une expérimentation d'inoculation en milieu naturel ont mis en évidence un effet direct et favorable des textures sableuses sur la survie d'*A. ostoyae* dans l'inoculum. Alexander *et al.* (1975) ont montré que les conidiospores d'*H. annosum* migraient plus profondément dans les sols à textures sableuses. Les possibilités d'atteindre les racines y étaient donc accrues, ce qui pouvait partiellement expliquer sa fréquence plus particulièrement importante dans ce type de sols.

Il est important de souligner que ces trois études de terrain mettent uniquement en évidence des liens de corrélation. Elles ne permettent pas d'affirmer que *C. fusipes* est la cause du dépérissement du chêne pédonculé dans les sites à risques. Et ceci est d'autant plus vrai que ces observations sont faites à un moment défini dans le temps et ne prennent pas en compte la dynamique de l'infection. Il n'est pas possible de savoir quel est le phénomène qui intervient le premier chronologiquement, l'infection par la Collybie ou l'affaiblissement des arbres. L'accès à la dynamique du phénomène est possible par un suivi de terrain à long terme. Ceci a été effectué sur 134 chênes rouges situés dans 2 peuplements différents (Luis, 2001). Le niveau d'infection a été évalué deux fois sur chaque arbre à six ans d'intervalle, ce qui a permis d'estimer la vitesse d'évolution des lésions et l'incidence de la maladie. Ces paramètres ont notamment été mis en lien avec des données édaphiques et de vigueur. De plus, la mesure du niveau d'infection oblige à creuser et donc à déstructurer le milieu dans lequel évolue le parasite, ce qui pourrait induire un biais sur l'évolution de la maladie.

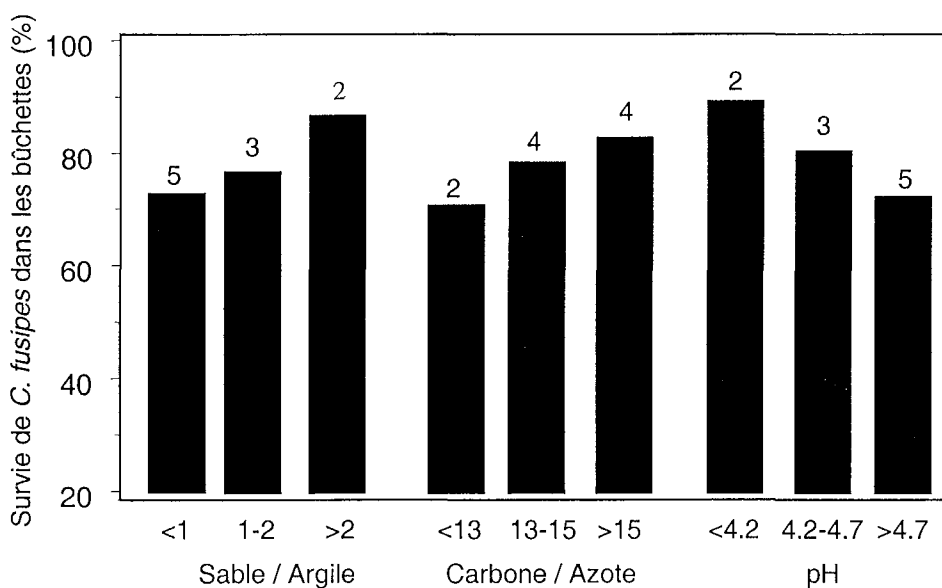
Pour avoir accès à la dynamique de la maladie nous avons utilisé une autre approche en inoculant le parasite sur des arbres adultes et des jeunes plants.

### **3 Sensibilité du chêne pédonculé à *C. fusipes* dans les stations à risques**

Dans cette partie, c'est la deuxième approche des objectifs de la thèse qui sera abordée.



**Figure 13.** Survie de *C. fusipes* dans les bûchettes de noisetier (▨) et efficacité d'infection (■), calculée à partir des chênes pour lesquels *C. fusipes* était restée vivante dans la bûchette, en fonction de la profondeur d'hydromorphie (traces reflétant le niveau d'engorgement du sol par l'eau). La quantité de bûchettes ayant servi d'inoculum ainsi que la quantité de bûchettes où *C. fusipes* était vivante est donnée au-dessus des barres (Publication III).



**Figure 14:** Pourcentage de bûchettes où *C. fusipes* a survécu en fonction de différents niveaux du ratio sable/argile, du pH et du ratio carbone/azote. La quantité de placettes dans chaque catégorie est donnée au-dessus des barres (Publication III).

Nous venons de voir que les stations à risques où *C. fusipes* a un impact accru correspondent à des stations dont les sols présentent des textures grossières, un faible niveau d'engorgement et un pH bas. Nous avons cherché à mieux comprendre si la sensibilité du chêne pédonculé à la Collybie était accentuée dans ces stations à risques ou si les conditions du sol étaient susceptibles d'avoir un impact direct sur le champignon agent pathogène. Pour ceci, deux approches spécifiques ont été retenues. Tout d'abord nous avons réalisé une expérimentation d'inoculation par *C. fusipes* de chênes pédonculés matures dans des parcelles présentant des sols à textures contrastées. Puis, nous avons réalisé plusieurs expériences d'inoculations en conditions contrôlées, où les facteurs testés étaient le niveau d'engorgement du sol par l'eau ainsi que le déficit hydrique. Dans ces expérimentations nous avons évalué la survie de *C. fusipes* dans les bûchettes de noisetiers qui servent d'inoculum, l'efficacité d'infection (proportion de racines infectées lorsque *C. fusipes* a survécu dans les bûchettes), ainsi que l'extension des lésions.

### **3.1 Inoculations de chênes pédonculés matures en forêt (Publication III)**

Dans cette expérimentation nous avons plus particulièrement cherché à déterminer si la sensibilité du chêne pédonculé à *C. fusipes* était plus forte notamment dans les sols à texture grossière et si elle pouvait être reliée à la vigueur de l'hôte. Une série d'inoculations a donc été mise en place sur 10 parcelles présentant une gamme étendue de texture. Sur chaque parcelle, 15 arbres ont été inoculés avec 3 isolats différents de *C. fusipes* et des analyses de sols ont permis d'évaluer les proportions d'argile et de sable ainsi que les teneurs en carbone, azote, phosphore et différents cations échangeables. La densité apparente du sol a également été mesurée sur chaque parcelle. La profondeur d'apparition de l'hydromorphie a été mesurée au pied de chaque arbre. Les arbres inoculés ont été caractérisés en mesurant leur hauteur et leur diamètre à hauteur de poitrine afin d'avoir accès à leur rapport hauteur / diamètre ainsi qu'en relevant leur statut social. Ces paramètres reflètent la vigueur moyenne de l'arbre dans le passé. Les inoculations ont été relevées après deux ans et demi.

#### **3.1.1 Nouveaux apports**

Nous avons clairement montré que l'efficacité d'infection par *C. fusipes* est fortement inhibée par un engorgement des sols. Ce facteur a un impact négatif sur la survie de *C. fusipes* dans les bûchettes ainsi que sur l'efficacité d'infection (Figure 13). Ces résultats confirment ceux relatifs à une autre expérimentation d'inoculation de terrain, également décrite dans la publication III mais qui n'était pas intégrée dans ma thèse. De plus, la survie de *C. fusipes* augmente avec la teneur en éléments grossiers du sol et le rapport C/N et diminue avec le pH et la disponibilité en potassium, calcium et magnésium du sol (Figure 14). *C. fusipes* survit donc moins bien dans les bûchettes inoculum des sols riches. Ces facteurs étant fortement corrélés, il est impossible de mettre en évidence le rôle spécifique éventuel joué par l'un d'entre eux dans ce phénomène. De plus, les chênes ne sont pas apparus plus sensibles à *C. fusipes* dans les

stations à risques car nous n'avons pas réussi à mettre en évidence de lien entre l'efficacité d'infection ou l'extension des lésions et la texture du sol. Nous n'avons pas non plus démontré de lien entre ces paramètres et ceux liés à la vigueur. Un lien inconstant avec le statut social a toutefois été observé (plus forte sensibilité à *C. fusipes* des arbres dominants dans une expérience et tendance inverse dans l'autre).

### 3.1.2 Discussion autour de la méthodologie employée

Nous avons vu que l'accès aux symptômes en forêt nécessitait de creuser le sol à la base du chêne et donc de perturber le milieu. Il en est de même pour le sol directement en contact avec le parasite lorsque l'on inocule des arbres en milieu naturel. Cela peut peut-être expliquer le fait que la densité apparente du sol ne soit pas apparue comme un facteur lié à la survie de *C. fusipes*. Cependant, la perturbation apportée au pied de l'arbre reste relativement minimale, puisque seules trois racines maîtresses sont dégagées. Le sol est perturbé sur quelques dizaines de centimètres de profondeur, et l'on peut imaginer que cela ne se répercute pas sur la profondeur d'apparition du niveau d'engorgement du sol par l'eau.

Dans cette expérimentation, nous nous sommes intéressés uniquement au tout début du processus d'infection par la Collybie. C'est le principal problème des études basées sur des inoculations de parasites qui évoluent lentement. Ainsi, Redfern (1983, 1998) a mis en évidence, lors d'inoculations expérimentales d'épicéas en forêt par *H. annosum*, qu'après 5 ans, le succès d'inoculation était le même dans deux types de sols différents alors qu'après 10 ans la maladie avait évolué très différemment dans chacun des sols. Cependant, dans ce cas *H. annosum* avait été inoculé sur souches et la transmission de la maladie sur les arbres voisins, dans des conditions de sols favorables, était certainement plus lente que dans notre cas où l'inoculum est apposé directement contre la racine. D'autre part, plusieurs expériences d'inoculations n'ayant duré que quelques années (entre 1 et 4 ans) ont suffi à mettre en évidence des contrastes de sensibilité à *C. fusipes* chez différentes espèces de chênes (Marçais et Caël, 2000) ou des différences de sensibilité à l'Armillaire chez des chênes pédonculés et des pins sylvestres, en relation avec leur statut social (Davidson et Rishbeth, 1988 ; Redfern, 1978).

Nous avons estimé la vitesse médiane de croissance de *C. fusipes* dans les racines inoculées à 3 cm par an. Le parasite nécessite donc une trentaine d'années pour parcourir un mètre au sein du système racinaire. Ce qui correspond grossièrement à la distance qu'il doit parcourir pour l'infecter fortement à partir d'un point d'infection unique. Or, lors d'un suivi dans le temps de lésions naturelles sur chênes rouges, Luis (2001) a également estimé à une trentaine d'années le temps nécessaire au parasite pour infecter fortement un arbre sain. La convergence de ces estimations est un argument en faveur du fait que l'extension des lésions induites artificiellement est peu différente de celles des infections naturelles.

### **3.2 Inoculations de jeunes plants de chênes pédonculés en conditions contrôlées**

Nous avons vu qu'un engorgement du sol par l'eau est lié à une moindre survie de *C. fusipes* ainsi qu'à une moindre efficacité d'infection. Les lésions naturelles sont également moins développées dans les sols engorgés. La teneur en sable du sol paraît être un élément également important puisque son augmentation est liée à une distribution préférentielle de *C. fusipes* ainsi qu'à une meilleure survie, à des lésions naturelles plus développées et à l'association de *C. fusipes* au dépérissement du chêne pédonculé. Nous avons donc cherché à savoir si le niveau d'engorgement et la texture du sol pouvaient être particulièrement reliés à un changement de sensibilité du chêne pédonculé à *C. fusipes*.

#### **3.2.1 Inoculations de jeunes plants de chênes et relation avec l'engorgement et la texture du sol (Publication IV)**

L'effet négatif de l'engorgement du sol par l'eau pourrait être expliqué par la moindre disponibilité en oxygène dans ce type de conditions. En effet, lors d'un engorgement, l'eau occupe la macroporosité à la place de l'atmosphère du sol. Le coefficient de diffusion de l'oxygène dans l'eau est approximativement 10 000 fois plus faible que dans l'air (Praag et Weissen, 1982). L'anoxie rencontrée dans les sols engorgés est aussi à l'origine de nombreux changements susceptibles d'avoir un impact sur *C. fusipes*. Ainsi, le cortège de micro-organismes est modifié au profit de ceux à métabolisme anaérobie et un certain nombre de composés toxiques peuvent s'accumuler, au moins localement, tels que des sulfures d'hydrogène ou des composés aromatiques acides (Drew et Lynch, 1980). Un phénomène de dénitrification, résultant de la respiration anaérobie de certaines bactéries, peut également intervenir en sols engorgés (Grundmann et Rolston, 1987). Cependant, nous avons privilégié l'importance de la disponibilité en oxygène dans l'impact et la distribution de *C. fusipes* car ce paramètre a souvent été invoqué à propos des pourridiés. De plus, la disponibilité en oxygène dans le sol est aussi liée à sa texture puisque la vitesse de renouvellement de celui-ci est plus rapide dans des textures grossières où la macroporosité est plus élevée (Lévy et Toutain, 1994). La disponibilité en oxygène a une influence sur d'autres pourridiés. La production de rhizomorphes par les Armillaires est fortement réduite en conditions d'hypoxie ainsi que dans les couches profondes du sol où l'oxygène se raréfie ou dans les sols engorgés (Morrison, 1976 ; Rishbeth, 1978 ; Singh, 1981 ; Pearce et Malajczuk, 1990). Cruickshank *et al.* (1997) suggèrent que la faible présence d'*A. sinapina* et *A. ostoyae* sur les sites engorgés puisse être liée à l'anoxie associée à la saturation périodique par l'eau. Blenis *et al.* (1989) émettent l'hypothèse que la meilleure survie d'*A. ostoyae* dans les textures sableuses est expliquée par une meilleure disponibilité en oxygène dans ce type de textures. Concernant *H. annosum*, son impact est plus marqué dans les sols bien aérés à texture grossière (Froelich *et al.*, 1966 ;

Alexander *et al.*, 1975) mais il est également capable de croître dans le tronc des arbres alors que cela représente un milieu où la teneur en oxygène est fortement réduite (Stenlid et Redfern, 1998).

Dans cette expérimentation nous avons donc voulu caractériser l'impact de la texture du sol et de l'engorgement sur la survie de *C. fusipes* dans un premier temps, puis sur la sensibilité de jeunes plants de *Q. robur* à *C. fusipes*. Dans ce but, 120 bûchettes colonisées ont été enterrées dans 6 parcelles présentant des sols à différentes teneurs en sable, chacune des parcelles comprenant une zone fortement engorgée et une zone faiblement engorgée où les bûchettes ont été disposées. La survie de *C. fusipes* a été évaluée un an plus tard. Une expérimentation complémentaire réalisée en milieu contrôlé a permis de suivre la survie de *C. fusipes* dans 47 bûchettes au cours de 53 jours d'engorgement dans deux types de substrats différents : un substrat sable/tourbe et un substrat sol forestier (limono argileux)/sable. La survie a été contrôlée au 21<sup>e</sup>, 35<sup>e</sup> et 53<sup>e</sup> jour. Enfin, 76 plants ont été inoculés par deux isolats de *C. fusipes* différents. La moitié des plants avait été transplantée dans le substrat sable/tourbe et l'autre moitié dans le substrat sol forestier/sable. Un mois après inoculation, la moitié des sols a été soumise à un engorgement total par l'eau pendant 3 mois. Les inoculations ont été relevées une année plus tard.

#### 3.2.1.1 Nouveaux apports

Nous avons clairement mis en évidence l'impact négatif de l'engorgement sur *C. fusipes*. En effet, dans les sols forestiers, *C. fusipes* survit très bien dans les zones faiblement engorgées alors que sa survie dans les zones engorgées n'est bonne que dans deux parcelles où l'engorgement est moins prononcé. Dans cette expérience, nous n'avons pas mis en évidence de relation entre la survie de *C. fusipes* et la teneur en sable du sol, notamment dans les zones fortement engorgées. Dans l'expérience de suivi de la survie de *C. fusipes* durant un engorgement, l'impact de celui-ci est apparu très précocement puisque dès le 21<sup>e</sup> jour, le parasite n'est plus vivant dans les bûchettes, sans que le type de substrat interagisse avec le phénomène. De même, dans l'expérimentation d'inoculation, la survie de *C. fusipes* est fortement affectée par l'engorgement. Le type de substrat n'est pas lié à la survie de *C. fusipes*. Dans le substrat sable-tourbe, les plants ont tendance à être plus fréquemment infectés (57%) qu'en substrat sol-sable (30%). Cependant, l'importance de ce résultat est à modérer, compte tenu de l'effectif réduit de bûchettes dans lesquelles *C. fusipes* a survécu.

#### 3.2.1.2 Discussion autour de la méthodologie employée

Les résultats présentés dans l'expérimentation d'inoculation de terrain (Publication III) mettent en évidence que la Collybie survit mieux lorsque la teneur en sable du sol augmente. Nous n'avons pas retrouvé ici cette liaison. Ceci peut être expliqué par le temps d'expérimentation plus court dans le cas précédent que dans le l'expérimentation d'inoculation (1 vs 2.5 année). De plus, le nombre de parcelles sélectionnées était également plus faible (6

vs 10). Le fait que la survie de *C. fusipes* soit bonne dans les zones fortement engorgées de deux des parcelles où la teneur en sable est relativement faible s'explique aisément par l'apparition plus profonde des traces d'hydromorphie traduisant un engorgement moins sévère. De plus, l'une d'entre elles a été drainée par fossés et l'engorgement évalué par les traces d'hydromorphie peut ne plus refléter les conditions actuelles de saturation en eau du sol.

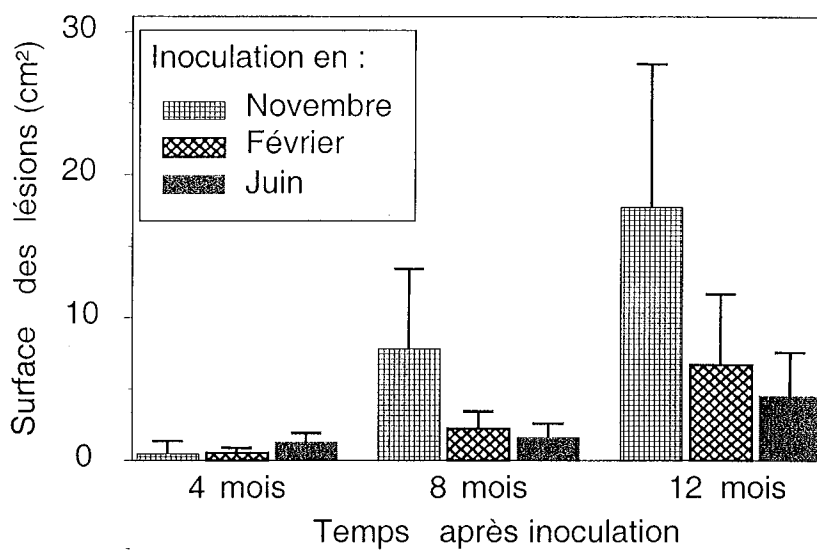
L'ennoyage des plants inoculés nous a permis de confirmer en conditions contrôlées l'effet négatif direct de ce paramètre sur le parasite, dans des conditions proches de celles qui sont observées sur le terrain. En effet, les jeunes plants ont été inoculés en hiver et leurs racines complètement ennoyées 1 mois plus tard pendant 3 mois. De telles conditions d'engorgements ponctuels mais intenses sont fréquemment observées en forêt notamment en hiver et au début du printemps dans les forêts alluviales où *C. fusipes* est commune. Cependant, on peut imaginer que les conditions chimiques et biologiques des substrats, surtout celui qui ne contient pas de sol forestier, soient différentes de celles observées dans les sols naturels. Cependant, cela n'a pas interagi avec la saturation en eau des pots puisque la survie de *C. fusipes* est aussi faible dans les deux types de substrats.

### **3.2.2 Inoculations de jeunes plants de chênes soumis à une sécheresse (Annexe)**

*C. fusipes* est préférentiellement distribuée et associée aux dépérissement dans les sols à texture grossière. Ce type de sols présente une réserve utile en eau inférieure aux sols à textures plus fines (Baize et Jabiol, 1995). De plus, dans les sols alluviaux, l'enracinement des chênes et donc l'accessibilité à l'eau peuvent être limités par des couches de sol impénétrables par les grosses racines. Or, bien que le chêne pédonculé soit une espèce tolérante à la sécheresse, il semble y être particulièrement sensible dans des conditions d'enracinement limité (Becker et Lévy, 1983a). Dans des conditions de mauvaise alimentation en eau, les chênes pourraient donc présenter une baisse de vigueur susceptible d'augmenter leur sensibilité à *C. fusipes*.

Nous avons donc testé cette hypothèse en caractérisant la sensibilité à *C. fusipes* de jeunes chênes bien ou mal alimentés en eau. Parmi soixante et onze jeunes plants de chênes pédonculés, 53 ont été inoculés à la plantation, au mois de mai, par un isolat de *C. fusipes*. Treize mois plus tard, un stress hydrique a été appliqué sur la moitié des plants pendant 77 jours à partir de la mi-juin. Les plants dont l'alimentation en eau était déficiente recevaient une alimentation correspondant au tiers de celle des témoins alimentés de façon optimale. Les inoculations ont été relevées 20 mois après inoculation, soit 6 mois après l'arrêt du stress hydrique.

#### **3.2.2.1 Nouveaux apports**



**Figure 15:** Relation entre la période d'inoculation et l'extension des lésions induites par *C. fusipes*. Les surfaces de lésions ont été obtenues chez de jeunes plants de chênes pédonculés, inoculés en novembre, février ou juin. Les inoculations ont été relevées 4, 8 ou 12 mois après inoculation (d'après Marçais, résultats non publiés).



Nous n'avons pas réussi à mettre en évidence de lien entre la sécheresse des jeunes plants et leur sensibilité à *C. fusipes*. La survie de *C. fusipes* est légèrement plus faible dans les substrats à arrosages déficients ; mais ce résultat n'est pas statistiquement significatif. D'autre part, l'efficacité d'infection et l'extension des lésions chez les plants bien alimentés en eau ne sont pas différentes de celles des plants soumis à un déficit hydrique. Cependant, l'efficacité d'infection a été significativement plus élevée chez les plants ayant moins bien poussé la première année. L'efficacité d'infection n'a certainement pas été influencée par le stress hydrique mis en place treize mois après inoculation, car la majorité des plants sont infectés dans les trois mois suivant l'inoculation (Marçais, résultats non publiés).

### 3.2.2.2 Discussion autour de la méthodologie employée

La réduction d'arrosage a été appliquée alors que les plants avaient été inoculés par *C. fusipes* depuis plusieurs mois. Cette situation est proche de celle que l'on peut rencontrer en forêt où les épisodes de sécheresse interviennent de façon ponctuelle alors que le parasite est déjà présent sur les arbres.

L'application d'un stress hydrique n'a pas favorisé les attaques de *C. fusipes*. Pourtant, le stress appliqué était relativement important puisque les potentiels hydriques foliaires de base ont atteint - 1 MPa dès le 36<sup>e</sup> jour de stress. Or, il a été montré que de jeunes plants de *Q. robur* perdaient 80% de leur conductance spécifique hydraulique foliaire lorsque leur potentiel de base atteignait - 1 MPa (Simonin *et al.*, 1994). De plus la déficience hydrique a marqué la croissance de nos plants puisque les plants ont montré une croissance en hauteur correspondant à 80% de celle des plants bien alimentés en eau. Si la sensibilité de l'hôte avait du être modifiée suite au stress hydrique, elle l'aurait été soit pendant la période de stress, soit après la fin du stress. Ainsi, Marçais *et al.* (1993) ont montré que la sécheresse augmentait la sensibilité de jeunes plants de chênes rouges à *Phytophthora cinnamomi* Rands., en particulier après réarrosage. Dans notre cas, comme *C. fusipes* est un parasite lent, on peut se demander si nous lui avons laissé assez de temps pour pouvoir mettre en évidence des extensions de lésions accrues chez des plants soumis au déficit hydrique. La figure 15 montre que l'extension des lésions de *C. fusipes* chez de jeunes plants de *Q. robur* inoculés en février augmente très fortement en 4 mois de octobre à février (Marçais, non publié), ce qui correspond sensiblement à la période comprise entre l'arrêt du stress hydrique et la lecture des inoculations. Nous pouvons donc conclure que si l'extension des lésions avait dû être accrue suite au stress hydrique (du mois de septembre au mois de mars de l'année suivante), nous l'aurions probablement mise en évidence.

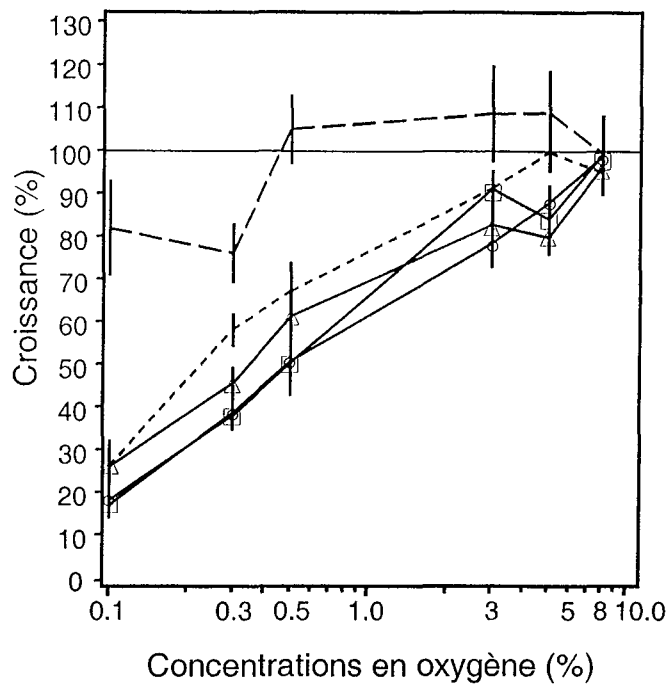
### 3.2.3 Discussion générale

Un problème potentiel de ces expériences est que la méthode d'inoculation simule mal le processus d'infection naturel qui se fait certainement par voie mycélienne après germination

des basidiospores. La quantité d'inoculum représentée par une bûchette colonisée par *C. fusipes* est en effet bien supérieure à celle représentée par cet inoculum naturel. Ainsi, on peut supposer que les efficacités d'infections élevées observées ne reflètent pas forcément la réalité. De plus, lorsque l'on met en évidence l'effet d'un facteur édaphique sur la survie de *C. fusipes* dans une bûchette de noisetier, on peut imaginer que cet effet intervient probablement de façon bien plus drastique sur la germination des basidiospores ou sur la croissance du mycélium dans le sol ou à la surface de la racine (mycélium ectotrophe).

Lorsque nous examinons la survie de *C. fusipes* dans les bûchettes en relation avec les facteurs du sol, c'est leur impact direct sur le parasite que l'on évalue. L'efficacité d'infection quant à elle, dépend à la fois de l'effet des facteurs édaphiques sur le champignon mais également de la capacité qu'a l'hôte à résister à son agresseur. Celle-ci résulte à la fois de ses capacités intrinsèques génétiques et de sa vigueur, influencées par les conditions du milieu. L'extension des lésions est moins soumise à l'influence des conditions édaphiques sur le champignon, mais résulte beaucoup plus de la capacité de l'arbre à résister. Dans les expérimentations d'inoculations, nous avons mis en évidence plusieurs effets directs et positifs sur le parasite des facteurs du sol tels que le faible niveau d'engorgement, la moindre richesse chimique ou l'augmentation de la teneur en sable. Ceci peut certainement expliquer, au moins en partie, sa distribution préférentielle dans ces types de sols ainsi que son impact négatif en terme de dépérissements et de sévérité des lésions. Cependant, aucun facteur n'a pu être relié à l'extension des lésions. Par contre, il semble que la sensibilité du chêne pédonculé à la Collybie, du moins dans les premiers stades du processus d'infection, résulte plus de l'aspect favorable de certaines conditions édaphiques sur le parasite lui-même que de leur aspect défavorable sur le chêne.

Malgré les différents paramètres pris en compte pour refléter la vigueur de l'hôte, aucun lien n'a pu être mis en évidence entre la vigueur et la sensibilité de l'hôte à *C. fusipes*. Ceci est en concordance, à la fois avec ce qui a été montré dans l'autre expérimentation d'inoculations décrite dans la publication III, mais également avec ce qui a été observé lors d'un suivi à long terme dans deux peuplements de chênes rouges. Dans cette étude, l'évolution des infections et l'apparition de nouveaux cas d'infections n'avaient pas pu être reliées à la vigueur évaluée en terme d'accroissement de surface terrière, de ratio hauteur/diamètre ou de statut social (Luis, 2001). Dans la littérature, les mentions concernant les autres pourridiés à ce propos sont contrastées. Goheen et Hansen (1994) ne rapportent pas de liens significatifs entre la vigueur de sapins de Douglas (évaluée par le statut social) inoculés par *P. weirii* et le succès d'infection ou la colonisation de leurs racines. Au contraire, Davidson et Rishbeth (1988) ont confirmé qu'*A. gallica*, considérée jusqu'alors comme un parasite secondaire, ne réussissait à infecter que des arbres dominés alors qu'*A. mellea*, considérée comme un parasite primaire, réussissait à infecter des arbres codominants.



**Figure 16.** Croissance d'*A. mellea* (— — —), d'*H. annosum* (-----) et de trois isolats de *C. fusipes*, (—○—) C41, (—△—) C49 et (—□—) C62, sous atmosphères à concentration réduite en oxygène (8, 5, 3, 0.5, 0.3 and 0.1 %) en comparaison de la croissance des isolats sous atmosphère ambiante (20.9%). Les barres représentent l'intervalle de confiance de la moyenne (Publication IV)

La sécheresse n'est pas apparue comme un facteur favorisant le développement du pourridié à Collybie. Cependant, les chênes situés sur des stations dont le sol présente une faible réserve utile en eau ou une limite physique à l'enracinement peuvent souffrir de façon beaucoup plus récurrente d'un déficit d'alimentation en eau et développer des caractères physiologiques qui ne se retrouvent pas chez de jeunes plants soumis très ponctuellement à la sécheresse. Ainsi, les forêts soumises à des sécheresses chroniques semblent allouer une part anormalement importante du carbone aux racines (Waring, 1983). Or, nous n'avons pas mis en évidence le fait que les chênes pédonculés matures puissent être plus sensibles à *C. fusipes* dans des sols à textures grossières où ceux-ci peuvent plus particulièrement souffrir d'un déficit hydrique chronique. Ceci contraste notamment avec ce qui a été démontré pour les Armillaires. En effet, dans certains cas, même les armillaires se comportant en parasites primaires peuvent être favorisées par un défaut d'alimentation en eau (Anselmi et Puccinelli, 1993 ; Parks *et al.*, 1994). Ceci est également le cas d'*H. annosum* lorsque les conditions de stress hydriques ne sont pas trop prononcées (Wahlström et Barklund, 1994). Nous n'avons également pas mis en évidence de sensibilité accrue à *C. fusipes* des chênes matures dans les sols à richesse chimique plus faible. Ceci contraste avec ce qui a pu être montré jusqu'alors pour d'autres pourridiés. En effet, Singh (1983) et Redfern (1978) ont montré que différentes espèces de conifères inoculées par *Armillaria* sp. avaient une sensibilité accrue au parasite lorsqu'elles étaient implantées sur sols acides à texture grossière. Une autre observation apportée par Piri (2000) va dans le même sens puisqu'elle a montré que des Pins inoculés par *H. annosum* sont moins fréquemment attaqués et ont des lésions moins étendues sur des parcelles qui ont été fertilisées trois années auparavant.

#### **4 Croissance *in vitro* de *C. fusipes* sous atmosphère réduite en oxygène (publication IV)**

Nous avons vu que la survie de *C. fusipes* dans les bûchettes était très fortement compromise dans les substrats totalement gorgés d'eau et de ce fait fortement anoxiques. De plus *C. fusipes* survit mieux dans les sols à textures grossières ce qui pourrait être relié à la meilleure disponibilité en oxygène dans ces textures. Nous avons également vu que la disponibilité en oxygène pouvait jouer sur la distribution des Armillaires ou d'*H. annosum*. Nous avons donc tenu à vérifier cette hypothèse en testant l'effet d'une teneur réduite en oxygène sur la croissance *in vitro* de *C. fusipes* et en la comparant avec celle d'*A. mellea* et *H. annosum*.

Nous avons donc mesuré la croissance sur milieu malt-agar de trois isolats de *C. fusipes*, un isolat d'*H. annosum* et un isolat d'*A. mellea*, durant une période de 7 jours, sous 6 atmosphères à teneur en oxygène réduite : 0.1%, 0.3%, 0.5%, 3%, 5%, 8% et sous atmosphère ambiante, 21%. Pour ceci, dans des cuves étanches, l'atmosphère ambiante a été progressivement remplacée par de l'azote pur jusqu'à obtention des concentrations désirées.

## 4.1 Nouveaux apports

Nous avons clairement mis en évidence la très forte sensibilité de *C. fusipes* à l'hypoxie. En effet, parmi les trois pourridiés, *C. fusipes* montre la croissance la plus réduite dès que la teneur en oxygène diminue en dessous de 8%. *H. annosum* apparaît comme étant légèrement moins sensible à l'hypoxie que *C. fusipes*. *A. mellea*, quant à elle, n'est pratiquement pas affectée par l'hypoxie (Figure 16). Lorsque, après 7 jours de croissance en hypoxie, chaque isolat est replacé sous atmosphère ambiante, il reprend toutefois sa croissance initiale.

## 4.2 Discussion

La reprise de croissance des isolats ayant poussé sous hypoxie, une fois replacés sous atmosphère ambiante, contraste avec la faible capacité de la Collybie à survivre à l'anoxie engendrée par un épisode d'engorgement. Ceci peut s'expliquer par le temps pendant lequel les isolats ont été soumis à la contrainte engorgement ou à l'hypoxie in vitro : de 7 jours dans le premier cas à 21-90 jours dans le deuxième cas. D'autre part, il est fort possible que dans les substrats en pots, *C. fusipes* ait été soumise à une compétition pour l'oxygène avec des micro-organismes mieux adaptés aux conditions hypoxiques.

Nous confirmons donc que la forte sensibilité de *C. fusipes* à l'hypoxie puisse expliquer en bonne partie le caractère favorable des textures grossières et le caractère défavorable de l'engorgement du sol sur sa distribution et son impact. Au contraire de la Collybie, *A. mellea* est apparu comme étant faiblement affectée par l'hypoxie. Ceci pourrait expliquer que Termorshuizen et Arnolds (1994) la décrivent comme préférentiellement distribuée dans les sols à textures lourdes. *H. annosum* est, quant à lui, apparu comme fortement affecté par la disponibilité réduite en oxygène. Courtois (1973) a observé des réductions de croissance comparables à ce que nous avons mesuré dans des conditions équivalentes. La littérature rapporte cependant des réponses contrastées d'*H. annosum* à l'hypoxie puisqu'il a également été mentionné comme étant relativement peu affecté par le manque d'oxygène (Gundersen, 1961 ; Lindberg, 1992). Un effet négatif de la saturation en eau du bois sur la croissance d'*H. annosum* a également été démontré en conditions contrôlées (Kuhlman, 1980 ; Lindberg et Johansson, 1992). Stenlid et Redfern (1998) ont étudié les premiers stades de l'infection de l'épicéa par *H. annosum* dans des tronçons de racines vivantes placées en sol saturé en eau ou en atmosphère saturée en azote. Ils ont montré une réduction de la progression du mycelium d'*H. annosum* en relation avec des modifications d'activités enzymatiques. De plus, Cwielong et Hüttermann (1987) ont montré qu'au-dessous d'un certain seuil d'oxygène, l'activité de détoxification réalisée par les enzymes fongiques, envers notamment les phénols, était inhibée. En milieu naturel, des hypothèses ont également été avancées quant à l'impact de l'engorgement des sols par l'eau sur la distribution et l'incidence des pourridiés. Ainsi, Redfern (1998) suggère, après une expérience d'inoculation sur le terrain, que les faibles taux

d'infections par *H. annosum* observés dans les sols tourbeux peuvent être reliés au fort taux de saturation en eau de ces sols ainsi qu'à leur pH bas. De même, l'incidence et la distribution d'*A. ostoyae* ne sont pas favorisées par des conditions de sol trop humides et l'effet possible de faible disponibilité en oxygène dans les sols saturés en eau a été avancée (Whitney, 1984 ; Cruickshank *et al.*, 1997). Un effet négatif de l'engorgement a également été rapporté à propos d'*I. tomentosus* dont l'incidence diminue dans les sols à engorgement permanent (Bernier et Lewis, 1999).

## 5 Conclusion et perspectives

Le travail réalisé au cours de ma thèse a permis de mieux appréhender l'impact de *C. fusipes* en relation avec les conditions écologiques. Nous avons clairement pu définir le type de situation à risques en terme de dépérissement : lorsque *C. fusipes* est présente dans l'écosystème, le risque de dépérissement du chêne pédonculé sera augmenté dans les stations dont les sols ont une texture grossière, sont peu soumis à l'engorgement et ont une richesse chimique plutôt faible. Ceci correspond justement à des situations écologiques où ce dernier est loin de son optimum écologique alors qu'au contraire celles-ci sont tout à fait favorables à *C. fusipes* dont la survie est favorisée. Il est intéressant de rappeler que l'ensemble des facteurs édaphiques caractérisant le type de stations à risques pour le chêne pédonculé en présence de *C. fusipes* est également fréquemment cité dans la littérature en association avec la distribution et l'impact de nombreuses autres espèces de pourridiés primaires tels qu' *H. annosum*, *A. ostoyae*, *I. tomentosus* ou *P. noxius* (cf. § 1.5).

Ces facteurs édaphiques peuvent agir essentiellement à deux niveaux différents : **sur l'épidémie** en favorisant directement le parasite ou en défavorisant l'hôte ainsi **que sur la tolérance du chêne à l'infection**. Nos résultats appuient clairement l'hypothèse selon laquelle les facteurs édaphiques ont une action positive sur le parasite lui-même puisque la survie de *C. fusipes* est nettement favorisée dans les sols sableux à faible engorgement par l'eau. Il semble que la faible tolérance de la Collybie à l'hypoxie soit le facteur déterminant. Au contraire, nos résultats tendent à invalider l'hypothèse selon laquelle le chêne pédonculé puisse avoir une sensibilité accrue à *C. fusipes* suite à sa distribution hors station. En effet, nous n'avons pas eu la moindre indication que les chênes co-dominants ou implantés en sols sableux puissent être plus sensibles à *C. fusipes*. De plus les chênes soumis à un défaut d'alimentation en eau n'ont pas non plus montré de sensibilité accrue à *C. fusipes*. Les expérimentations relatives à la publication II ont également montré que des chênes pouvaient être fortement infectés dans des stations proches de l'optimum écologique du chêne pédonculé. Les observations à long terme de la dynamique de la maladie, bien que concernant le chêne rouge, corroborent également nos observations. Cependant, la faible vigueur des chênes situés 'hors stations' pourrait éventuellement jouer un rôle en ne leur permettant pas de surmonter les fortes attaques de *C. fusipes* par un renouvellement des racines détruites. Enfin, la tolérance du chêne à l'infection peut être fortement réduite par la moindre disponibilité en eau et en

nutriments justement rencontrée dans les sols des stations à risques. En effet il est facile d'imaginer qu'un chêne puisse présenter un risque plus élevé de dépérir lorsque la diminution de l'accessibilité à l'eau et aux nutriments, induite dans un premier temps par la disparition des racines infectées, est encore accentuée par les conditions stationnelles.

Dans ces situations écologiques à risques, parmi l'ensemble des facteurs biotiques et abiotiques que nous avons observés, le niveau d'infection induit par *C. fusipes* est le facteur qui explique le mieux le phénomène de dépérissement. L'ensemble de nos observations plaide pour le fait que *C. fusipes* est effectivement un agent causal important de dépérissement du chêne pédonculé dans les sols à texture grossière où elle est abondante. De plus elles nous permettent de supposer que *C. fusipes* est bien à l'origine des pertes de croissance systématiquement observées chez les arbres fortement infectés. Cependant il est important de garder à l'esprit que les dommages induits par ce pourridié n'expliquent qu'un cas particulier de dépérissement et que bien d'autres scénarios sont possibles. Ainsi dans la base de données du Département de la Santé des Forêts, les mentions de *C. fusipes* associées au dépérissement dans les sols des stations à risque ne représentent que 7% de l'ensemble des mentions de dépérissement.

Les parasites dans les écosystèmes forestiers ont un rôle important dans la répartition des espèces, les phénomènes de succession, la structure et la composition des peuplements (Castello *et al*, 1995 ; Hansen et Goheen, 2000). Ils permettent également le maintien d'une certaine biodiversité (Michalakakis *et al*, 1992 ; Dobson et Crawley, 1994). Le cas le mieux étudié pour les pourridiés est celui de *P. weirii* (Hansen et Goheen, 2000). Le champignon se développe en foyers et crée des trouées dans les régénérations denses et uniformes de sapins de Douglas, intervenant naturellement suite aux incendies. Ces foyers entraînent un bouleversement de la composition et de la succession des communautés d'espèces végétales et des espèces animales qui y sont associées. Ainsi, ils représentent de véritables îlots de diversité dans des peuplements par ailleurs très homogènes.

Concernant *C. fusipes*, il est également important de s'intéresser au rôle que cet agent de pourridié peut jouer dans le fonctionnement de la chênaie. Nous avons vu qu'en plus des erreurs sylvicoles dont le chêne pédonculé peut être victime, son caractère héliophile et pionnier lui permet de coloniser des milieux ouverts pouvant correspondre aux situations à risques décrites précédemment. *C. fusipes* participe alors à l'élimination de cette essence d'un type de stations écologiques pour lequel elle est mal adaptée et doit être considérée comme une composante dynamique de l'écosystème forestier. Ce phénomène résulte de la sensibilité intrinsèque forte de cette espèce de chêne au parasite ainsi que du caractère favorable de ce type de milieu sur le champignon lui-même et probablement de la moindre tolérance à l'infection dans ces situations.

Dans ce type de situations à risques, les chênes présentent des houppiers fortement dégradés pendant de nombreuses années, la mort de l'arbre intervenant à plus long terme. On

peut alors rencontrer des arbres morts sur pied ou plus fréquemment, tombés par chablis. Dans ce cas, *C. fusipes* permet au chêne de servir de nouvelle niche écologique à d'autres organismes (insectes, oiseaux, champignons...), s'il n'est pas éliminé par les forestiers. La distribution disséminée du parasite en forêt aboutit à la mise en place de petites trouées éparses, ce qui structure différemment l'espace. Ceci crée progressivement des conditions favorables aux espèces végétales suivantes de la succession, capables de se développer au sein de telles petites trouées, comme le chêne sessile s'il est présent à proximité. Ainsi *C. fusipes* peut favoriser la transition naturelle de la chênaie pédonculée à la chênaie sessile, à la fois beaucoup moins sensible au parasite et mieux adaptée à ce type de conditions écologiques car moins exigeante au niveau de son alimentation hydrique et minérale.

Enfin, d'un point de vue pratique, dans les types de situations écologiques à risques, une conversion des peuplements de chênes pédonculés en peuplements de chênes sessiles peut être envisagée par les forestiers. Au contraire il ne serait pas judicieux de penser à convertir en peuplements de chênes rouges pourtant plus résistants à la sécheresse et moins exigeants du point de vue de la nutrition minérale (Vivin *et al.*, 1993 ; Colin-Belgrand, 1994), car ceux-ci sont encore plus sensibles au parasite.



## Références bibliographiques

- Alexander S. A., Skelly J. M., Morris C. L. 1975. Edaphic factors associated with the incidence and severity of disease caused by *Fomes annosus* in loblolly pine plantations in Virginia. *Phytopathology* 65 : 585-591.
- Anselmi N., Puccinelli P. 1993. Studies on *Armillaria* attacks on declining oak trees. *In* International congress on Recent Advances in Studies on Oak Decline. Luisi N., Lerario P., Vannini A. (eds.), Selva di Fasano (Italy), September 13-18, 1992 pp. 23-29.
- Bacilieri R., Ducouso A., Kremer A. 1996. Mating system and asymmetric hybridization in a mixed stand of European oaks. *Evolution* 50 : 900-908.
- Baize D., Jabiol B. 1995. Diagnostic relatif au réservoir en eau, *In* Guide pour la description des sols. Baize D., Jabiol B. (eds.) INRA, Nancy, France, pp. 277-290.
- Baker F. A., Verbila D. L., Hodges C. S. 1993. Classification and regression. Tree analysis for assessing hazard of pine mortality caused by *Heterobasidion annosum*. *Plant Disease* 77 : 136-139.
- Barrett D. K., Greig J. W. 1984. Investigation into the infection biology of *Phaeolus schweinitzii*. *In* 6<sup>th</sup> International Conference on Root and Butt Rots of Forest Trees. Kile G. A. (ed), Melbourne, Victoria and Gympie (Australia), August 25-31, 1983. CSIRO, Melbourne, Australia pp. 95-103.
- Becker M., Lévy G. 1982. Le dépérissement du chêne en forêt de Tronçais. Les causes écologiques. *Ann. Sci. For.* 39 : 439-444.
- Becker M., Lévy G. 1983a. Le dépérissement du chêne. Les causes écologiques. Exemple de la forêt de Tronçais et premières conclusions. *Rev. For. Fr.* 15 : 341-356.
- Becker M., Lévy G. 1983b. Installation et dynamique d'une population de semis de chênes en milieu hydromorphe sous l'influence de différents facteurs (lumière, régime hydrique, compétition herbacée). *Acta Oecologica, Oecologia plantarum* 4 : 299-317.
- Becker M., Le Tacon F. 1985. Santé de la forêt : importance d'une sylviculture adaptée aux conditions du milieu. *Rev. For. Fr.* 37 (suppl) : 7-28.
- Becker M., Lévy G., Lefèvre Y. 1996. Radial growth of mature pedunculate and sessile oaks in response to drainage, fertilisation and weeding on acid pseudogley soils. *Ann. Sci. For.* 42 : 148-154.
- Belgrand M. 1983. Comportement de jeunes plants feuillus (Chêne pédonculé, Chêne rouge, Chêne sessile, Hêtre) sur substrat ennoyé. Adaptations racinaires. Application à la mise en valeur forestière des pseudogley, Thèse de Docteur-Ingénieur, INRA Champenoux, INA Paris-Grignon.
- Bernier D., Lewis K. J. 1999. Site and soil characteristics related to the incidence of *Inonotus tomentosus*. *For. Ecol. Manage.* 120 : 131-142.
- Blenis P. V., Mulaga M. S., Hiratsuka Y. 1989. Soil affects *Armillaria* root rot of lodgepole pine. *Can. J. For. Res.* 19 : 1638-1641.
- Blodgett J. T., Worrall J. J. 1992. Site relationships of *Armillaria* species in New York. *Plant Dis.* 76 : 170-174.

- Buffet M. 1983. Le dépérissement du chêne en forêt soumise. Rev. For. Fr. 15 : 199-204.
- Buller H. A. R. 1958. The perennial pseudorhiza of *Collybia fusipes*, In Researches on fungi. N.Y. Hafner, USA pp. 374-396.
- Castello J. D., Leopold D. J., Smallidge P. J. 1995. Pathogens, patterns, and processes in forest ecosystems. BioScience 45 : 16-24.
- Chang T. T., Yang W.W. 1998. *Phellinus noxius* in Taiwan: distribution, host plants and the pH and texture of the rhizosphere soils of infected oaks. Mycol. Res. 102 : 1085-1088.
- Cochard H., Bréda N., Granier A., Aussenac G. 1992. Vulnerability to air embolism of three European oak species (*Quercus petraea* (Matt.) Liebl., *Q. pubescens* Willd, *Q. robur* L.). Ann. Sci. For. 49 : 225-233.
- Colin-Belgrand M. 1994. La nutrition du chêne rouge d'Amérique : principales normes de composition foliaire en vue d'un diagnostic. In Le chêne rouge d'Amérique. Timbal J., Kremer A., Le Goff N., Nepveu G. (eds.). INRA, Paris. pp. 101-112.
- Côté E., Dessureault M. 1994. Effects of site factors on the occurrence of *Armillaria* root rot disease in black spruce (*Picea mariana* mill.(B.S.P.) ) seed orchards. In 8<sup>th</sup> International Conference on Root and Butt Rots of Forest Trees. Johansson M., Stenlid. J. (eds.) Wik (Sweden) and Haikko (Finland), August 9-16, 1993. Swed. Univ. Agri. Sci., Sweden pp. 592-596.
- Courtois H. 1973. Einfluss von Temperatur, Licht und anderen Faktoren auf das Mycelwachstum von *Fomes annosus* (Fr.) Cooke. Angew. Botanik 47 : 141-158.
- Cruickshank M. G., Morrison D. J., Punja Z. K. 1997. Incidence of *Armillaria mellea* species in precommercial thinning stumps and spread of *Armillaria ostoyae* to adjacent Douglas fir trees. Can. J. For. Res. 27 : 481-490.
- Cwielong P., Hüttermann A. 1989. Biochemical mechanisms of action of phenolic substances on *Heterobasidion annosum*. In 7<sup>th</sup> International Conference on Root and Butt Rots of Forest Trees. Morrison D.J. (ed). Vernon and Victoria (Canada), August 9-16, 1988. Forestry Canada, Canada. pp. 208-225.
- Davidson A. J., Rishbeth J. 1988. Effect of suppression and felling on infection of oak and Scots pine by *Armillaria*. Eur. J. For. Path. 18 : 161-168.
- Delatour C. 1983. Les dépérissements des chênes en Europe. Rev. For. Fr. 35 : 265-282.
- Delatour C. 1990. Dépérissement des chênes et pathogènes. Rev. For. Fr. 42 : 182-185.
- Delatour C. 2002. Phytophthoras and Oaks in Europe. In 2<sup>nd</sup> International meeting on Phytophthoras in Forest and Wildland Ecosystems, Perth and Albany (Australia).(in press).
- Delatour C., Guillaumin J. J. 1984. Un pourridié méconnu : *Collybia fusipes* (Bull. ex Fr.) Quel. C. R. Acad. Agri. France 70 : 123-126.
- Desray, P. Jay-Allemand, C. Fady, B. Guillaumin, J. J 1998. Susceptibility to *Armillaria mellea* of different progenies of Juglans spp. selected for timber. In 9<sup>th</sup> International Conference on Root and Butt Rots of Forest Trees. Delatour C., Guillaumin J.J., Lung-Escarmant B., Marçais B. (eds.) Carcans-Maubuisson (France), September 1-7, 1997. Colloques de l'INRA n°89, INRA, France pp.287-300.
- Dimitri L., Shuman G. 1989. Further experiments on the host/parasite relationship between Norway spruce and *Heterobasidion annosum*. In 7<sup>th</sup> International Conference on Root

- and Butt Rots of Forest Trees. Morrisson D.J. (ed). Vernon and Victoria (Canada), August 9-16, 1988. Forestry Canada, Canada pp. 171-179.
- Dobson A., Crawley M. 1994. Pathogens and the structure of plant communities. *Tree* 9 : 393-398.
- Drew M. C., Lynch J.M. 1980. Soil anaerobiosis, microorganisms, and root function. *Annu. Rev. Phytopathol.* 18 : 37-66.
- Dreyer E., Colin-Belgrand M., Biron P. 1991. Photosynthesis and shoot water status of seedlings from different oak species submitted to waterlogging. *Ann. For. Sci.* 48 : 205-214.
- DSF (Département de la Santé des Forêts) 1994. La santé des forêts en France, Paris : Ministère de l'Agriculture et de la Pêche-DERF-DSF.
- Ducouso A., Kremer A. 1998. *Quercus* - Chênes. In Les ressources génétiques forestières en France. INRA, France pp. 241-273.
- Duplat P. 1996. Sylviculture du chêne pédonculé. ONF, Bulletin technique 3 : 15-20.
- Dupouey J. L., Fougère V., Kremer A. 1990. Variabilité génétique des chênes sessile et pédonculé estimée à l'aide de marqueurs morphologiques et moléculaires. *Rev. For. Fr.* 42 : 198-204.
- Dupouey J. L., Badeau V. 1993. Morphological variability of oaks (*Quercus robur* L, *Quercus petraea* (Matt) Liebl, *Quercus pubescens* Wild) in north-eastern France: preliminary results. *Ann. Sci. For.* 50 : 35-40.
- Durand P., Gelpe J., Lemoine B., Riom J., Timbal J. 1983. Le dépérissement du chêne pédonculé dans les Pyrénées-Atlantiques. *Rev. For. Fr.* 35 : 357-368.
- Entry J. A., Cromack K., Hansen E., Waring R. 1991a. Response of western coniferous seedlings to infections by *Armillaria ostoyae* under limited light and nitrogen. *Phytopathology* 81 : 89-94.
- Entry J. A., Cromack K., Kelsey R. G., Martin N. E. 1991b. Response of Douglas-Fir to infection by *Armillaria ostoyae* after thinning or thinning plus fertilisation. *Phytopathology* 81: 682-689.
- Entry J. A., Donnelly P. K., Cromack K. 1993. Effect of nitrogen and carbon sources on lignin and cellulose degradation by *Armillaria ostoyae*. *Eur. J. For. Path.* 23 : 129-137.
- Epron D., Dreyer E. 1993. Long-term effects of drought on photosynthesis of adult oak trees (*Quercus petraea* (Matt.) Liebl. and *Quercus robur* L.) in a natural stand. *New Phytol.* 125 : 381-389.
- Froelich R. C., Dell T.R., Walkinshaw C.H. 1966. Soil factors associated with *Fomes annosus* in the Gulf States. *For. Sci.* 12 : 356-361.
- Froelich R. C., Cowling E. B., Collicott L. V., Dell T.R. 1977. *Fomes annosus* reduces height and diameter growth of planted slash pine. *For. Sci.* 23 : 299-306.
- Garraway M. O. 1975. Stimulation of *Armillaria mellea* growth by plant hormones in relation to the concentration and type of carbohydrate. *Eur. J. For. Path.* 5 : 35-43.
- Gibbs J. N., Greig J. W. 1997. Biotic and abiotic factors affecting the dying back of pedonculate oak, *Quercus robur*. *Forestry* : 399-406.

- Goheen E., Hansen E. 1994. Tree vigour and susceptibility to infection by *Phellinus weirii*: Results of field inoculations. In 8<sup>th</sup> International Conference on Root and Butt Rots of Forest Trees. Johansson M., Stenlid. J. (eds.) Wik (Sweden) and Haikko (Finland), August 9-16, 1993. Swed. Univ. Agri. Sci., Sweden pp. 45-51.
- Grundmann G. L., Rolston D. E. 1987. A water function approximation to degree of anaerobiosis associated with denitrification. Soil Science 144 : 437-441.
- Guillaumin, J.J., 1977: Apricot root rot, *Armillariella mellea* (Vahl) Karst. EPPO Bull. 7 : 125-135.
- Guillaumin J. J., Berthelay S. 1981. Détermination spécifique des Armillaires par la méthode des groupes de compatibilité sexuelle. Spécialisation écologique des espèces françaises. Agronomie 1 : 897-908.
- Guillaumin J. J., Lung B. 1985. Etude de la spécialisation d'*Armillaria mellea* (Vahl) Kumm. et *Armillaria obscura* (Secr.) Herink en phase saprophytique et en phase parasitaire. Eur. J. For. Path. 15 : 342-349.
- Guillaumin J. J., Bernard C., Delatour C., Belgrand M. 1985. Contribution à l'étude du dépérissement du chêne : pathologie racinaire en forêt de Tronçais. Ann. Sci. For. 42 : 1-22.
- Gundersen K. 1961. Growth of *Fomes annosus* under reduced oxygen pressure and the effect of carbon dioxide. Nature 190 : 649.
- Hansen E., Delatour C. 1999. *Phytophthora* species in oak forest of north-east France. Ann. For. Sci. 56 : 539-547.
- Hansen E., Goheen E. 2000. *Phellinus weirii* and other native root pathogens as determinant of forest structure and process in western north America. Annu. Rev. Phytopathol. 38 : 515-539.
- Hansen E., Hamelin R. 1999. Population structure of basidiomycetes, In Structure and dynamics of fungal populations. J.J. Worrall (Ed) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, pp. 251-282.
- Hartmann G., Blank R. 1993. Etiology of oak decline in northern Germany. History, symptoms, biotic and climatic predisposition, pathology. In International congress on Recent Advances in Studies on Oak Decline. Luisi N., Lerario P., Vannini A. (eds.), Selva di Fasano (Italy), September 13-18, 1992 pp. 277-284.
- Hrib J., Kyncl J., Cerny A. 1983. A tree-ring study of Norway spruce infected with the wood-destroying fungus *Armillaria mellea*. Eur. J. For. Path. 26 : 160-165.
- Jung T., Blaschke H., Neumann P. 1996. Isolation, identification and pathogenicity of *Phytophthora* species from declining oak stands. Eur. J. For. Path. 26 : 253-272.
- Jung T., Blaschke H., Oswald W. 2000. Involvement of soilborne *Phytophthora* species in central European oak decline and the effect of site factors on the disease. Plant Pathol. 49 : 706-718.
- Korhonen K. 1978. Interfertility and clonal size in the *Armillariella mellea* complex. Karstenia 20 : 31-42
- Kreisel H. 1961. Die phytopathogenen Grosspilze Deutschlands. VEB gustav Fisher-Verlag, Jena, Deutschland 284 pp.
- Kuhlman E. G. 1980. Influence of moisture on rate of decay of loblolly pine root wood by *Heterobasidion annosum*. Can. J. Bot. 58 : 36-39.

- Lafouge R. 1990. Sylviculture comparée du chêne rouvre et du chêne pédonculé dans les forêts gérées par l'Office National des Forêts. Rev. For. Fr. 42 : 269-275.
- Landmann G. 1988. Comment apprécier la vitalité d'un arbre ou d'un peuplement forestier ? Rev. For. Fr. 40 : 265-281.
- Landmann G., Becker M., Delatour C., Dreyer E., Dupouey J. L. 1993. Oak dieback in France : historical and recent records, possible causes, current investigations. Rundgespräche der Kommission für Ökologie 5 : 97-114.
- Lévy G., Becker M., Duhamel D. 1992. A comparison of the ecology of pedunculate and sessile oaks: radial growth in the centre and Northwest France. For. Ecol. Manage. 55 : 51-63.
- Lévy G., Toutain F. 1994. Aération et phénomènes d'oxydo-réduction dans les sols, *In* Pedologie. Tome 2. Constituants et propriétés du sol - 2e édition. Bonneau M., Souchier B. (eds.) Masson, Paris, France, pp. 467-478.
- Lewis K. J. 1997. Growth reduction in spruce infected by *Inonotus tomentosus* in central British Columbia. Can. J. For. Res. 27 : 1669-1674.
- Lindberg M. 1992. S and P intersterility groups in *Heterobasidion annosum*; Infection frequencies through bark of *Picea abies* and *Pinus sylvestris* seedlings and in vitro growth rates at different oxygen levels. Eur. J. For. Path. 22 : 41-45.
- Lindberg M., Johansson M. 1992. Resistance of *Picea abies* seedlings to infection by *Heterobasidion annosum* in relation to drought stress. Eur. J. For. Path. 22 : 115-124.
- Luis S., 2001. Impact des facteurs sylvicoles et de la nature du sol sur la sensibilité de *Quercus robur* et *Q. rubra* à *Collybia fusipes*. Rapport de DEA, Université Henry Poincaré Nancy, France 23 p.
- Lung-Escarmant B., Desprez-Loustau M. L., Lousteau D., Capron G. 2002. Effect of nutrient and water stress on pine susceptibility to *Armillaria ostoyae*. *In* 10<sup>th</sup> International Conference on Root and Butt Rots of Forest Trees. Québec (Canada), September 16-22, 2001 (poster, sous presse).
- Macaire A. 1984. Le dépérissement du chêne pédonculé en forêt communale d'Amance (Aube). Rev. For. Fr. 35 : 201-205.
- Mallett K. I. Maynard D. G. 1998. Armillaria root disease, stand characteristics, and soil properties in young lodgepole pine. For. Ecol. Manage. 105 : 37-44.
- Manion P. D. 1991. Decline diseases of complex biotic and abiotic origin. *In* Tree disease concepts. Prentice Hall Inc., N. Jersey, USA pp. 328-348.
- Marçais B. 2001. Impact de la Collybie à pied en fuseau en chênaie - Etude des facteurs conditionnant la gravité des attaques. Rapport final du contrat ONF (Convention ONF-INRA B01574 1997-00) 12p.
- Marçais B., Caël O. 2000. Comparison of the susceptibility of *Quercus petraea*, *Q. robur* and *Q. rubra* to *Collybia fusipes*. Eur. J. Plant Pathol. 106 : 227-232.
- Marçais B., Caël O. 2001. Relation between *Collybia fusipes* root rot and growth of pedunculate oak. Can. J. For. Res. 31 : 757-764.
- Marçais B., Delatour C. 1996. Inoculation of oak (*Quercus robur* and *Q. rubra*) with *Collybia fusipes*. Plant Dis. 80 : 1391-1394.
- Marçais B., Dupuis F., Desprez-Loustau M. L. 1993. Influence of water stress on susceptibility of red oak (*Quercus rubra*) to *Phytophthora cinnamomi*. Eur. J. For. Path. 23 : 295-305.

- Marçais B., Caël O., Delatour C., 1998a. Investigations on the distribution and impact of *Collybia fusipes* in Oak forest. In 9<sup>th</sup> International Conference on Root and Butt Rots of Forest Trees. Delatour C., Guillaumin J.J., Lung-Escarmant B., Marçais B. (eds.) Carcans-Maubuisson (France), September 1-7, 1997. Colloques de l'INRA n°89, INRA, France pp. 215-222.
- Marçais B., Martin F., Delatour C. 1998b. Structure of *Collybia fusipes* population in two infected oak stands. Mycol. Res. 102 : 361-367.
- Marçais B., Caël O., Delatour C. 1999. Measuring the impact of *Collybia fusipes* on the root system of oak trees. Ann. For. Sci. 56 : 227-235.
- Marçais B., Caël O., Delatour C. 2000. Relationship between presence of basidiomes, above-ground symptoms and root infection by *Collybia fusipes* in oaks. For. Path. 30 : 7-17.
- McLaughlin J. A. 2001. Distribution, hosts, and site relationships of *Armillaria* spp. in central and southern Ontario. Can. J. For. Res. 31 : 1481-1490.
- Michalakis Y., Olivieri I., Renaud F., Raymond M. 1992. Pleiotropic action of parasites : how to be good for the host. Tree 7 : 59-62.
- Morrison D. J. 1976. Vertical distribution of *Armillaria mellea* rhizomorphs in soil. Trans. Br. mycol. Soc. 66 : 393-399.
- Nageleisen L. M. 1993. Les dépérissements d'essences feuillues en France. Rev. For. Fr. 45 : 605-620.
- Nageleisen L. M. 1995. Méthode d'évaluation de l'aspect du houppier (protocole DEPEFEU). Département Santé des Forêts-Echelon technique Nord-Est. Bulletin technique: 11.
- Oosterbaan A., Nabuurs G. J. 1991. Relationships between oak decline and groundwater class in the Netherlands. Plant and Soil 136 : 87-93.
- Parks C. G., Filip G. M., Hansen E. M. 1994. The influence of water stress and insect defoliation on the development of disease in *Abies grandis* seedlings inoculated with *Armillaria ostoyae*. In 8<sup>th</sup> International Conference on Root and Butt Rots of Forest Trees. Johansson M., Stenlid. J. (eds.) Wik (Sweden) and Haikko (Finland), August 9-16, 1993. Swed. Univ. Agri. Sci., Sweden pp. 52-64.
- Pearce M.H., Malajczuk N. 1990. Factors affecting growth of *Armillaria luteobubalina* rhizomorphs in soil. Mycol. Res. 94 : 38-40.
- Piou D., Delatour C., Marçais B. 2002. Hosts and distribution of *Collybia fusipes* in France. For. Path. 32 : 29-41.
- Piri T. 2000. Response of compensatory-fertilised *Pinus sylvestris* to infection by *Heterobasidion annosum*. Scand. J. For. Res. 15 : 218-224.
- Ponton S., Dupouey J.L., Bréda N., Dreyer E. 2002. Comparison of water-use efficiency of seedlings from two sympatric oak species: genotype x environment interactions. Tree Physiology 22: 413-422.
- Praag H. J., Weissen F. 1982. Aspects fonctionnels et écologie des sols hydromorphes forestiers. Pédologie 32 : 273-284.
- Ragazzi S., Dellavale-Fedi I., Mesturini L. 1989. The oak decline: a new problem in Italy. Eur. J. For. Path. 19 : 105-110.

- Ragazzi S., Vagnicola S., Moricca S. 1995. European extension of oak decline: involved microorganisms and methodological approaches. *Phytopath. Medit.* 34 : 207-226.
- Rameau J. C. 1990. Comportement dynamique du chêne pédonculé et du chêne sessile dans les successions forestières. *Rev. For. Fr.* 42 : 155-164.
- Rameau J. C., Mansion D., Dumé G., Timbal J., Lecointe A., Dupont P., Keller R. 1993. *Quercus*, In Flore forestière française. Guide écologique illustré : 1, Plaines et collines. IDF, France pp. 555-575.
- Redfern D. B. 1978. Infection by *Armillaria mellea* and some factors affecting host resistance and the severity of disease. *Forestry* 51 : 121-135.
- Redfern D. B. 1983. Factors affecting spread of *Heterobasidion annosum* in plantations. In 6<sup>th</sup> International Conference on Root and Butt of Forest Trees. Kile G. A. (ed), Melbourne, Victoria and Gympie (Australia), August 25-31, 1983. CSIRO, Melbourne, Australia pp. 104-109.
- Redfern D. B. 1998. The effect of soil on root infection spread by *Heterobasidion annosum*. In 9<sup>th</sup> International Conference on Root and Butt Rots of Forest Trees. Delatour C., Guillaumin J.J., Lung-Escarmant B., Marçais B. (eds.) Carcans-Maubuisson (France), September 1-7, 1997. Colloques de l'INRA n°89, INRA, France pp. 267-273.
- Rishbeth J. 1978. Effects of soil temperature and atmosphere on growth of *Armillaria* rhizomorphs. *Trans. Br. mycol. Soc.* 70 : 213-220.
- Rishbeth J. 1982. Species of *Armillaria* in southern England. *Plant Pathol.* 31 : 9-17.
- Romagnesi H. 1973. Observations sur les *Armillariella*, II. *Bul. Soc. Mycol. France* 89 : 195-206.
- SAS Institute Inc. (1989) SAS/STAT User's guide, Version 6, Fourth edition, Vol I Cary.
- Shields W., Hobbs S. 1978. Soil nutrient levels and pH associated with *Armillariella mellea* on conifers in northern Idaho. *Can. J. For. Res.* 9 : 45-48.
- Sigaud P. 1986. "Ne parlons plus du chêne mais des chênes". *Rev. For. Fr.* 38 : 376-381.
- Simonin G., Cochard H., Delatour C., Granier A., Dreyer E. 1994. Vulnérabilité of young oak seedlings (*Quercus robur* L.) to embolism: responses to drought and to an inoculation with *Ophiostoma querci* (Geogevitch) Nannf. *Ann. Sci. For.* 51 : 493-504.
- Sinclair W. A. 1964. Comparisons of recent declines of white ash, oak and sugar maple in north-eastern woodlands. *Cornell Plant.* 20 : 62-67.
- Singh P. 1981. *Armillaria mellea*: growth and distribution of rhizomorphs in the forest soils of Newfoundland. *Eur. J. For. Path.* 11 : 208-220.
- Singh P. 1983. *Armillaria* root rot : Influence of soil nutrients and pH on the susceptibility of conifer species to the disease. *Eur. J. For. Path.* 13 : 92-101.
- Siwecki R., Ufnalski K. 1998. Review of oak stand decline with special references to the role of drought in Poland. *Eur. J. For. Path.* 28 : 99-112.
- Steinhoff S. 1993. Results of species hybridization with *Quercus robur* L. and *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. *Ann. Sci. For.* 50 (suppl): 137-143.
- Stenlid J., Redfern D. B., 1998. Spread within the tree and stand, In *Heterobasidion annosum*, Biology, Ecology, Impact and Control. Woodward S., Stenlid J., Karjalainen R., Hüttermann A. (eds.), CAB International, UK pp. 125-143.

- Termorshuizen A. J., Arnolds J. M. 1994. Geographical distribution of the *Armillaria* species in the Netherlands in relation to soil type and hosts. *Eur. J. For. Path.* 24 : 129-136.
- Thomas F. M., Hartmann G. 1998. Tree rooting patterns and soil water relations of healthy and damaged stands of mature oak (*Quercus robur* L. and *Quercus petraea* Liebl.). *Plant and Soil* 203 : 145-158.
- Thomas F. M., Blank R., Hartmann G. 2002. Abiotic and biotic factors and their interactions as causes of oak decline in Central Europe. *For. Path.* 32 : 277-307.
- Varga F., 1993. The role of biotic and abiotic factors on oak decline in Hungary. *In* International congress on Recent Advances in Studies on Oak Decline. Luisi N., Lerario P., Vannini A. (eds.), Selva di Fasano (Italy), September 13-18, 1992 pp. 229-234.
- Vivin P., Aussenac G., Lévy G. 1993. Differences in drought resistance among three deciduous oak species grown in large boxes. *Ann. Sci. For.* 50 : 221-233.
- Wagner P.A., Dreyer E. 1997. Interactive effects of water-logging and irradiance on the photosynthetic performance of seedlings from three oak species displaying different sensitivities (*Quercus robur*, *Q. petraea* and *Q. rubra*). *Ann. Sci. For.* 54 : 409-429.
- Wahlström K. T., Barklund P. 1994. Spread of *Armillaria* spp. and *Heterobasidion annosum* in Norway spruce exposed to drought, irrigation and fertilisation. *In* 8<sup>th</sup> International Conference on Root and Butt Rots of Forest Trees. Johansson M., Stenlid. J. (eds.) Wik (Sweden) and Haikko (Finland), August 9-16, 1993. Swed. Univ. Agri. Sci., Sweden pp. 582-591.
- Wargo P. M. 1972. Defoliation-induced chemical changes in sugar maple roots stimulate growth of *Armillaria mellea*. *Phytopathology* 62 : 1278-1283.
- Wargo P. M. 1984. How stress predisposes trees to attack by *Armillaria mellea* – a hypothesis. *In* 6<sup>th</sup> International Conference on Root and Butt of Forest Trees. Kile G. A. (ed), Melbourne, Victoria and Gympie (Australia), August 25-31, 1983. CSIRO, Melbourne, Australia pp. 115-122.
- Wargo P. M., Harrington T.C. 1991. Host stress and susceptibility, *In* *Armillaria Root Disease*. U.S.D.A Forest Service, Washington, USA, pp. 88-101.
- Waring R. 1983. Estimating forest growth and efficiency in relation to canopy leaf area. *Adv. Ecol. Res.* 13 : 327-354.
- Whitney R. D. 1984. Site variation of *Armillaria mellea* in three Ontario conifers. *In* 6<sup>th</sup> International Conference on Root and Butt Rots of Forest Trees. Kile G. A. (ed), Melbourne, Victoria and Gympie (Australia), August 25-31, 1983. CSIRO, Melbourne, Australia pp. 122-130.
- Wienscyk A. M., Dumas M. T., Irwin R. N. 1997. Predicting *Armillaria ostoyae* infection levels in black spruce plantations as a function of environmental factors. *Can. J. For. Res.* 27 : 1630-1634.



## PUBLICATION I

---

### Soil factors associated with infection by *Collybia fusipes* and decline of oaks

---

C. CAMY<sup>1</sup>, D. de VILLEBONNE<sup>2</sup>, C. DELATOUR<sup>1</sup> and B. MARÇAIS<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Unité de Pathologie Forestière, INRA, Centre de Nancy, F54280, Champenoux, France

<sup>2</sup> Département de la Santé des Forêts, DERF, 93 rue de Curembourg, F45404, Fleury-les-Aubrais, France

**Mots clés:** *Quercus* / *Collybia fusipes* / pourridié / dépérissement du chêne/ facteurs édaphiques

— Accepté pour publication dans : 'Forest Pathology' —

# Soil factors associated with infection by *Collybia fusipes* and decline of oaks

By C. CAMY<sup>1</sup>, D. de VILLEBONNE<sup>2</sup>, C. DELATOUR<sup>1</sup> and B. MARÇAIS<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Unité de Pathologie Forestière, INRA, Centre de Nancy, F54280, Champenoux, France

<sup>2</sup> Département de la Santé des Forêts, DERF, 93 rue de Curembourg, F45404, Fleury les Aubrais, France

**Short title:** *Collybia fusipes*, oak decline and soil factors

## Summary

*Collybia fusipes* is the cause of a root rot of oaks in Europe. Infection by the pathogen is site dependent and inconsistently correlated with crown deterioration. This study aimed at clarifying the relationship between soil factors and *C. fusipes* impact on tree health. The database of the Département de la Santé des Forêts, the forest health survey service, collected over the French forest during the last 12 years allowed us to perform a large scale study dealing with soil textures in which *C. fusipes* was reported to induce problems on *Quercus robur* and/or *Q. petraea*. Furthermore, a specific survey from 30 plots in north eastern France was carried out to determine which of the soil factors, such as texture, degree of waterlogging, presence and nature of a layer limiting rooting, carbon/nitrogen ratio, cation exchange capacity, or pH could be related to an increased risk of decline of pedunculate oaks infected by *C. fusipes*. The main results were that *C. fusipes* is preferentially distributed on coarse textured soils and that its impact on tree crown appearance also increased with the soil sand content.

## 1 Introduction

*Collybia fusipes* (Bull.:Fr) Quél. is the cause of an oak root rot in Europe. This fungus has been first mentioned in association with the decline of pedunculate oak around 1980 (DELATOUR and GUILLAUMIN 1984, GUILLAUMIN *et al.* 1985). *C. fusipes* is widespread throughout the French oak forests (MARÇAIS *et al.* 1998-a, PIOUS *et al.* 2002). Its basidiomes are frequent from spring to autumn, occurring in clumps at the base of living trees. The basidiome clumps are connected to infected roots through a perennial organ, the pseudorhiza (BULLER 1958). Based on field surveys, MARÇAIS *et al.* (2000) and PIOUS *et al.* (2002) have shown that *C. fusipes* basidiomes are good indicators of root infection. A research program was initiated 10 years ago to determine the role of this pathogen in the oak decline syndromes and to find in which type of site it could be an important factor involved in the decline process.

*C. fusipes* is a slow primary parasite able to induce typical orange lesions located on large roots and root collar. It can induce a drastic destruction of the root system (MARÇAIS and DELATOUR 1996, MARÇAIS *et al.* 1999). Disease frequency is higher in pedunculate (*Quercus robur* L.) and red oak stands (*Q. rubra* L.) as compared to the sessile oak ones (*Q. petraea* Liebl.) (MARÇAIS *et al.* 1998-a, PIOUS *et al.* 2002), reflecting different susceptibility of these three oak species to the parasite (MARÇAIS and CAËL 2000). Field observations also showed that this parasite have a higher incidence in coarse textured soils (unpublished data). A field study carried out in five oak stands, evidenced that severe *C. fusipes* root infection could not always be correlated with deterioration of oak crown. The causes of this inconsistent relationship between infection of the oak and their decline still remained unclear, although it appeared that it could be related with coarseness of the soil texture, and possibly to its water holding capacity (MARÇAIS *et al.* 2000). However, although severe root infections induced by *C. fusipes* were not always associated with a deterioration of the tree crown, they were associated with a reduction in tree growth in all the stands studied (MARÇAIS and CAËL 2001). Soil conditions, in particular soils with coarse texture have been mentioned to be related with increasing impact and incidence of root rot diseases, such as those induced by *Armillaria ostoyae* (MALLETT and MAYNARD 1998, Whitney 1984, WIENSCYK *et al.* 1997) or *Heterobasidion annosum* (ALEXANDER *et al.* 1975, BAKER *et al.* 1993, FROELICH *et al.* 1966).

This study aimed at clarifying which soil conditions promote *C. fusipes* incidence in oak stands. At first, the relationship between soil texture, decline of oaks and *C. fusipes* was studied at a large scale using data collected during the last 12 years by the Département de la Santé des Forêts (DSF), the French forest health survey service. Thereafter, a specific survey was carried out in north eastern France to determine which soil factors could be related with an increased risk in the decline of pedunculate oaks infected with *C. fusipes*.

## **2 Materials and methods**

### **2.1 Analysis of the database of the French forest health survey service (DSF)**

#### **a) Information available in the DSF database**

The database of the DSF was used to study in which type of site *C. fusipes* root rot was reported to cause problems in France on *Q. robur* and/or *Q. petraea*. This database, created in 1989, is constituted by reports made by a network of foresters who are trained to diagnose all types of forest health problems *i.e.* abiotic, entomological or pathological. Health problems of *Q. robur* and/or *Q. petraea* were reported 10 000 times between 1989 and 2001, with 161 reports involving *C. fusipes* root rot. The majority of reports in the database refers to defoliation by insects (61 %), powdery mildew (8 %), decline (8.5 %) and frost damages (5 %). Site characteristics used in this study were stand age, soil texture, degree of soil waterlogging and the dominant oak species. Soil textures were reported as clay, loam or sand as dominant and secondary textures. They were grouped in the following categories according to the overall frequency: (1) clay as dominant and clay or loam as secondary textures, (2) loam as dominant and clay as secondary texture, (3) loam as both dominant and secondary texture, (4) loam as dominant and sand as secondary texture and (5) sand as dominant and loam or sand as secondary textures. Waterlogging was reported as severe or non severe logging. Not all reports contained the necessary information, so only those including this information were considered in the analysis.

#### **2.1.1 Database investigations**

As *C. fusipes* is known to be mainly a problem of mature trees (MARÇAIS *et al.* 1998-a) and as no mention of the pathogen was made in young stands, only reports referring to mature stands, or to

stands older than 80 years, or higher than 15 m where taken into account. Care was also taken to consider stands only once when problems were reported in the same stand over several years.

In the DSF database, the stand characteristics of *C. fusipes* reports were first compared to those of health problems reports other than *C. fusipes*.

The distribution of soil textures in stands where *C. fusipes* is mentioned in the DSF database was also compared with the one observed in the *Q. robur* / *Q. petraea* stands of the French part of the European forest health monitoring network (ICP-Forests, International Co-operative Programme on Assessment and Monitoring of Effects of Air Pollution on Forest), hereafter called 'European network'. This network is established in a systematic way, on a 16 km x 16 km grid and was used to establish the reference distribution of soil texture over the French oak forest. Because the trained foresters of the DSF are very unevenly distributed throughout the whole territory, it induces a bias in the distribution of the *C. fusipes* reports which differs significantly from the oak stand distribution observed in the European network. To take this 'observer bias' into account, France was divided into five areas and a weight was attributed to DSF reports of each areas. This weight for each area was computed as  $PA_{en} / PA_{r-dsf}$ , where  $PA_{en}$  is the proportion of the oak stands found in the European network for a specific area and  $PA_{r-dsf}$  the proportion of DSF reports concerning *Q. robur* / *Q. petraea* for this area. This way a large weight was attributed to reports coming from an area with few reports on oak relative to its importance in the french oak forest.

The soil texture of sites where *C. fusipes* was associated with oak decline was also compared to soil texture of sites where *C. fusipes* was not associated with decline, using chi-square tests. A report of *C. fusipes* was considered to be associated with a decline problem whenever either a decline was explicitly reported, mortality or secondary organisms such as *Agrilus* sp. or *Armillaria* sp. were reported and when the report was stated to concern more than only isolated trees.

## 2.2 Plot survey

Thirty oak stands were selected in north eastern France, to obtain plots where *C. fusipes* was frequent, *i.e.* infecting at least 25% of the trees. Twelve of these plots were also reported in the DSF database. Half of the plots were pure stands of pedunculate oaks, while the other half were stands of

Table 1. Description of plot characteristics of the plot survey

Plot	France area	Nb oaks (%infected)	Stand	Soil layer limiting rooting	%sand	pH	Quercus species
Adelans	Haute-Saône	41 (27)	Old coppice with beech and oak standards	None until 120 cm	7.8	4.8	<i>Q. robur</i>
Ainville 1	Haute-Saône	38 (32)	Old coppice with oak standards	None until 120 cm	17.8	4.5	<i>Q. robur</i>
Ainville 2	Haute-Saône	42 (36)	Old coppice with oak standards	Gravel layer 80 cm	47.2	4.1	<i>Q. robur</i>
Ainville 3	Haute-Saône	40 (38)	Old coppice with oak standards	None until 120 cm	65.2	4.3	<i>Q. robur</i>
Amance	Meurthe-et-Moselle	34 (32)	Old coppice with oak standards	Clayey hardpan 70 cm	10.5	5.7	<i>Q. robur</i>
Saint Aubin 1	Jura	40 (38)	Old coppice with oak standards	Fragipan 50 cm	9.5	4.8	<i>Q. robur</i>
Saint Aubin 2	Jura	38 (42)	Old coppice with oak standards	Fragipan 50 cm	9.5	4.8	<i>Q. robur</i>
Les Aynans 7	Haute-Saône	33 (45)	Old coppice with oak standards	Clayey hardpan 70 cm	20.1	4.2	<i>Q. robur</i>
Les Aynans 28	Haute-Saône	39 (33)	Coppice with oak standards	Gravel layer 70 cm	57.5	4.1	<i>Q. robur</i>
Les Aynans 35	Haute-Saône	42 (40)	Old coppice with oak standards	Gravel layer 80 cm	56.2	4.5	<i>Q. robur + Q. petraea</i>
Champagney	Haute-Saône	39 (28)	Beech and oak standards	None until 120 cm	46.4	4.2	<i>Q. robur</i>
Champenoux	Meurthe-et-Moselle	40 (33)	Old coppice with oak standards	Clayey hardpan 60 cm	8.7	5	<i>Q. robur</i>
Equevilley	Haute-Saône	42 (38)	Old coppice with beech and oak standards	None until 120 cm	40.6	4.5	<i>Q. robur</i>
Filain	Haute-Saône	50 (8)	High forest of oaks	Clayey hardpan 75 cm	3.6	5.8	<i>Q. robur + Q. petraea</i>
Gouhenans	Haute-Saône	32 (31)	Old coppice with beech and oak standards	None until 120 cm	8.1	4.7	<i>Q. robur</i>
Gremecey	Meurthe-et-Moselle	38 (39)	Old coppice with oak standards	Clayey hardpan 50 cm	2.3	4.4	<i>Q. robur + Q. petraea</i>
Hautevelle	Haute-Saône	42 (33)	Old coppice with beech and oak standards	Clayey hardpan 80 cm	17.3	5.3	<i>Q. robur + Q. petraea</i>
Saint Hilaire	Doubs	28 (50)	Old coppice with beech and oak standards	Fragipan 80 cm	11.2	4.9	<i>Q. robur + Q. petraea</i>
Lure	Haute-Saône	38 (47)	Old coppice with beech and oak standards	Gravel layer 60 cm	47.5	4.7	<i>Q. robur</i>
Mailleroncourt	Haute-Saône	41 (39)	High forest of beech and oaks	Gravel layer 70 cm	8.6	4.8	<i>Q. robur</i>
Mersuay 36	Haute-Saône	41 (44)	Old coppice with oak standards	Gravel layer 70 cm	62.5	4.5	<i>Q. robur</i>
Mersuay 5	Haute-Saône	50 (22)	Old coppice with oak standards	Gravel layer 70 cm	26.7	5.2	<i>Q. robur</i>
Roye	Haute-Saône	47 (53)	High forest of oaks and beeches	None until 120 cm	16.1	4.5	<i>Q. robur</i>
La Tour de Sçay	Doubs	35 (31)	Old coppice with beech and oak standards	Gravel layer 90 cm	32.3	4.4	<i>Q. petraea + Q. robur</i>
Vauvillers 1	Haute-Saône	39 (26)	Old coppice with beech and oak standards	Clayey hardpan 70 cm	7.8	5.2	<i>Q. robur</i>
Vauvillers 2	Haute-Saône	40 (33)	Old coppice with beech and oak standards	Clayey hardpan 70 cm	10.2	5	<i>Q. robur</i>
Villers Grélot	Doubs	38 (34)	Old coppice with beech and oak standards	None until 120 cm	3.7	4.8	<i>Q. robur + Q. petraea</i>
Villey St Etienne	Meurthe-et-Moselle	51 (41)	Old coppice with oak standards	Gravel layer 60 cm	68.4	4.3	<i>Q. robur</i>
Vitrimont	Meurthe-et-Moselle	43 (51)	High forest of oaks and beeches	Gravel layer 80 cm	64.2	4.1	<i>Q. robur + Q. petraea</i>
Vy les Lures	Haute-Saône	41 (44)	Coppice with oak standards	Fragipan 90 cm	10.7	5.4	<i>Q. robur</i>

NOTE: the sand content was evaluated at 30 cm under the soil surface with sulfochromic method. The pH at 10 cm under the soil surface was measured from 10 g of dry soil in 50 ml of deionized water.

pedunculate oaks mixed with sessile oaks or beech (*Fagus sylvatica* L.). Stands were all older than 90 years. Soil textures, pH and the vertical rooting limits were variable between plots (Table 1).

In each plot, a group of 28 to 51 contiguous pedunculate oaks located in an area of about 5000 m<sup>2</sup> was selected (Table 1). All the pedunculate oaks present were selected, independently from their social status. The oak species was determined based on leaf morphology observed with binoculars. In mixed oak stands, sessile oaks were not included in the sample. During the period of basidiome production, presence/absence of *C. fusipes* infection was assessed for each tree. The root collar and the major roots were carefully inspected for presence of basidiomes or pseudorhiza. Pseudorhizae are persistent dark stroma-like fungal structures of 2-5 cm diameter that connect *C. fusipes* basidiome clusters with the root (BULLER 1958).

Crown health status was assessed for each tree. It was rated in two categories, *i.e.* heavily or not declining according to an adaptation of the rating system proposed by NAGELEISEN (1995): (0) crown healthy or moderately declining, with less than 50% defoliation; (1) crown severely declining, with large dead limbs in the upper part of the crown and/or loss of more than 50% of fine branches.

On each plot, a pit was dug near a tree located in the middle of the sampled oaks to observe soil characteristics. Soils were described specifically for the degree of waterlogging, *i.e.* depth at which appear the first hydromorphia signs (reddish traces of insoluble oxidized iron deposition and / or discoloration indicating iron depletion) and for the presence and nature of a soil layer susceptible to limit vertical root growth. The vertical rooting limits were rated in 4 categories: absence of limits, presence of a gravel layer, a clayey hardpan or a fragipan (compacted silt). These soil parameters were also described at the base of two oaks located on opposite sides of the tree group by observation of a soil core extracted with an earth auger. The depth to waterlogging signs and to the layer limiting root vertical growth was taken into account as the mean of the three values observed in each group of trees. In each plot a sample of soil from a depth of 10 cm was analysed for carbon and organic matter (sulfochromic method), total nitrogen (Kjeldahl method), cation exchange capacity (cobaltihexamin method) and pH (10 g of dry soil in 50 ml of deionized water). An other soil sample, from a depth of 30 cm, was analysed in the laboratory for texture. All these soil analyses were carried out following the AFNOR norms for soil quality assessment (AFNOR 1999).

### 2.3 Statistical analysis

For the DSF database, the comparison of the *C. fusipes* distributions between soil texture categories was performed by using chi-square tests whenever the frequency was sufficient or by Fisher's exact tests otherwise.

For the specific plot survey, the likelihood of oak decline was analysed using logistic regression based on soil factors (sand content, depth at which appear the first waterlogging signs hereafter called waterlogging depth, soil pH, presence and nature of a soil layer limiting rooting, carbon/nitrogen ratio or cation exchange capacity) and the presence of *C. fusipes* infection signs as independent variables (genmod procedure) (SAS 1989). At first, each soil factor was tested individually, together with the presence or absence of infection signs by *C. fusipes* and the interaction between the studied soil factor and the infection variable. The model used was:

$$(1) \quad \text{Log} (p / (1-p)) = \alpha + \beta \text{ soil factor} + \gamma \text{ infection} + \delta (\text{soil factor} \times \text{infection})$$

where  $p$  is the likelihood of a tree being declining, 'soil factor' is the soil characteristic studied and 'infection' is the presence or absence of infection signs by *C. fusipes*. A sequence of nested models were fitted, beginning with the simplest model with only the intercept term and continuing through models of increasing complexity *i.e.* type 1 analysis. Residual deviancies were computed for each successive model and the significance of the last introduced variable was assessed by computing the Pvalue of the deviance decrease associated with the introduction of the new variable (COLLETT, 1991). The model validity was checked using the deviance/degrees of freedom ratio, by plotting deviance residuals against the linear predictor and using a half-normal plot (COLLETT, 1991). Whenever a significant interaction 'soil factor x infection' was observed, *i.e.* whenever the impact of infection on tree decline status depended on the soil characteristic, the odds ratio  $\exp((\gamma + \delta \times \text{soil factor}) \times \text{infection})$  was computed (with "infection" taking the value of 1. This odds ratio is an estimate of the relative risk of decline for infected oaks, *i.e.* the increase in the likelihood of oaks showing signs of *C. fusipes* infection to be declining as compared to oaks without infection signs.

Then, the model (1) with the percent of sand content as a soil factor was compared with 2 more complex models: (i) the model (1) with waterlogging depth and the interaction



Table 2. Soil texture distribution for the DSF reports on oak concerning *C. fusipes* or other health problems, as well as the soil texture distribution observed for the oak stands of the European network. Textures are given as dominant (C: clay, L: loam or S: sand) and secondary texture (c: clay, l: loam or s: sand).

Reports of :	Soil textures					Total No.
	C to Cl	Lc	L	Ls	Sl to S	
<i>C. fusipes</i> (DSF)	10.1 %	25.5 %	13.2 %	8.4 %	42.8 %	81
<i>Q. robur</i> Other problems than <i>C. fusipes</i> (DSF)	34.0 %	29.2 %	15.4 %	12.6 %	8.8 %	879
European Network	10.4 %	33.3 %	16.7 %	10.4 %	29.2 %	48
<i>C. fusipes</i> (DSF)	48.4 %	25.4 %	5.3 %	6.7 %	14.2 %	38
<i>Q. petraea</i> and mixed <i>Q. robur</i> <i>C. fusipes</i> (DSF)	33.1 %	33.3 %	10.6 %	10.7 %	12.3 %	1523
/ <i>Q. petraea</i> European Network	21.9 %	29.2 %	12.5 %	11.4 %	25.0 %	96

infection x waterlogging depth as additional variables; (ii) the model (1) with the surface soil pH and interaction infection x soil pH as additional variables. The collinearity between the soil factors was assessed by comparing the residual deviance of model (i) or (ii) with the one of model 1 and testing whether the introduction of additional variables in those 2 models was associated with a significant drop in deviance.

### 3 Results

#### 3.1 Analysis of the database of the French forest health survey service (DSF)

In the DSF database, presence of *C. fusipes* was mainly reported in *Q. robur* stands (67 %) and to a lower extension in *Q. petraea* or mixed *Q. robur/Q. petraea* stands (16-17% each). This distribution is significantly different from the one found for reports concerning health problems other than *C. fusipes*. Indeed, *C. fusipes* reports represent 8.5 % of the overall reports for *Q. robur*, 3.9 % for *Q. petraea* and 1.8 % for mixed *Q. robur/Q. petraea* stands ( $\chi^2 = 56.05$ ,  $df = 2$ ,  $p$  value lower than 0.001). The difference is even greater if one consider the *C. fusipes* reports associated with decline: they represent 5.4 % of the reports for *Q. robur*, 1.2 % for *Q. petraea* and 0.9 % for mixed *Q. robur/Q. petraea* stands. For the following analysis *C. fusipes* reports on *Q. petraea* and mixed *Q. robur/Q. petraea* were grouped together because of too low frequencies.

Only 87 reports (3.5 %) give information about the degree of waterlogging. So, the severity of waterlogging was not available for most of the reports. No significant relationship could be established between waterlogging and the incidence of *C. fusipes*, although 1.7% of the reports dealing with waterlogged soil were associated with the occurrence of *C. fusipes* and 3.6% with health problems others than *C. fusipes* (Fisher's exact test of 0.92,  $p$  value = 0.144).

For *Q. robur*, Table 2 shows that *C. fusipes* reports were distributed in categories of soil texture differently from the ones of the reports dealing with other kind of problems ( $\chi^2 = 89.22$ ,  $df = 4$ ,  $p$  value lower than 0.001). This was due to the infrequent mention of *C. fusipes* in fine textured soils (clay to loamy clay) and its large representation in coarse textured ones (loamy sand to sand). A similar tendency is observed for the distribution in the soil texture categories of *C. fusipes* reports on *Q. robur* as compared with that of *Q. robur* European network stands, although the difference was not

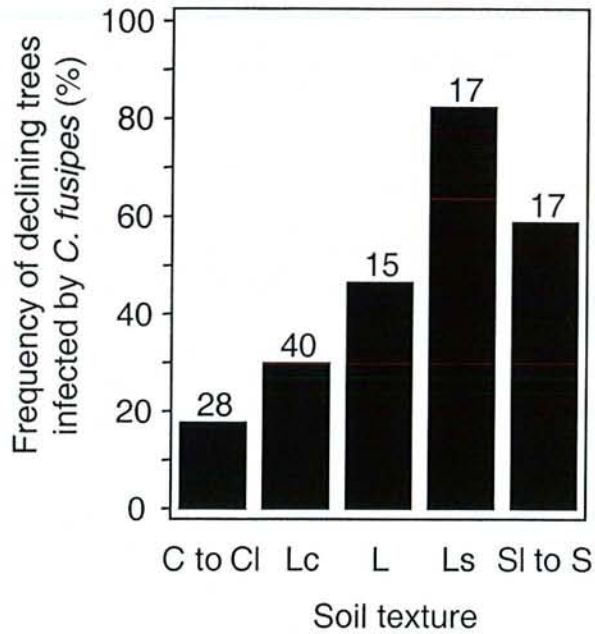


Fig. 1. Frequency of *C. fusipes* reports associated with oak decline in relation with soil textures. C, clay; Cl, loamy clay; L, Loam; Ls, sandy loam; Sl, loamy sand; S, sand. The total number of reports on which the frequency was computed are indicated above the bars.

Table 3. Logistic regression analyses showing relationships between oak crown health status (rated as severely declining or healthy to moderately declining) and presence of *C. fusipes* infection signs, soil sand content, depth to waterlogging signs (traces of oxydized or depleted iron) and soil pH.

Model	Source	Deviance	Df	Chi-Square	Pr > Chi-Square
1	intercept	151.6	-	-	-
	infection	101.3	1	50.29	< 0.001
	sand content	77.4	1	23.88	< 0.001
	infection X sand content	70.4	1	7.02	0.008
2	intercept	151.6	-	-	-
	infection	101.3	1	50.29	< 0.001
	waterlogging	94.3	1	7.01	0.008
	infection X waterlogging	89.8	1	4.50	0.034
3	intercept	151.6	-	-	-
	infection	101.3	1	50.29	< 0.001
	pH	97.2	1	4.05	0.044
	infection X pH	62.1	1	5.15	0.023

significant ( $\chi^2 = 7.61$ ,  $df = 4$ ,  $p$  value of 0.107). By contrast, for *Q. petraea* and mix *Q. robur/Q. petraea* stands, no difference in frequency distribution in terms of soil texture was observed between DSF reports of *C. fusipes* problems or of other problems ( $\chi^2 = 4.83$ ,  $df = 4$ ,  $p$ value = 0.305, Table 2). The DSF reports of *C. fusipes* were more frequent than expected in fine textured soils as compared to oak stand frequency distribution in the European network (Table 2,  $\chi^2 = 16.02$ ,  $df = 4$ ,  $p$  value = 0.003).

The frequency of *C. fusipes* reports associated with decline symptoms increased with the coarseness of the soil texture (Fig. 1) ( $\chi^2 = 22.65$ ,  $df = 4$ ,  $p$  value lower than 0.001). The relationship was similar for all types of stands (*Q. robur*, *Q. petraea* or mixed *Q. robur/Q. petraea*), so data of all stand types were pooled. The cases of oak decline associated with *C. fusipes* represented 9.3 % of the oak declines reported in the data base. However, if one take into account only decline reports on coarse soils (sandy loam to sandy texture) where *C. fusipes* root rot was shown to be more narrowly associated with decline, they represent 4.5 % of the decline reports over all oak species and 7.4 % of the decline reports on *Q. robur*.

### **3.2 Plot survey : influence of soil factors on the relative decline risk for oaks infected with *C. fusipes***

Altogether, 17% of oaks that showed signs of *C. fusipes* infection were rated as severely declining. However, this percentage varied among plots between 0 and 60%. By contrast, the proportion of oaks with no signs of infection that were severely declining was of 5% and varied between 0 and 13%.

The decline likelihood of oak was significantly influenced by signs of *C. fusipes* infection, soil sand content, pH and waterlogging depth (Table 3). No influence of cation exchange capacity, carbon/nitrogen ratio or the nature of soil layer limiting rooting was observed on the decline likelihood of oak with signs of *C. fusipes* infection (*i. e.* the interaction 'soil factor x *C. fusipes* infection' was not significant for these soil characteristics; results not shown). Conversely, the interaction between *C. fusipes* infection and soil factors such as sand content, waterlogging depth or pH was significant (Table 3). Indeed, Fig. 2 shows that the frequency of declining oaks with signs of *C. fusipes* infection increased with soil sand content, waterlogging depth and decreasing soil pH. These soil characteristics did not influence the decline frequency of oaks showing no signs of *C. fusipes* infection.

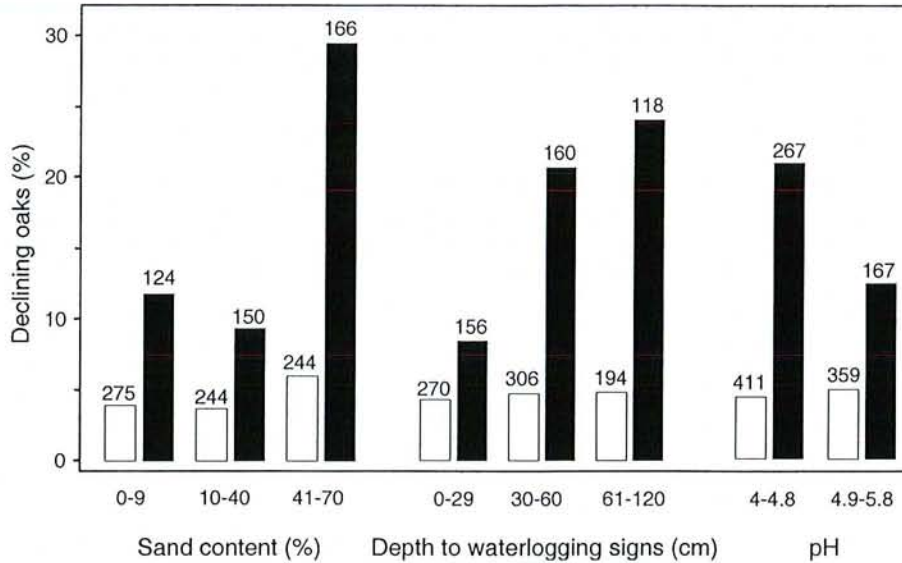


Fig. 2. Percentage of declining pedunculate oaks for different soil sand content, depth to first waterlogging signs (traces of oxydized iron or depleted iron) or pH. Oaks non infected (□) and infected (■) by *C. fusipes*. Sand content of soil, depth to waterlogging signs and soil pH have been categorised. The total number of oaks in each category is given above the bars.

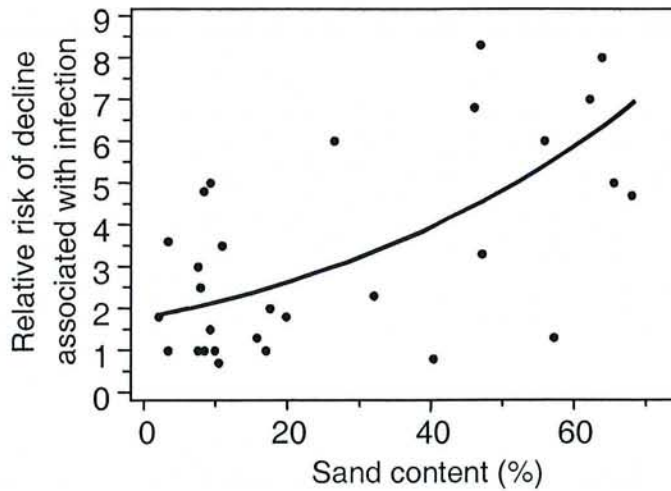


Fig. 3. Estimation of the relative decline risk for pedunculate oaks infected by *C. fusipes* in relation to soil textures. The line represents the odds ratio computed as:  $\exp(0.57 + 0.025 \times \text{sand content})$ . The fitted logistic model equation was:  $\log(p / (1 - p)) = -3.17 + 0.006 \times \text{sand content} + 0.57 \times \text{infection} + 0.025 \times \text{sand content} \times \text{infection}$ . To compute the relative risk, whenever no declining tree was present within trees without signs of *C. fusipes* infection, the frequency of decline for non infected was taken as 4 % which represent the mean decline rate of non infected trees for all studied plots.

There was a strong colinearity between these three soil factors. Significant correlations were observed, especially between soil sand content and the waterlogging depth as well as with soil pH (Pearson's correlation coefficients of 0.52 and – 0.62 respectively, p value both lower than 0.003). Adding the variable 'waterlogging' and the interaction 'infection x waterlogging' to model (1) (Table 3) did not reduce significantly the deviance (likelihood Chi-Square of 0.8, p = 0.67). Similarly, adding the variables 'soil pH' and the interaction 'infection x soil pH' to this model did not result in a significant drop in deviance (likelihood Chi-Square of 1.6, p = 0.45).

The estimates of the odds ratio for the soil sand content, the waterlogging depth or the soil pH are given by the following equations:  $OR(\text{sand}) = \exp(0.57 + (0.025 \times \text{sand content}))$  (Wald test for  $\delta$  of 6.81, p = 0.009);  $OR(\text{waterlogging}) = \exp(0.69 + (0.02 \times \text{depth waterlogging}))$  (Wald test for  $\delta$  of 5.17, p = 0.023);  $OR(\text{pH}) = \exp(6.67 - (1.13 \times \text{soil pH}))$  (Wald test for  $\delta$  of 4.29, p = 0.038). The increase with soil coarseness in relative decline risk for oaks showing signs of *C. fusipes* is illustrated in Figure 3.

## 4 Discussion

Our results clearly show that *C. fusipes* is preferentially distributed in coarse textured soils and that its impact on trees, evaluated through the likelihood of crown decline for infected trees, also increases with the soil sand content.

The DSF database was used to determine the relation between *C. fusipes* incidence and soil textures. Such a comparison is difficult to establish due to the lack of a proper reference. Taking as a reference the problems other than *C. fusipes* reported in the DSF database has the advantage that all site characteristics readily comparable. However, this reference is potentially biased as it refers to sites with health problems. The European network represents a better view of the French oak forest due to its systematic nature. However, it is very difficult to use it as a reference because of the very uneven distribution of DSF trained foresters in France and also because of the fact that site characteristics are not measured exactly in a similar way in each database. However, both comparisons yielded similar results.

These results agree with a previous study which showed that, at the plot scale, the severity of root damages induced by *C. fusipes* on *Q. robur* increased with an increase in soil sand content but decrease with the degree of waterlogging (CAMY *et al.* 2003-a). Furthermore, our results are in agreement with those of different field surveys concerning other root rot fungi, such as *A. ostoyae*, *H. annosum*, *Inonotus tomentosus* or *Phellinus noxius*. These pathogens appear to have, in sandy soils, an higher incidence (BERNIER and LEWIS 1999; FROELICH *et al.* 1966; CÔTÉ and DESSUREAULT 1994), a preferential distribution (MC LAUGHLIN 2001; TERMORSHUIZEN and ARNOLDS 1994; CHANG and YANG 1998; BLODGETT and WORRALL 1992) or to induce more damages in terms of root infection severity, rate of decline or mortality (ALEXANDER *et al.* 1975; WHITNEY 1984; MALLETT and MAYNARD 1998). Inoculation experiments under controlled conditions also showed that the proportion of infected seedlings by *Armillaria* spp. increased in sandy soils (REDFERN 1978). BAKER *et al.* (1993) also showed that the risk of lethal root rot on *Pinus* after inoculations with *H. annosum* increased in soils with low silt, high sand content and low pH.

The fact that coarse soils are favourable to the presence and the impact of *C. fusipes* could result either from a direct effect on the fungus itself or from an effect on the host tree. Indeed, that could be related to the way *C. fusipes* infects trees. *Collybia* appears to grow along roots mainly through ectotrophic mycelium and secondarily to infect bark (MARÇAIS and DELATOUR 1996). Lesion development is thus strongly subjected to soil conditions. Such an influence of soil conditions on disease evolution have been suggested by RISHBETH (1951) who hypothesised that *H. annosum* incidence decreased in soils rich in organic matter due to the competition with other fungi that are abundant in such soil types. BLENIS *et al.* (1989) showed a direct and positive effect of sandy texture on *A. ostoyae* through a better survival of inoculum in such soils. Similar results were obtained with *C. fusipes* (CAMY *et al.* 2003-b). *C. fusipes* could also be favoured by the good availability in oxygen in sandy textures of soils. Indeed, its growth appeared to be strongly reduced by hypoxia compared to other root rot fungi (CAMY *et al.* 2003-c). Anoxic conditions induced by waterlogging are very unfavourable to *C. fusipes* (PIOU *et al.* 2002, CAMY *et al.* 2003-c). An other hypothesis was expressed by ALEXANDER *et al.* (1975) who demonstrated that conidiospores of *H. annosum* could migrate deeper in soils of high sand content, which might also explain the higher disease incidence in those soils. Indeed, deeper migration of inoculum could increase the probability of spores to reach and infect

roots. This hypothesis could well fit *C. fusipes* biology as this pathogen spreads essentially by the way of basidiospores (MARÇAIS *et al.* 1998-b).

However, the difference in distributions of *C. fusipes* reports on *Q. robur* and *Q. petraea* that we evidenced might indicate that soil texture does not only favour the pathogen itself, but may influence the host-pathogen interaction specifically for *Q. robur*. This might suggest an effect of soil coarseness on the tree itself. Such soils are often poor in nutrients and prone to water shortage in case of drought. These conditions could weaken the host and increase its susceptibility to *C. fusipes*. This could be especially relevant because *Q. robur* was often introduced in sites beyond its optimal ecological range, i.e. in soils poor in nutrients and/or with low water holding capacity (BECKER and LÉVY 1990). Nevertheless, *C. fusipes* is considered to be a primary parasite, since MARÇAIS and DELATOUR (1996) evidenced that young oak seedlings defoliated for two years were less susceptible to *C. fusipes* infection as compared to not defoliated ones. CAMY (2002) was not able to evidence an increased susceptibility of inoculated saplings of *Q. robur* submitted to drought as compared to well watered controls. Also, artificially inoculated mature *Q. robur* growing on coarse textured soils did show a higher susceptibility to *C. fusipes* compared to oaks growing on fine textured soils (CAMY *et al.* 2003-b). It could also be possible that infected oaks with root systems severely reduced are more prone to water stress in coarse textured soils with low water holding capacity. This lower tolerance of *Q. robur* to *C. fusipes* infection on coarse textured soil could lead to more frequent reports of the pathogen on these soils.

This study showed that sites where *C. fusipes* could be a cause of oak decline are sites where mature *Q. robur* occur on coarse textured soils. These situations represent 7.4 % of the *Q. robur* declines reported in the DSF database. These soil types are not considered to be within the normal ecological range of *Q. robur*. In coarse textured soils, where *Q. robur* are suffering decline problems due to *C. fusipes*, the replacement of pedunculate oaks by *Q. rubra* should be avoided, since this species is more susceptible to *C. fusipes* (MARÇAIS and CAËL 2000). By contrast, the replacement of pedunculate oaks by *Q. petraea* could be considered in specific situations, since this species is less susceptible to *C. fusipes* and more resistant to water stress and low nutrient availability (BECKER and LÉVY 1990).



## Acknowledgements

The authors wish to thank O. CAËL, F. BERNARD and G. MARECHAL for their technical assistance. The DSF "corespondant observateurs" were of a great help to find enough heavily *C. fusipes* infected stands and we wish to more specially thank P. GRANDJEAN and P.J. BERNARD for this help. We also wish to thank J.P. RENAUD for reviewing the manuscript. The work reported forms part of PhD thesis submitted to the University of Nancy by the first author and was supported by a grant from the 'Institut National de la Recherche Agronomique' and from the 'Région Lorraine'.

## Résumé

### *Facteurs édaphiques, dépérissement du chêne et infection par Collybia fusipes*

*Collybia fusipes* est à l'origine d'une pourriture racinaire sur chêne en Europe. Les dommages racinaires induits sont corrélés de façon inconstante avec une détérioration de la couronne selon le peuplement. Cette étude a pour but de clarifier les relations entre l'impact de *C. fusipes* sur les chênes, évalué grâce à l'état du houppier, et les facteurs du sol. Pour ceci, la base de données du DSF (Département de la Santé des Forêts Françaises), sur les 12 dernières années, nous a permis d'étudier à large échelle dans quelles textures de sol *C. fusipes* était plus particulièrement liée à des problèmes sanitaires. Une étude plus spécifique, portant sur 30 placettes du nord-est de la France nous a permis de déterminer quels facteurs du sol, texture, degré d'engorgement, présence et nature d'un horizon limitant l'enracinement des arbres, ratio carbone/azote, capacité d'échange cationique ou pH, pouvaient être corrélés à une augmentation du risque de dépérissement chez les chênes infectés par *C. fusipes*. Les résultats ont montré que *C. fusipes* était préférentiellement distribuée sur les sols à textures grossières et que son impact en terme de dépérissement des arbres augmentait avec la teneur en sable du sol.

## References

- AFNOR, 1999, Qualité des sols. Recueil des normes françaises. 4<sup>e</sup> édition, Paris, La Défense, 996 pp.
- ALEXANDER, S.A.; Skelly, J.M.; Morris, C.L., 1975: Edaphic factors associated with the incidence and severity of disease caused by *Fomes annosus* in loblolly pine plantations in Virginia. *Phytopathology* **65**, 585-591.
- BAKER, F.A.; VERBILA, D.L.; HODGES, C.S., 1993: Classification and regression tree analysis for assessing hazard of pine mortality caused by *Heterobasidion annosum*. *Plant Dis.* **77**, 136-139.
- BECKER, M.; LÉVY, G., 1990: Le point sur l'écologie comparée du chêne sessile et du chêne pédonculé. *Rev. For. Fr.* **42**, 148-154.
- BERNIER, D.; LEWIS, K.J., 1999: Site and soil characteristics related to the incidence of *Inonotus tomentosus*. *For. Ecol. Manage.* **120**, 131-142.
- BLÉNIS, P.V.; MULAGA, M.S.; HIRATSUKA, Y., 1989: Soil affects *Armillaria* root rot of lodgepole pine. *Can. J. For. Res.* **19**, 1638-1641.
- BLODGETT, J.T.; WORRALL, J.J., 1992: Site Relationships of *Armillaria* Species in New York. *Plant Dis.* **76**, 170-174.
- BULLER, H.A.R., 1958: The perennial pseudorhiza of *Collybia fusipes*, In: *Researches on Fungi*. Vol. VI. New York Hafner Publishing CO, pp. 374-396.
- CAMY, C. 2002. Influence des facteurs édaphiques et sylvicoles sur le développement du pourridié à Collybie (*Collybia fusipes*) dans la chênaie pédonculée. PhD of University of Nancy I, 88 p.
- CAMY, C.; DELATOUR, C.; MARÇAIS, B., 2003-a Relationships between soil factors, *Quercus robur* health, *Collybia fusipes* root infection and *Phytophthora* presence. *Ann. For. Sci.* (in press).
- CAMY, C.; DELATOUR, C.; CAËL O.; MARÇAIS B., 2003-b Inoculation of mature pedunculate oaks (*Quercus robur*) with the root rot fungus *Collybia fusipes*: relationships with tree vigour and soil factors. *Eur. J. Plant. Pathol.* (in press).
- CAMY, C.; DREYER, E.; DELATOUR, C.; MARÇAIS, B., 2003-c Responses of the root rot fungus '*Collybia fusipes*' to soil waterlogging and oxygen availability. *Mycol. Res.* (submitted).
- CHANG, T.T.; YANG, W.W., 1998: *Phellinus noxius* in Taiwan: distribution, host plants and the pH and texture of the rhizosphere soils of infected oaks. *Mycol. Res.* **102**, 1085-1088.

- COLLETT, D., 1991: MODELING Binary Data. London UK, CHAPMAN and HALL, 369 pp.
- CÔTÉ, E.; DESSUREAULT, M., 1994: Effects of site factors on the occurrence of *Armillaria* root rot disease in black spruce (*Picea mariana* mill.(B.S.P.) ) seed orchards., In: Proc 8th Int. Conf. Root and Butt Rots, Wick, Sweden and Haikko, Finland. August, 9-16, 1993. Ed. by JOHANSSON, M; STENLID, J. Uppsala: Swed. Univ. Agri. Sci.(Sweden) pp. 592-596.
- DELATOUR, C.; GUILLAUMIN, J.J., 1984: Un pourridié méconnu : *Collybia fusipes* (Bull. ex Fr.) Quel. C. R. Acad. Agri. France **70**, 123-126.
- FROELICH, R.C.; DELL, T.R.; WALKINSHAW, C.H., 1966: Soil factors associated with *Fomes annosus* in the Gulf States. For. Sci. **12**, 356-361.
- GUILLAUMIN, J.J.; BERNARD, C.; DELATOUR, C.; BELGRAND, M., 1985: Contribution à l'étude du dépérissement du chêne : pathologie racinaire en forêt de Tronçais. Ann. Sci. For. **42**, 1-22.
- MALLETT, K.I.; MAYNARD, D.G., 1998: *Armillaria* root disease, stand characteristics, and soil properties in young lodgepole pine. For. Ecol. Manage. **105**, 37-44.
- MARÇAIS, B.; DELATOUR, C., 1996: Inoculation of oak (*Quercus robur* and *Q. rubra*) with *Collybia fusipes*. Plant Dis. **80**, 1391-1394.
- MARÇAIS, B.; CAËL, O., 2000: Comparison of the susceptibility of *Quercus petraea*, *Q. robur* and *Q. rubra* to *Collybia fusipes*. Eur. J. Plant. Pathol. **106**, 227-232.
- MARÇAIS, B.; CAËL, O., 2001: Relation between *Collybia fusipes* root rot and growth of pedunculate oak. Can. J. For. Res. **31**, 757-764.
- MARÇAIS, B.; CAËL, O.; DELATOUR, C., 1998-a: Investigations on the distribution and impact of *Collybia fusipes* in Oak forest, In: Proc 9<sup>th</sup> Int. Conf. Root and Butt Rots, Carcans-Maubuisson, France September, 1-7, 1997. Ed. by DELATOUR C.; GUILLAUMIN J.J., LUNG-ESCARMENT B.; MARÇAIS B. INRA Editions (France), Les Colloques N°. 89, pp. 215-222.
- MARÇAIS, B, MARTIN, F., DELATOUR, C., 1998-b: Structure of *Collybia fusipes* populations in two infected oak stands. Mycol. Res. **102**, 361-367.
- MARÇAIS, B.; CAËL, O.; Delatour, C., 1999: Measuring the impact of *Collybia fusipes* on the root system of oak trees. Ann. For. Sci. **56**, 227-235.
- MARÇAIS, B.; CAËL, O.; DELATOUR, C., 2000: Relationship between presence of basidiomes, above-ground symptoms and root infection by *Collybia fusipes* in Oaks. For. Path. **30**, 7-17.
- MCLAUGHLIN, J.A., 2001: Distribution, hosts, and site relationships of *Armillaria* spp. in central and southern Ontario. Can. J. For. Res. **31**, 1481-1490.

- NAGELEISEN L.M., 1995: Méthode d'évaluation de l'aspect du houppier (protocole DEPEFEU).  
Département Santé des Forêts-Echelon technique Nord-Est. Bulletin technique. 11pp.
- PIOU, D.; DELATOUR, C.; MARÇAIS, B., 2002: Hosts and distribution of *Collybia fusipes* in France. For.  
Path. **32**, 29-41
- REDFERN D.B., 1978: Infection by *Armillaria mellea* and some factors affecting host resistance and the  
severity of disease. Forestry **51**, 121-135.
- RISHBETH J., 1951: Observations on the biology of *Fomes annosus*, with particular references to east  
anglian plantations. III / Natural and experimental infection of pines, and some factors  
affecting severity of the disease. Annals of Botany **15**, 221-247.
- SAS, 1989: SAS/STAT User's Guide, Version 6, Fourth edition, Vol. I Cary, NC: SAS Institute Inc. 943  
pp.
- TERMORSHUIZEN, A.J.; ARNOLDS, J.M., 1994: Geographical distribution of the *Armillaria* species in the  
Netherlands in relation to soil type and hosts. Eur. J. For. Path. **24**, 129-136.
- WHITNEY, R.D., 1984: Site variation of *Armillaria mellea* in three Ontario conifers, In: Proc 6<sup>th</sup> Int. Conf.  
Root and Butt Rots, Melbourne, Victoria, Gympie, Queensland, Australia; August, 25-31,  
1983. Ed by KILE, G.A. CSIRO Melbourne (Australia)pp. 122-130.
- WIENSCYK, A.M.; DUMAS, M.T.; IRWIN, R.N., 1997: Predicting *Armillaria ostoyae* infection levels in black  
spruce plantations as a function of environmental factors. Can. J. For. Res. **27**, 1630-1634.

PUBLICATION II

---

**Relationships between soil factors, *Quercus robur* health, *Collybia fusipes* root infection and *Phytophthora* presence**

---

C. CAMY, C. DELATOUR and B. MARÇAIS

Unité de Pathologie Forestière, INRA, Centre de Nancy, F54280, Champenoux, France

**Mots clés:** *Quercus* / *Collybia fusipes* / pourridié / *Phytophthora* spp. / dépérissement du chêne

— Accepté pour publication dans : 'Annals of Forest Science' —

# Relationships between soil factors, *Quercus robur* health, *Collybia fusipes* root infection and *Phytophthora* presence

By Cécile Camy, Claude Delatour and Benoît Marçais

Unité de Pathologie Forestière, INRA, Centre de Nancy, F54280, Champenoux, France

Short title : biotic or abiotic factors and *Quercus* health

**Abstract** – About sixty oaks (*Quercus robur*), with different status of crown health, located in three plots in north eastern France were assessed for their degree of infection by *C. fusipes*. Baiting of *Phytophthora* spp. from soil was carried out at different seasons in a sub sample of these oaks. The variability of soil characteristics, such as depth to waterlogging signs and depth to a gravel layer limiting rooting was evaluated. Soil factors were tightly correlated. Infection induced by *C. fusipes* was significantly more severe in non-waterlogged conditions. In two plots *Phytophthora* spp. were present at the base of the majority of trees investigated. Success of *Phytophthora* isolation was significantly linked with the season. The crown health status deteriorates with increasing severity of infection by *C. fusipes* and with the depth to waterlogging. Conversely, *Phytophthora* was not correlated with crown health status.

*Key words: Quercus / Collybia fusipes / root rot fungus / Phytophthora spp. / oak decline*

## 1 Introduction

European oak forests have undergone several dieback episodes in the two last centuries [8]. Oak decline is a multi-factorial phenomenon that has been attributed to many different causes and often involves a succession of several biotic and abiotic factors. Pedunculate oak (*Quercus robur* L.), appears to be the main species suffering from decline [22]. In particular, decline of pedunculate oaks growing in poor soil conditions often with limits to vertical root growth (gravel layer or ground water table) has often been mentioned in association with attacks of fungal parasites [2, 8, 14, 16]. *Q. robur* is indeed a species well resistant to temporary waterlogging but susceptible to climatic stress such as drought and requiring soils rich in nutrients [3]. Pedunculate oak was often introduced in sites beyond its optimal ecological range which is probably an underlying cause of many decline cases [3, 22].

Around 1980, it was reported that the basidiomycete *Collybia fusipes* (Bull.: Fr.) Quél. was involved in the decline of pedunculate oak, in particular in soils not submitted to waterlogging [10, 12, 14]. This parasite is common in the French oak forests [24, 30] and often has a scattered distribution within a forest. It is a slow primary parasite that produces typical orange lesions on large roots and causes a drastic destruction of the root system [25]. In some types of soil, severe root infection was associated with a deterioration of crown health status in particular in coarse textured soils [26].

Recently, other studies have reported that *Phytophthora* species may be involved in pedunculate oak decline [5, 17]. In Bavaria, Jung *et al.* [18] reported a positive correlation between presence of *P. quercina* Jung sp. nov. and oak crown deterioration. Numerous *Phytophthora* species can also be found in French oak forest soils [9, 15]. *Phytophthora spp.* have a multi-cyclic development with rapid increase of inoculum due to the production of sporangia and motile zoospores from infected roots. The increase of inoculum may be short in time but could potentially have lasting influence on tree health. Depending on the species, *Phytophthora* can cause death of fine roots, lesions on taproots, collar or stem [11, 17]. *P. cinnamomi* Rands, cause of the ink disease on sweet chestnut and of a canker on oak is probably the most documented species in Europe. Conversely, the ecology of other *Phytophthora* species and their role in decline is not well understood. For example, species widespread in oak forests, such as *P. quercina* and *P. europaea* Hansen & Jung sp. nov., have just been recently described [19, 20]. Despite the presence of *Phytophthora* species in a wide range of ecological situations, they appear to be infrequent in acidic soils with a coarse texture [9, 18].

This work aimed at clarifying the relationships between different factors such as soil conditions (presence of gravel layer impeding rooting, severity of waterlogging), root parasites (*C. fusipes* or *Phytophthora*) and crown health status of *Q. robur* at three sites where *C. fusipes* was already known to be frequent. More precisely, we tried to identify which soil factors were related to the distribution of *C. fusipes* and *Phytophthora* within a stand and which factors (biotic or abiotic) were the better correlated with crown deterioration.

**Table I.** Description of the study sites.

Site (Area in France)	Oak species	No. trees assessed for <i>C.</i> <i>fusipes</i> infection (No. of declining)	Soil texture	Parental Material	Soil pH
AINVELLE (Haute-Saône)	<i>Q. robur</i>	60 (20)	Clayey sandy loam	Gravel	4.5
MERSUAY (Haute-Saône)	<i>Q. robur</i>	60 (22)	Sandy clayey loam	Gravel	5.2
FILAIN (Haute-Saône)	<i>Q. robur</i> + 10% <i>Q.</i> <i>petraea</i>	55 (12)	Clay	Limestone	5.8



## 2 Materials and methods

### 2.1 Study sites

Trees were sampled in three plots of north-eastern France where *C. fusipes* was frequent: Ainvelle, Mersuay and Filain. In Ainvelle and Mersuay, located on alluvial forests, the soil consisted in a coarse textured layer of varying thickness covering a layer of gravel. Few roots over 1 cm in diameter extended into this gravel layer which represented a strong constraint on tree rooting. In those two plots, the stands were old coppices with standards, with *Q. robur* in the overstory and hornbeam (*Carpinus betulus* L.) in the understory. The topography of the two plots was flat. Filain was a 100-year-old plantation of pedunculate oaks mixed with about 10% of sessile oak (*Q. petraea* (Matt) Liebl.), established on former agricultural land on a calcareous plateau, along a 7% slope. The soil was of a clay texture and presented no limitation to vertical root growth (table I). Within the soil of each of the three plots, waterlogging was very heterogeneous.

### 2.2 Tree sampling

At each study site, between 55 and 60 oaks were selected on the basis of their crown appearance. The crown health status was rated on a 0-3 scale adapted from Nageleisen [27] and from the European system based on defoliation percentage [1]: (0) crown healthy and opaque with dense secondary ramifications, defoliation percentage under 10%; (1) crown moderately healthy, with dead twigs present and/or gaps present in the canopy, corresponding to a defoliation percentage between 10 and 25%; (2) crown moderately declining, with the gaps in the canopy coalescing at the periphery of the crown and forming openings towards the outside in the upper part of the crown. The skeleton of large limbs is fully visible. Defoliation percentage between 25 and 50%; (3) crown severely declining, with large dead limbs in the upper part of the crown and/or loss of more than half of fine branches; defoliation greater than 50%. Only *Q. robur* were selected to obtain one third of healthy oaks rated as 0 or 1, one third moderately declining oaks rated as 2 and one third declining oaks rated as 3 (table I). Most selected oaks were dominant trees. Oak species was determined from leaf morphology by observing the foliage with binoculars.

### 2.3 Site and tree investigation

A core of soil was extracted at the base of each tree with an earth auger. Soils of the three plots were described for depth to first signs of waterlogging (first reddish traces of insoluble oxidized iron and / or discoloration indicating iron depletion). At Ainvelle and Mersuay, the depth of a gravel layer sufficient to limit vertical growth of roots was recorded. At Filain, within a sub sample of 28 oaks, fine root characteristics were studied. These trees were selected according to their crown health status. Seventeen were moderately declining (rated as 2) and 11 were healthy (rated as 0 or 1). Small oak roots were collected in the soil below selected trees in 4 blocks of 30 cm X 30 cm X 30 cm and were sorted visually according to morphological features. Medium sized roots ('mother roots', 2-5 mm

**Table II.** Number of trees investigated for *Phytophthora* presence in the soil at their base, on each plot, and at each sampling date.

	No. of trees investigated	Date of sampling						
		18 May 99 (spring)	8 Feb. 00 (winter)	24 Feb. 00 (winter)	15 Mar. 00 (winter)	5 Apr. 00 (winter)	14 Jun. 00 (spring)	25 Jul. 00 (summer)
AINVELLE	15			10 <sup>(a)</sup>		10		
MERSUAY	47	8 <sup>(b)</sup>	10 <sup>(c)</sup>		20 (10) <sup>(d)</sup>		20 (10)	20 (10)
FILAIN	39	8				20 (11)	20 (11)	21 (11)

(a) including 5 trees sampled again the 5 Apr. 00

(b) including 1 tree sampled again in 8 Feb.00, 2 on 14 Jun. 00, on 25 Jul. 00 and 2 on 15 Mar. 00 , 14 Jun. 00 and 25 Jul. 00

(c) including 1 tree sampled again in Mar.00, 1 on 14 Jun.00, and 3 on 25 Jul.00.

(d) in brackets: number of trees sampled repetitively in winter, spring and summer.

in diameter) were selected and measured in length. Living fine roots (less than 2 mm in diameter) present along mother roots were counted. Roots were dried and weighed. Quantification parameters were (i) abundance of mother roots (length per volume of soil), (ii) abundance of fine roots (number per length of mother roots), and (iii) dry weight of fine roots per dry weight of mother roots.

#### **2.4 Assessment of root damage induced by *C. fusipes***

In Ainvelle, Mersuay and Filain, root systems of 60, 60 and 55 oaks respectively were studied for *C. fusipes* infection as described by Marçais *et al* [25]. Briefly, the root collar and major roots were partially excavated to a depth of about 20-30 cm and a distance of about 80-100 cm from the trunk base. Lesions caused by *C. fusipes* were detected as patches of infected bark that were orange in colour with small white fans of mycelium scattered within the necrotic tissues. In pedunculate oaks, hypertrophy of the bark is usually observed as infected bark is thickened up to 3-4 cm. Previous work showed that *C. fusipes* is consistently isolated from such lesions on oak roots [14, 25, 26]. The infection status of each major root was assessed within the following four classes: 0) no necrosis detected; (1) superficial necrosis present, but covering less than half of the root circumference (penetration of *C. fusipes* in the bark of no more than 1-2 mm); (2) necrosis covering one side of the root entirely with a penetration of the parasite in the bark usually more than 2-5 mm; (3) *C. fusipes* infection over the entire root circumference but root still alive (penetration of the parasite in the bark of usually more than 4-5 mm); (4) root dead with decayed wood. Root diameter was measured at about 10 cm from the trunk base. The root infection index of a tree was computed as:  $\Sigma$  (root diameter X root rating) /  $\Sigma$  (root diameter). This index therefore takes value from 0 to 4.

#### **2.5 Assessment of *Phytophthora* presence in the soil**

In each stand, a sub-sample of oaks was selected to assess the presence of *Phytophthora* in the soil at the tree base. These trees were representative of the different crown conditions from healthy to declining. Soil sampling was carried out from May 1999 through 2000. Some of the trees were repeatedly sampled at different seasons (winter, spring and summer, see *table II*).

Methods of soil collection and of *Phytophthora* isolation were those described by Hansen and Delatour [15], adapted from Jung *et al.* [17]. For each tree, soil was collected in four opposite directions at a distance of about 80-100 cm from the stem base. The litter was scraped away and soil was collected to a depth of about 20 cm; the four samples from a tree were mixed together. Baiting was performed under standard laboratory conditions (about 20°C, diffuse light). About 200 mL of each soil sample were then flooded with deionized water to a depth of 2 cm (about 500 mL) and baited by floating oak leaflets on the surface (6-10 baits). Baits were removed after 3 days and blotted dry; necrotic parts of oak leaflets were transferred to selective agar medium (BARPBHy; corn meal agar Difco with 200 mg ampicillin, 10 mg rifampicin, 10 mg pimaricin, 15 mg benomyl, and 50 mg hymexazol per liter). Plates were examined daily and possible *Phytophthora* colonies were transferred to three different media for identification: corn meal agar amended with  $\beta$ -sitosterol, potato dextrose

agar, and 200 mL Joker, (V-8 like clarified multivitamin juice) amended with 7 g per 500 mL CaCO<sub>3</sub>, 20 g agar and 800 mL deionized water.

Isolates were identified according to growth pattern, and morphology of colonies, sporangia, and oogonia when present, using previously identified species as a reference, and information from Erwin and Ribeiro [13].

## 2.6 Statistical analysis

In Mersuay, because of severe *Armillaria* infection, one tree was removed from further analysis.

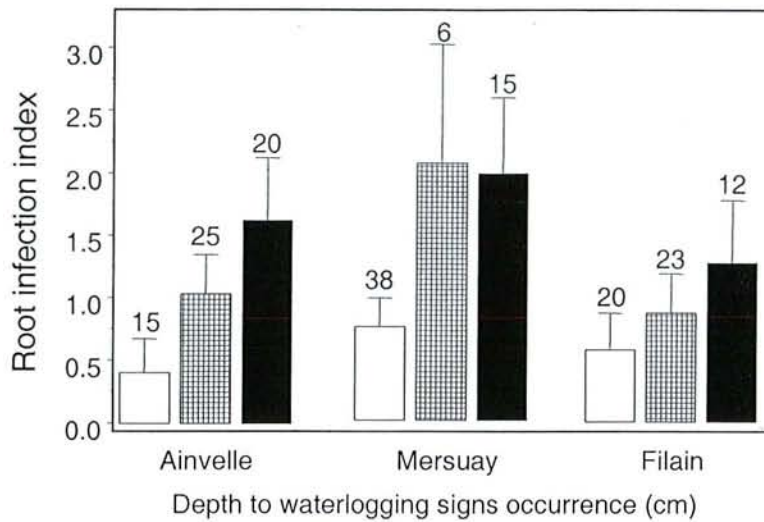
To study the relationship between soil characteristics and *C. fusipes* infection severity, the root infection index was log transformed and subjected to an analysis of variance using a "glm" procedure [31]. At first, for each plot, each independent factor was introduced alone in the model in order to assess the statistical link of each factor independently from the others. Thereafter, independent factors were all introduced together in the model to study the colinearity between the different factors.

The relationship between frequency of *Phytophthora* species isolation and soil factors was analysed by generalised linear analysis, using the procedure "genmod" of SAS. A binomial distribution of the data was assumed and the logistic link function was used. The model validity was checked using the deviance/degree of freedom ratio, by plotting deviance residuals against the linear predictor and with a half-normal plot [7]. Because the season of baiting appeared to be an important factor for *Phytophthora* isolation success, the effect of soil factor was tested by taking into account only trees sampled in summer or spring or sampled in winter but with a positive baiting for *P. quercina*. For *P. europaea*, only trees sampled in winter or spring or sampled in summer with a successful baiting, were used in the analysis. For *P. syringae*-like<sup>1</sup>, only trees sampled in winter or sampled in summer and spring but with a successful baiting were included in the analysis.

The statistical relationship between the presence of *Phytophthora* in soil and the damages induced by *C. fusipes* was assessed for each species with a Student t test comparing the mean *C. fusipes* root infection index when the *Phytophthora* species was present, with index when absent. Data from Mersuay and Filain were grouped. To take into account the strong influence of season on *Phytophthora* baiting success, the analysis was carried out in the same way as for analysis of relationship between *Phytophthora* species isolation and soil factors.

---

<sup>1</sup> all the isolates noted here as *Phytophthora syringae*-like are morphologically similar to *P. syringae*. Two isolates belonging to this morphological group, 'C32b' (from Amance 31-15), and 'Edr6' (from Mersuay), were examined by Winton and Hansen [34]. Based on the ITS DNA sequences, they were quoted as unidentified species. In this group, isolates are homothallic (oogonia: c.a. 30-40  $\mu$  in diam.), paragynous antheridia, semi-papillate sporangia (ovoid-subpyriforme; c.a. 50-60 X 30-45  $\mu$ , ratio c.a. 1.4-1.6), optimal growth temperature below 23°C, stellate pattern and radial growth rate c.a. 3-4 mm per day at 20°C on CMA.



**Figure 1.** Mean *C. fusipes* root infection index in the three studied plots according to different categories of waterlogging depth, evaluated as the depth to first iron traces deposition or depletion in the soil: (□) 0-40 cm; (▨) 41-60 cm; (■) >60 cm. The bars represent the confidential interval of the mean. The number of trees in each category is given above the bar.

**Table III.** Analysis of variance of the relationships between depth of waterlogging (iron traces deposition or depletion) and depth of gravel layer with the *C. fusipes* root infection index.

Plot	Ainvelle				Mersuay				Filain				
	Source	Df	Mean square	F square	P value	Df	Mean square	F square	P value	Df	Mean square	F square	P value
Model		2	10.48	17.15	< 0.001	2	8.79	14.28	< 0.001	1	8.55	10.8	0.002
	Error	57	0.61	-	-	56	0.62	-	-	53	0.79	-	-
Waterlogging depth		1	17.88	29.18	< 0.001	1	14.85	24.13	< 0.001	1	8.55	10.8	0.002
Gravel depth		1	2.03	3.32	0.074	1	0.41	0.66	0.418	-	-	-	-

NOTE: the mean squares are of type 3

The relationship of crown health status of the trees with soil characteristics or root infection index induced by *C. fusipes* or presence of *Phytophthora* at the base of tree, was analysed by generalised linear analysis, using the procedure "genmod" of SAS. A multinomial distribution of the data was assumed and the cumulative logit link function was used. Like in the variance analysis, each independent factor was first introduced alone in the model and thereafter all independent factors were introduced together. Seasonal influence was taken into account in the same way as for analysis of the relationship between *Phytophthora* species isolation and soil factors.

In Filain, the relationship between tree crown health status and fine roots characteristics was analysed using a Student t test comparing the mean of each parameter describing fine root status when trees were healthy or when trees were moderately declining.

### 3 Results

#### 3.1 Relationships between soil factors

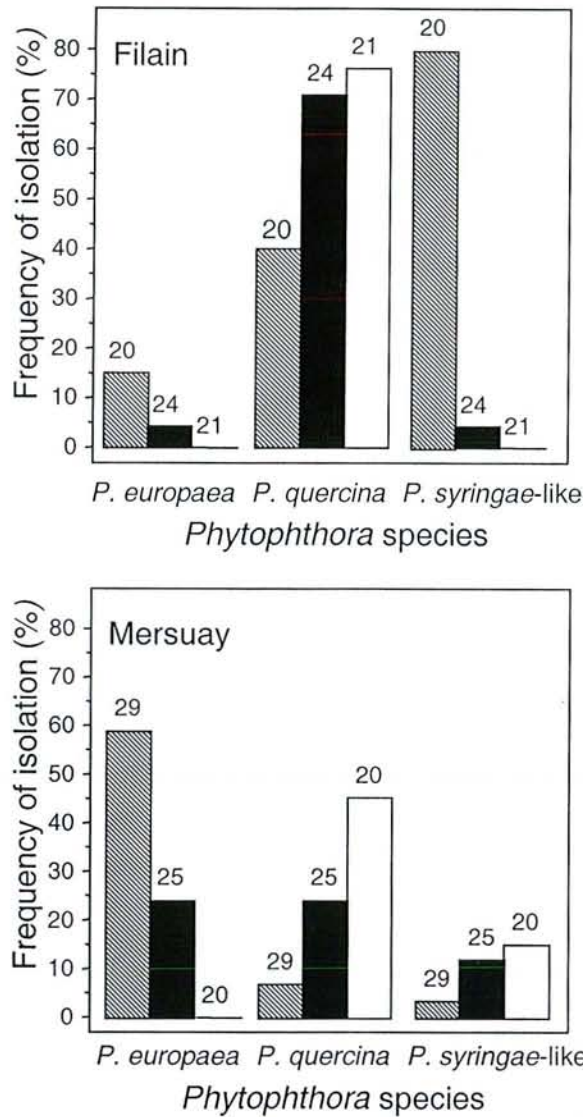
In Mersuay, signs of waterlogging appeared deeper in the soil when the gravel layer was closer under the soil surface whereas in Ainvelle these two parameters were not linked (Pearson correlation coefficients respectively of  $-0.53$  and  $0.08$ , probabilities respectively lower than  $0.001$  and of  $0.540$ ). In Filain, the depth to first signs of waterlogging was the only soil parameter evaluated.

#### 3.2 Relationship between soil factors and root infection induced by *C. fusipes*

In Ainvelle, Filain and Mersuay, 53%, 63% and 59% of oak trees, respectively, were infected by *C. fusipes*, while 20%, 9% and 27% of trees, respectively, were severely damaged with a root infection index above 2. Only one oak in Mersuay showed most of these roots which did not express the typical orange colour of *C. fusipes* infection, but rather infections that looked like *Armillaria* infections with brown lesions and mycelial fans at the cambium. *Armillaria* was also detected on three other oaks in Mersuay, three oaks in Filain and two in Ainvelle. In these cases *Armillaria* was present on a minority of roots, inducing superficial lesions, the root infection index was thus computed by taking into account these infected roots.

In the three plots, Ainvelle, Mersuay and Filain, there was a significant relationship between the *C. fusipes* root infection index and the depth at which the first signs of waterlogging occurred in the soil. (Fisher's F respectively of 28.66, 28.05, 10.80; df of 1; P values all lower than 0.002). Indeed, the severity of infection increased in the 3 stands when waterlogging signs appeared deeper in the soil (figure 1).

In Mersuay, the root infection index tended to decrease with the depth at which the gravel layer appeared in the soil, whereas in Ainvelle the opposite tendency was observed (Fisher's F of respectively 3.15 and 3.01, df of 1, P values of respectively 0.081 and 0.088). Indeed, in Mersuay the



**Figure 2.** Effect of the season on the frequency of *Phytophthora* species isolation from soil at Mersuay and Filain. (▨) winter: Feb. to Apr.; (■) Spring: May-June; (□) Summer: July. The number of *Phytophthora* baiting carried out is given above the bars.

**Table IV.** Logistic regression analysis of the relationships between severity of the waterlogging (depth of iron traces deposition or depletion) and depth of the gravel layer with frequency of *Phytophthora* positive isolations

Plot :	<i>Phytophthora</i> species	<i>P. quercina</i>			<i>P. syringae-like</i>			<i>P. europaea</i>		
		Df	Chi-Square	Pr>Chisq	Df	Chi-Square	Pr>Chisq	Df	Chi-Square	Pr>Chisq
FILAIN	Waterlogging depth	1	1.13	0.287	1	0.15	0.699	1	1.62	0.203
	Waterlogging depth	1	4.52	<b>0.034</b>	1	1.57	0.210	1	0.77	0.381
MERSUAY	Gravel depth	1	2.94	0.086	1	0.71	0.398	1	4.47	<b>0.035</b>

NOTE: the Chi-squares are of type 1

root infection index decreased with the gravel layer depth (from  $1.58 \pm 0.2$  for a gravel layer depth of less than 70 cm to  $0.7 \pm 0.2$  for a gravel layer depth deeper than 90 cm) whereas it increased in Ainvelle (from  $0.58 \pm 0.2$  for a gravel layer depth of less than 70 cm to  $1.27 \pm 0.3$  for a gravel layer depth deeper than 90 cm).

In Mersuay and Ainvelle, there was a strong colinearity between both soil factors studied. When these soil factors were entered together in the variance analysis model, only the depth to waterlogging occurrence remained significantly linked to the root infection index (*table III*).

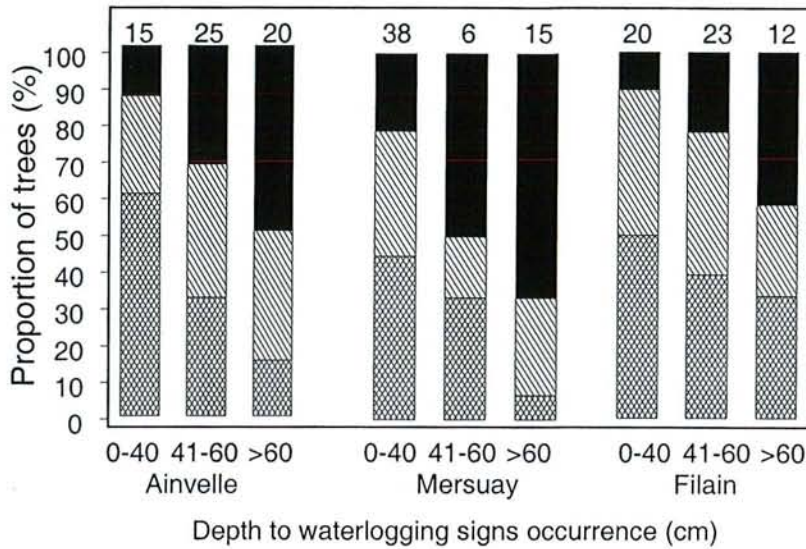
### 3.3 Relationship between soil factors, season of baiting and *Phytophthora* isolation

In Ainvelle, despite soil baiting carried out at two different dates (*table I*) we did not find evidence of *Phytophthora* in the soil. Conversely, in Mersuay and Filain *Phytophthora* was present at the base of 70% and 87% respectively of trees investigated. In these plots, several *Phytophthora* species were detected: *P. quercina* was isolated at the base of 50% of oaks investigated, *P. syringae*-like and *P. europaea* were present at the base of 27% and 26% respectively of oaks investigated. *P. cambivora* (Petri) Buisman, *P. citricola* Sawada, *P. gonapodyides* (Petersen) Buisman were occasionally isolated but at too low frequency to allow any further analysis. The probability of isolating a *Phytophthora* species at the base of trees, increased with the number of sampling dates (from 68% when baiting was carried out at one date to 95% for trees when baiting was done on three dates or more).

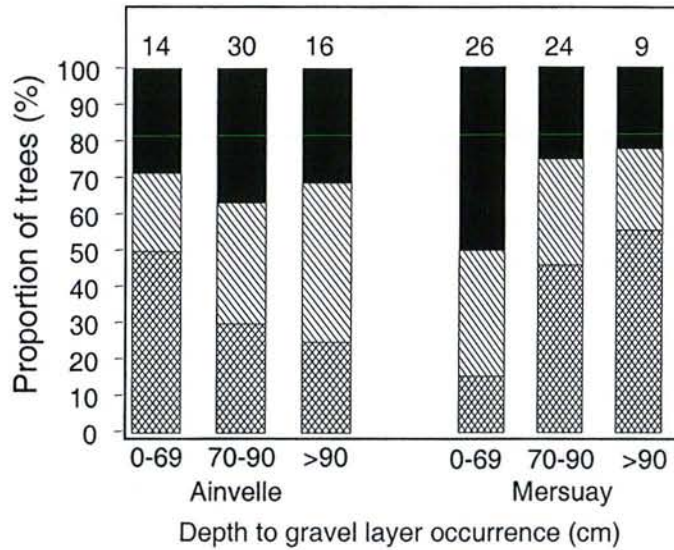
The frequency of positive isolation of *P. europaea* and *P. quercina* was significantly influenced by the season at which the baiting was carried out (in Filain, likelihood  $X^2$  respectively of: 4.83 and 6.66, df of 2, probabilities respectively of 0.089 and 0.036; in Mersuay, likelihood  $X^2$  respectively of 6.66 and 10.13, df of 2, probabilities respectively of 0.036 and 0.006 ). In Mersuay and Filain, the frequency of *P. europaea* isolation from soil was high in winter (from February to April) and very low in summer (*figure 2*). In these two plots, the frequency of *P. quercina* isolation was high in summer (July) and low in winter (*figure 2*). The results for *P. syringae*-like isolation were inconsistent, the frequency being significantly higher in winter at Filain but not in summer at Mersuay (likelihood  $X^2$  respectively of: 46.37 and 2.38, df of 2, probabilities respectively less than 0.001 and of 0.305; *figure 2*).

In Filain and Mersuay, after the effect of season of baiting was taken into account, the frequency of positive *Phytophthora* isolation from soil did not appear to be linked with the depth to occurrence of waterlogging signs in the soil (*table IV*). Nevertheless, in Mersuay there was a tendency to isolate *P. quercina* more frequently when the waterlogging signs appeared deeper in the soil. Indeed, the frequency of positive baiting increased from 37% when waterlogging signs appeared above 40 cm to 67% when they appeared deeper than 60 cm. In Mersuay, the frequency of positive baiting of *P. quercina* and *P. syringae*-like was not linked with the depth of occurrence of the gravel layer in the soil (*table IV*), whereas positive isolations of *P. europaea* decreased significantly with the





**Figure 3.** Relationship between depth to waterlogging signs occurrence in the soil (traces of iron deposition or depletion) and crown health status of oak trees in the three plots. (XXXXX) crown healthy; (XXXX) crown moderately declining; (■■■■) crown heavily declining. Depth to waterlogging signs was categorised in three classes. The number of trees in each category is given above the bars.



**Figure 4.** Relationship between crown health status of oak trees and depth to gravel layer occurrence in the soil in Ainvelle and Mersuay. (XXXXX) crown healthy; (XXXX) crown moderately declining; (■■■■) crown heavily declining. Depth to gravel layer occurrence was categorised in three classes. The number of trees in each category is given above the bars.

depth of occurrence of the gravel layer ( from 60% when the gravel layer appears above 70 cm depth, to 13% when it appears below 90 cm).

### **3.4 Relationships between *Phytophthora* presence and *C. fusipes* infection severity**

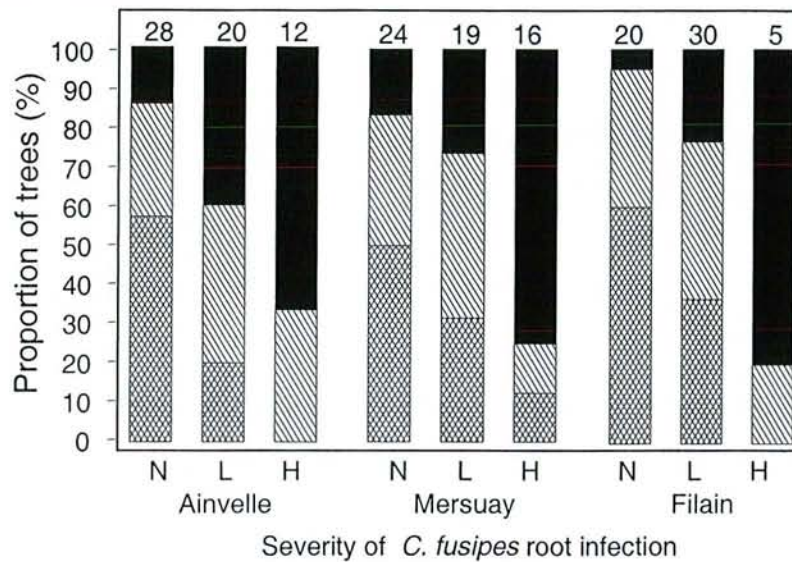
*C. fusipes* root infection index was linked neither with the presence of *P. quercina* in soil, nor with the presence of *P. syringae*-like or of *P. europaea* (t values respectively of - 0.10, - 0.18 and - 1.70, probabilities higher than 0.14).

### **3.5 Relationship between *Q. robur* crown health status, soil factors, damages induced by *C. fusipes* and presence of *Phytophthora***

In Ainvelle and Mersuay the crown health status was worse when waterlogging signs appeared deeper in the soil (Likelihood  $X^2$  respectively of: 10.61 and 14.10, df of 1, probabilities both lower than 0.001; *figure 3*). The same tendency but not significant was observed in Filain (Likelihood  $X^2$  of 3.05, df of 1, probability of 0.081; *figure 3*). The relationship between the depth to the gravel layer and oak crown status was inconsistent. Indeed in Mersuay, the crown health status became worse when the gravel layer appeared closer to the soil surface whereas there was no relationship between tree crown status and gravel layer depth in Ainvelle (Likelihood  $X^2$  respectively of: 4.60 and 1.52, df of 1, probabilities respectively of 0.032 and 0.218; *figure 4*). In Ainvelle, Mersuay and Filain, the severity of infection by *C. fusipes* was very significantly linked with the crown health status of oaks (Likelihood  $X^2$  respectively of: 16.88, 13.18 and 11.35, df of 1, probabilities lower than 0.001). The crown health status of oak trees was worse when the severity of infection by *C. fusipes* increased (*figure 5*). The majority of oak trees rated as severely infected by *C. fusipes* were rated as moderately or heavily declining trees (31 out of 33 in the three plots). There was a strong colinearity between the severity of waterlogging and of *C. fusipes* infection. Indeed, when all soil characteristics and root infection index were entered together in the model, only the root infection index remained significantly linked with crown status in Ainvelle and Filain, and almost significantly linked with crown health status in Mersuay (*table V*).

There was no relationship between the presence of *Phytophthora*, whatever the species (*P. europaea*, *P. quercina*, *P. syringae*-like ), and the tree crown health status (likelihood  $X^2$  respectively of 0.31, 0.32, 0.13, df of 1, probabilities respectively of: 0.577, 0.570 and 0.721; *figure 6*).

In the sub-sample of oaks investigated for their root characteristics in Filain, there was no statistical relationship between the crown health status of trees, rated as healthy or moderately declining and the length of mother roots per volume of soil (t value of 0.77 and probability of 0.447), the number of fine roots per length of mother roots (t value of -1.35 and probability of 0.189) or the dry weight of fine roots per dry weight of mother roots (t value of 1.19 and probability of 0.854).



**Figure 5.** Relationship between root infection by *Collybia fusipes* and crown health status of oak trees. Infection severity was categorised: N corresponding to undamaged tree with a root infection index of 0-0.3, L corresponding to tree lightly damaged with a root infection index of 0.3 to 2 and H to tree heavily damaged with a root infection index of more than 2. (XXXX) crown healthy; (////) crown moderately declining; (■) crown heavily declining. The number of trees in each category is given above the bars.

**Table V.** Logistic regression analysis of the relationship between the crown health status of oaks and the *C. fusipes* root infection index, the depth of waterlogging signs (traces of iron deposition or depletion) and the depth of gravel layer occurrence.

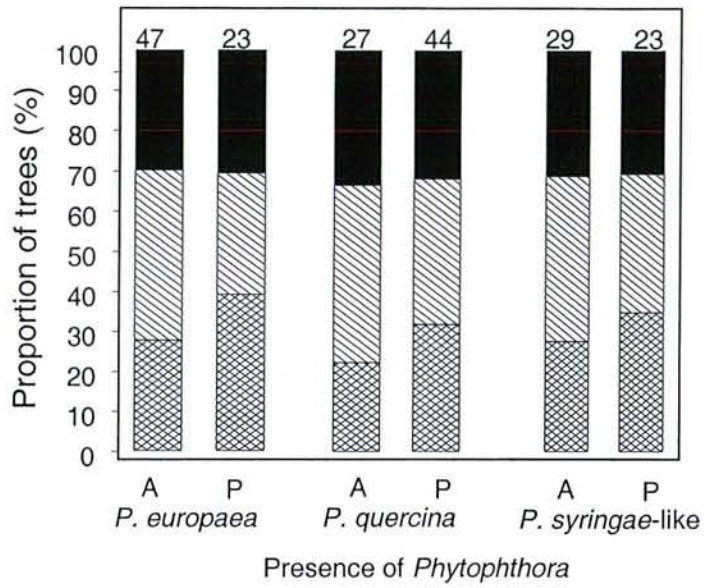
Plot	Ainvelle			Mersuay			Filain		
	Source	Df	Chi-Square	Pr>Chisq	Df	Chi-Square	Pr>Chisq	Df	Chi-Square
Root infection index	1	6.51	<b>0.011</b>	1	3.26	0.071	1	8.71	<b>0.003</b>
Waterlogging depth	1	1.51	0.219	1	2.29	0.130	1	0.40	0.525
Gravel depth	1	0.47	0.491	1	0.28	0.594	-	-	-

NOTE: the Chi-squares are of type 3

## 4 Discussion

In the three studied plots, there was a strong correlation between soil factors and root infection induced by *C. fusipes*. This parasite induced more severe damages where soil was less frequently waterlogged. By contrast, there was no relationship between *C. fusipes* infection and presence of *Phytophthora* and the relationship between *C. fusipes* infection and depth at which a gravel layer impeding rooting appeared was inconsistent. *C. fusipes* was already reported to be more frequent in dry soil conditions and to induce fewer root infection in waterlogged soils [10, 28, 30]. Likewise, in a field inoculation *C. fusipes* inoculum survival was strongly reduced in waterlogged conditions and increased in coarse textured soils [23]. Effect of waterlogging could be related to the availability in oxygen as *C. fusipes* *in vitro* growth appears to be strongly inhibited by low aeration conditions (Camy, unpublished results). Several other root rot inducing fungi were shown to have a higher incidence in dry soil conditions, like *Armillaria* spp. or *Inonotus tomentosus* on spruce [4, 33]. Kuhlman [21] also observed that root segments of loblolly pine were more decayed by *Heterobasidion annosum* when they were buried in dry soil. The frequency of positive *Phytophthora* isolation from soil was strongly influenced by the season of baiting at least for *P. quercina* and *P. europaea*. This seasonal influence partly explains why repeated sampling on the same sites often yield inconsistent responses with different *Phytophthora* species present in the different samplings [9]. Thus, evaluation of the *Phytophthora* spp. population in a site would require to take into account the fluctuation of the different species over time in the soil. This difference in seasonal activity of *P. quercina* and *P. europaea* points out strong differences in the infection biology. Indeed, Brasier and Hansen [6] suggested that seasonality of moisture in relation to temperature had certainly influenced the strategies of survival and the biology of *Phytophthora* species. There was not clear relationship between the distribution of *Phytophthora* in the plots and the severity of soil waterlogging. This is quite surprising as *Phytophthora* spp. are known to be favoured in wet fine textured soils [6, 18] and as *P. quercina* and *P. europaea* were shown to be preferentially distributed in low point prone to waterlogging [15]. In our two plots, *Phytophthora* appeared to be distributed throughout the stands; when baiting was carried out at different seasons, *Phytophthora* could be detected on virtually all trees. For Mersuay a possible explanation could be that the periodic flooding distributes *Phytophthora* all over the plot. However, this can not explain the situation of Filain where trees were distributed along a strong slope. *Phytophthora* spp. were absent in the plot of Ainvelle which has the most acidic soil of the 3 studied plots. This is likely to be related to the soil texture and pH, as Jung *et al.* [18] showed that *Phytophthora* spp. were absents from sandy acidic soils.

In the three studied plots, the crown health status was tightly correlated with both the severity of damage induced by *C. fusipes* and the severity of waterlogging and to a lesser degree with the depth of occurrence of a gravel layer impeding rooting. These factors were strongly correlated. By contrast, an other studied factor, the presence of *Phytophthora* spp. did not appear to have a consistent relationship with oak crown health status. The correlation between crown health status and damages induced by *C. fusipes* confirmed that severe infections of this pathogen is linked to decline



**Figure 6.** Relationship between absence (A) or presence (P) of *Phytophthora* in soil, and crown health status of oak trees. Baitings of *Phytophthora* taken into account were those carried out during the seasons where the higher level of positive isolation was observed and those positively isolated in other seasons. Data from Filain and Mersuay were grouped. (XXXX) crown healthy; (XXXX) crown moderately declining; (XXXX) crown heavily declining. The number of trees in each category is given above the bars.

[26] and shows additionally that in the studied plots, most of the decline is linked to *C. fusipes* infection. Thereafter, it is not surprising to find several mentions of *C. fusipes* in association with different decline episodes [10, 14]. Oak decline was often reported in the literature to occur in soils where a temporary and elevated water table occurred [22, 29]. In our case, the opposite tendency was observed, which could reflect a strong effect of infection induced by *C. fusipes* being more severe when soil was less submitted to waterlogging. Water and mineral nutrition could be an underlying cause of the decline as pedunculate oak has high needs in both [3]. This could occur because oak stressed by water or nutrient shortage could be predisposed to the *C. fusipes* infection and/or trees with destroyed root systems are more prone to water stress on low water retention capacity soils. However, this hypothesis does not fit the data very well. Soils in Mersuay and Ainvelle have low water retention capacity. This is not the case in Filain where the soil is a deep clayed loam soil with no ground water table or physical layer limiting the rooting. Moreover, in Ainvelle, there is no relationship between the occurrence of a gravel layer impeding rooting and tree crown health status. Also, two of the plots, Filain and Mersuay, have soil with high nutrient content. The relation between *C. fusipes* and tree health did not appear to be affected by presence of *Phytophthora*. In particular, deterioration of the crown of *C. fusipes* infected oaks was similar in Mersuay, where *Phytophthora* are present and in Ainvelle where they are absent. No link between presence of *Phytophthora* and the crown health status was seen in our study in contrast to results by Jung *et al* [17, 18] in German forests. This can be related to the fact that *Phytophthora* was widespread in the plot, and was found at the base of a majority of oaks. However, the technique used to detect *Phytophthora* in soil did not allow us to quantify the inoculum potential which could be better related to the crown health status. Also, an episode of root infection occurring few years before could have conceivably contributed to current crown conditions but was not detected because the *Phytophthora* decreased since. Likewise, Delatour [9] mentioned that considering together all the *Phytophthora* species found in European soils, no general relationship was found between their presence below individual oaks and the health of trees. Furthermore, our plots were selected on the basis of *C. fusipes* incidence and *Phytophthora* presence was looked at only after. Thus, those plots could represent sites not very favourable to *Phytophthora* development. The crown health status was also not correlated with fine roots characteristics because it was probably too early in the decline process to detect any differences. Thomas and Hartmann [32] also showed that fine root decay was not a primary factor in the decline complex of pedunculate oak.

Such a study underlined correlation links between oak decline and biotic or abiotic factors but it remains difficult to explain the dynamic of the phenomenon as no causality link can be derived from correlations. However, in this study, different factors possibly involved in decline of oaks, such as root pathogens and soil factors were evident. It is worth noting that all these biotic and abiotic factors are inter-dependant and that oak decline obviously results from their combined effect.

## **Acknowledgements**

The authors wish to thank O. CAËL, J. DEMAISON, G. MARÉCHAL and F. TABARY for their technical assistance and E. HANSEN for reviewing the manuscript. This work was supported by the European Commission, Project Fair 5-CT97-3926, "Long term dynamics of oak ecosystems: assessment of the role of root pathogens and environmental constraints as interacting decline inducing factors" (PATHOAK).

## References

- [1] Anonymous, Manual on methods and criteria for harmonised sampling, assessment, monitoring and analysis of the effects of air pollution on forests, United Nation Economic Commission for Europe, Internat. Co-operative Program. 4<sup>th</sup> edition (1997)
- [2] Becker M., Levy G., Le dépérissement du chêne en forêt de Tronçais. Les causes écologiques, Ann. Sci. For. 39 (1982) 439-444.
- [3] Becker M., Lévy G., Le point sur l'écologie comparée du chêne sessile et du chêne pédonculé, Rev. For. Fr. 42 (1990) 148-154.
- [4] Bernier D., Lewis K.J., Site and soil characteristics related to the incidence of *Inonotus tomentosus*, For. Ecol. Manage. 120 (1999) 131-142.
- [5] Blaschke H., Decline symptoms on roots of *Quercus robur*, Eur. J. For. Path. 24 (1994) 386-398.
- [6] Brasier C.M., Hansen E., Evolutionary biology of *Phytophthora*, Part II: Phylogeny, Speciation and Population Structure, Annu. Rev. Phytopathol. 30 (1992) 173-200.
- [7] Collett D., Modeling binary data, Chapman and Hall (Ed), 1991.
- [8] Delatour C., Les dépérissements des chênes en Europe, Rev. For. Fr. 35 (1983) 265-282.
- [9] Delatour C., Phytophthoras and Oaks in Europe, in: Proceedings of the 2<sup>nd</sup> International meeting on Phytophthoras in Forest and Wildland Ecosystems, Perth and Albany, Australia, in press.
- [10] Delatour C., Guillaumin J.J., Un pourridié méconnu : *Collybia fusipes* (Bull. ex Fr.) Quel, C. R. Acad. Agri. France 70 (1) (1984) 123-126.
- [11] Delatour C., Desprez-Lousteau M.L., Robin C., Pathogenicity of *Phytophthora* species on oaks, in: E.M. Hansen and W. Sutton (Ed), Proceedings from the First international Meeting on Phytophthoras in Forest and Wildland Ecosystems, Grants Pass, Oregon USA, 2000, 102-104.
- [12] Durand P., Gelpe J., Lemoine B., Riom J., Timbal J., Le dépérissement du chêne pédonculé dans les Pyrénées-Atlantiques, Rev. For. Fr. 35 (1983) 357-368.
- [13] Erwin D.C., Ribeiro O.K., *Phytophthora* Diseases Worldwide, APS Press, St. Paul, 1996.
- [14] Guillaumin J.J., Bernard C., Delatour C., Belgrand M., Contribution à l'étude du dépérissement du chêne : pathologie racinaire en forêt de Tronçais, Ann. Sci. For. 42 (1985) 1-22.
- [15] Hansen E., Delatour C., *Phytophthora* species in oak forest of north-east France, Ann. For. Sci. 56 (1999) 539-547.



- [16] Hartmann G., Blank R., Lewark S., Eichensterben in Norddeutschland. Verbreitung, Schadbilder, Mögliche Ursachen, Forst und Holz (1989) 475-487.
- [17] Jung T., Blaschke H., Neumann P., Isolation, identification and pathogenicity of *Phytophthora* species from declining oak stands, Eur. J. For. Path. 26 (1996) 253-272.
- [18] Jung T., Blaschke H., Oswald W., Involvement of soilborne *Phytophthora* species in Central European oak decline and the effect of site factors on the disease, Plant Pathol. 49 (2000) 706-718.
- [19] Jung T., Cooke D.E.L., Blaschke H., Duncan J.M., Oswald W., *Phytophthora quercina* sp. nov., causing root rot of European oaks, Mycol. Res. 103 (1999) 785-798.
- [20] Jung T., Hansen E., Winton L., Osswald W., Delatour C., Three new species of *Phytophthora* from european oak forests, Mycol. Res. (accepted)
- [21] Kuhlman E.G., Influence of moisture on rate of decay of loblolly pine root wood by *Heterobasidion annosum*, Can. J. Bot. 58 (1980) 36-39.
- [22] Landmann G., Becker M., Delatour C., Dreyer E., Dupouey J.-L., Oak dieback in France : historical and recent records, possible causes, current investigations, in: Rundgespräche der Kommission für Ökologie, Bd. 5 'Zustand und Gefährdung der Laubwälder', 1993, pp. 97-114
- [23] Luis S., Impact des facteurs sylvicoles et de la nature du sol sur la sensibilité de *Quercus robur* et *Q. rubra* à *Collybia fusipes*. Rapport DEA Biologie Forestière. Université Henry Poincaré, Nancy, France, 2001.
- [24] Marçais B., Caël O., Delatour C., Investigations on the distribution and impact of *Collybia fusipes* in oak forest, in: Delatour C., Guillaumin J.J., Lung-Escarmant B., Marçais B. (Ed), Proceedings of 9th International Conference on Root and Butt Rots of Forest Trees, Carcans-Maubuisson France, colloques de l'INRA n°89, France, 1998, pp. 215-222.
- [25] Marçais B., Cael O., Delatour C., Measuring the impact of *Collybia fusipes* on the root system of oak trees, Ann. For. Sci. 56 (1999) 227-235.
- [26] Marçais B., Caël O., Delatour C., Relationship between presence of basidiomes, above-ground symptoms and root infection by *Collybia fusipes* in oaks, For. Path. 30 (2000) 7-17.
- [27] Nageleisen L.M., Méthode d'évaluation de l'aspect du houppier (protocole DEPEFEU), Département Santé des Forêts-Echelon technique Nord-Est. Bulletin technique, 1995.
- [28] Nanta M., Vellinga E.C., Atlas van Nederlandse Paddesstoelen. A. A. Balkema, Rotterdam, Brookfield, 1995.

- [29] Oosterbaan A., Nabuurs G.J., Relationships between oak decline and groundwater class in the Netherlands., *Plant and Soil* 136 (1991) 87-93.
- [30] Piou D., Delatour C., Marçais B., Hosts and distribution of *Collybia fusipes* in France, *For. Path.* 32 (2002) 29-41.
- [31] SAS Institute Inc., SAS/STAT User's Guide, Version 6, Fourth edition, Vol I Cary, 1989
- [32] Thomas F.M., Hartmann G., Soil and tree water relations in mature oak stands of northern Germany differing in the degree of decline, *Ann. Sci. For.* 53 (1996) 697-720.
- [33] Whitney R.D., Site variation of *Armillaria mellea* in three Ontario conifers, in: G.A. Kile (Ed), *Proceedings of the 6th International Conference of Root and Butt Rot*, International Union of Forestry Research Organizations, Melbourne, Victoria, Gympie, Queensland, Australia., 1984, pp. 122-130.
- [34] Winton L.M., Hansen E.M., Molecular diagnosis of *Phytophthora lateralis* in trees, water, and foliage baits using multiplex polymerase chain reaction, *For. Path.* 31 (2001) 275-283.

## PUBLICATION III

---

Inoculation of mature pedunculate oaks (*Quercus robur*) with the root rot fungus

*Collybia fusipes*: relationships with tree vigour and soil factors

---

C. CAMY, C. DELATOUR, O. CAËL and B. MARÇAIS

Unité de Pathologie Forestière, INRA, Centre de Nancy, F54280, Champenoux, France

**Mots clés:** *Collybia fusipes*, inoculations, pourridié, chêne, *Quercus robur*, engorgement du sol, hydromorphie

— Accepté pour publication dans : 'European Journal of Plant Pathology' —

**Inoculation of mature pedunculate oaks (*Quercus robur*) with the root rot fungus  
*Collybia fusipes*: relationships with tree vigour and soil factors**

By C. Camy, C. Delatour, O. Caël and B. Marçais

Unité de Pathologie Forestière, INRA Nancy, F54280, Champenoux, France

Short title : *Collybia fusipes* inoculations, oak vigour and soil factors

**Keywords** : root rot fungus, artificial inoculations, soil waterlogging

**Abstract**

The severity of natural infections induced by the root rot fungus *Collybia fusipes* strongly depends on soil factors. Severely infected trees usually show reduced vigour, as evidenced by poor growth. However, it is not known whether reduced vigour could be a cause of the severe infection. The objective was to clarify the relationships between soil factors, tree vigour and susceptibility of *Quercus robur* to *C. fusipes* by artificially inoculating mature trees. Two experiments were done to compare oak trees of different ages and dominance class and oak trees growing on different type of soils. The inoculum survival and the infection success were poor in both experiments when waterlogging was severe. Inoculum survival was better in soil with increasing sand/clay ratio, carbon/nitrogen ratio and decreasing pH and calcium, magnesium and phosphorus availability. The relationships between oak vigour and success of infection or surface area of lesions were inconsistent, with a slightly higher infection success on co-dominant/suppressed oaks in one experiment and a higher surface area of successful infection on dominant oaks in the second.

## Introduction

*Collybia fusipes* causes a root rot on pedunculate oak (*Quercus robur*), sessile oak (*Q. petraea*) and red oak (*Q. rubra*), and on beech, (*Fagus sylvatica*), chestnut (*Castanea sativa*), hornbeam (*Carpinus betulus*) and hazelnut (*Corylus avellana*) (Buller, 1958; Kreisel, 1961; Delatour and Guillaumin, 1984; Guillaumin et al., 1985). This fungus is widespread in the oak forests of north east France where it develops especially at the base of pedunculate and red oaks (Marçais et al., 1998a; Piou et al., 2002). Artificial inoculations show that *C. fusipes* is a slow primary pathogen capable of infecting vigorous young oak saplings and mature oaks (Marçais and Delatour, 1996; Marçais and Caël, 2000). In field conditions, *C. fusipes* spreads by the way of basidiospores (Marçais et al., 1998b) and natural infections result in root destruction, the severity of which strongly depends on soil factors. Indeed, *C. fusipes* rot is more frequently reported in sandy soil and the likelihood of dieback of an oak with signs of *C. fusipes* infection increases with the sand content of the soil (Camy et al., 2003c). At the stand level, severity of natural *C. fusipes* infections increases with decreasing severity of waterlogging (Piou et al., 2002, Camy et al., 2003a). Nevertheless, it is not understood whether the differences in incidence in the different soil types result from a direct effect of soil factors on the pathogen itself or from an indirect effect on tree physiology.

Trees infected with *C. fusipes* have poor growth (Marçais and Caël, 2001). However, because root rots are slowly developing diseases and growth reductions are usually long term, it is difficult to determine to which degree the pathogen is the cause of the poor tree vigour, by which we mean a growth slower than the neighbour trees for a long period. Alternatively, trees with poor vigour could show an increased susceptibility to *C. fusipes* and be preferentially infected.

Our objective was to clarify, under field conditions, the relationships between soil factors, tree vigour and the susceptibility of *Q. robur* to *C. fusipes* in the early stages of the infection process. Thus, pedunculate oak susceptibility to *C. fusipes* was studied in two experiments, by artificial inoculations in relation to tree age, vigour measured by dominance class of the trees, and soil conditions.

## 1 Material and methods

### 1.1 *Fungus isolates and inoculum production*

Four isolates of *C. fusipes* were used. C49 was isolated from a red oak in 1992 at Les Barres, Loiret, C41 and C52 were isolated from pedunculate oaks in 1994 at Siarrouy, Haute-Pyrénées and in 1993 at Mersuay, Haute-Saône respectively. C62 was isolated from sessile oak in 1994 at Amance, Meurthe-et-Moselle.

Pieces of wood were colonised by *C. fusipes* (Marçais and Delatour, 1996). Briefly, stems of hazel, *Corylus avellana*, 1.5-2.5 cm in diameter, were collected and cut into segments 3 cm long. They were placed in glass jars filled with tap water and sterilised twice at 120°C for 30 min, 24 h apart. The water was drained at the end of each sterilisation. A liquid malt medium was added to cover half the height of the wood segments and a third sterilisation was done for 20 min at 120°C. To improve aeration, a hole was drilled in the jar top and plugged with cotton wool. Each of the jars was aseptically seeded with blocks of inoculum (0.5 x 0.5 cm) from a *C. fusipes* culture on malt agar (20 g l<sup>-1</sup> malt Difco, 15 g l<sup>-1</sup> agar) and then incubated for 30-45 days at 23°C. All the liquid was drained from the jars with a syringe and they were further incubated at 23°C for 8-9 months.

## 1.2 *Inoculation experiment I*

Sixty mature pedunculate oaks were selected for inoculation in 17 stands from the forest of Amance, Meurthe-et-Moselle. The stands were selected to represent different tree ages (50 to 200-years-old) and because of the presence of *C. fusipes* root rot. They were mixed pedunculate and sessile oak stands with an understory dominated by hornbeam. An effort was made to select stands that were homogeneous as far as vegetation type was concerned. Soils were of a loamy clay texture and were quite rich, with pH of the surface soil in water being 4.9 to 5.9. The first traces of waterlogging appeared from 5 to 55 cm under soil level depending on the stands. Sampling was designed to obtain 9-12 trees in each of six age classes, about 50, 70-90, 100-120, 120-140, 140-160 and over 160-years-old. Two to five trees were selected per stand, with no more than three oaks in a particular age class from the same stand. Thirty-six trees were dominant and the others were co-dominant or suppressed. Care was taken that the suppressed/co-dominant trees were well distributed within the six age classes. Pedunculate oaks were identified with binoculars using leaf morphology and acorns (when present). A wood core to the centre of the stem was extracted at breast height on each tree and was used to estimate its age and its radial growth during the last 10 years. Radial growth was standardised (Becker et al., 1994) to remove the effect of age. Tree height and the tree diameter at

**Table 1:** Characteristics of the 10 plots selected for experiment II.

Plot	sand content (%)	sand/clay ratio	pH	carbon/nitrogen ratio	waterlogging depth (cm)	inoculum survival (%)	infection success (%)
Arpenans	3.4	0.1	4.9	13.5	27	62	74
Filain	7.2	0.2	5.8	13.3	25	77	86
Amance	11.5	0.4	5.7	12.3	29	79	79
Adelans	15.3	0.7	4.3	15.9	63	73	54
Ainvelle P21	26.1	1.2	5.6	13.0	40	69	88
Mersuay	30.3	1.1	5.2	12.9	38	70	85
Quers	33.4	1.7	4.4	15.7	36	78	90
Equevilley	35.0	2.0	4.1	17.1	87	88	94
Ainvelle P28	45.0	1.8	4.5	15.4	40	80	76
Les Aynans	53.0	2.7	4.1	14.6	42	88	67

NOTE: The sand and clay content was evaluated in the upper most 10 cm of the soil surface. The pH at the soil surface was measured from 10g of dry soil in 50 ml of deionized water. Organic carbon (sulfocromic method) and total nitrogen (kjeldahl method) were measured from soil samples in the first 10 cm under soil surface. The waterlogging depth was the depth at which any signs of iron depletion or deposition occurred.

breast height were measured. The ratio height/diameter was calculated to reflect the average tree vigour in the past. Severity of waterlogging was estimated for each tree by extracting a soil core at about one metre from the collar to determine the depth of appearance of first signs of mottling, i.e. first reddish traces of insoluble oxidized iron deposition and/or discoloration indicating iron depletion.

In May 1997, the sixty trees were inoculated with the colonised hazel stem segments. Collar roots were exposed and three roots, 2-5 cm in diameter at a depth varying between 10-30 cm, were selected for inoculation. The surface of the bark was brushed and washed with water and a hazel stem segment colonised with C41, C49 or C52 was fastened firmly in contact with the unwounded bark on one of the three selected roots. Each tree was inoculated with the three isolates. A total of 180 roots were inoculated. Six additional control inoculations had uncolonised hazel stem segments attached to the roots. Root diameters were recorded and the soil was replaced. In December 1999, 2.5 years after inoculation, the inoculated roots were excavated and a section of the root with all the infection present was cut and brought back to the laboratory for examination. The condition of the inoculum was recorded. Survival of *C. fusipes* was assumed when black crusts covered the inoculum surface and white mycelium was present underneath and/or when the wood had a bright orange colour. Infections often occurred in non coalescent lesions under and/or in the vicinity of inoculum. The maximum length and width of each lesion in the bark was recorded as well as its depth of penetration within the bark. The global surface area of the lesions was estimated as the sum of geometric means of the 2 diameters of each surface area  $\Sigma(\pi \times (\text{length} \times \text{width}) / 4)$ . Isolation of *C. fusipes* was attempted from pieces of necrotic root bark and wood putatively colonised by the fungus as well as from the inoculum segment. They were washed under water, surface sterilised for 1 min in sodium hypochlorite at 3.75% active chlorine and rinsed 3 times in sterile water. The outer bark was removed and chips of dead bark or decayed wood were plated on MAT medium (10 g l<sup>-1</sup> of malt Difco, 100 mg l<sup>-1</sup> penicillin, 100 mg l<sup>-1</sup> streptomycin, 250 mg l<sup>-1</sup> thiabendazole and 15 g l<sup>-1</sup> agar). Isolates that were recovered were paired on malt agar medium with a control isolate of C41, C49 and C52 to check whether they were the ones that had been inoculated.

### 1.3 *Inoculation experiment II*

Ten plots where *C. fusipes* was present were selected in north-eastern France to obtain a range of soil sand content (Table 1). The majority of plots were pedunculate oak stands with an understory



dominated by hornbeam. In the plots of Amance, Adelsans, Filain and Quers pedunculate oaks were mixed with sessile oaks. Fifteen mature pedunculate oaks (over 90 years old) were inoculated in each plot. Oak species was determined from leaf morphology. Seventy percent of the trees were dominant and 30% were co-dominant or suppressed. Height and diameter at breast height were measured for each tree and the ratio height/diameter was computed.

In autumn 1998, each pedunculate oak was inoculated with the three isolates of *C. fusipes* C41, C49 and C62. In total, 450 roots (10 plots X 15 trees X 3 isolates) were inoculated. Three additional roots per plot were inoculated with a hazel segment which had not been colonized by *C. fusipes* as controls. Inoculations were excavated 2.5 years later. Isolates that were successfully recovered from the lesions were paired with control isolates of C41, C49 and C62. On each plot, 3 soil samples of 0.5 dm<sup>3</sup> were collected from the 10 first cm, with an earth auger and analysed for texture, organic carbon content (sulfochromiq method), total nitrogen content (Kjeldahl method), pH (10g of soil in 50 ml of deionized water), assimilated phosphorus (Duchaufour method) and exchangeable cations (cobaltihexamine method) such as calcium, magnesium, potassium, manganese. All these soil analyses were carried out following the AFNOR norms concerning soil quality (AFNOR, 1999). The bulk density of soil was also evaluated from 15 soil samples per plot. Soil samples of 0.7 dm<sup>3</sup> were collected from the 15 first cm, at the base of each tree, dried at 110°C for 48 hours and weighed. The bulk density was computed as the weight per unit volume. The severity of waterlogging was evaluated at the base of each tree as described in experiment I.

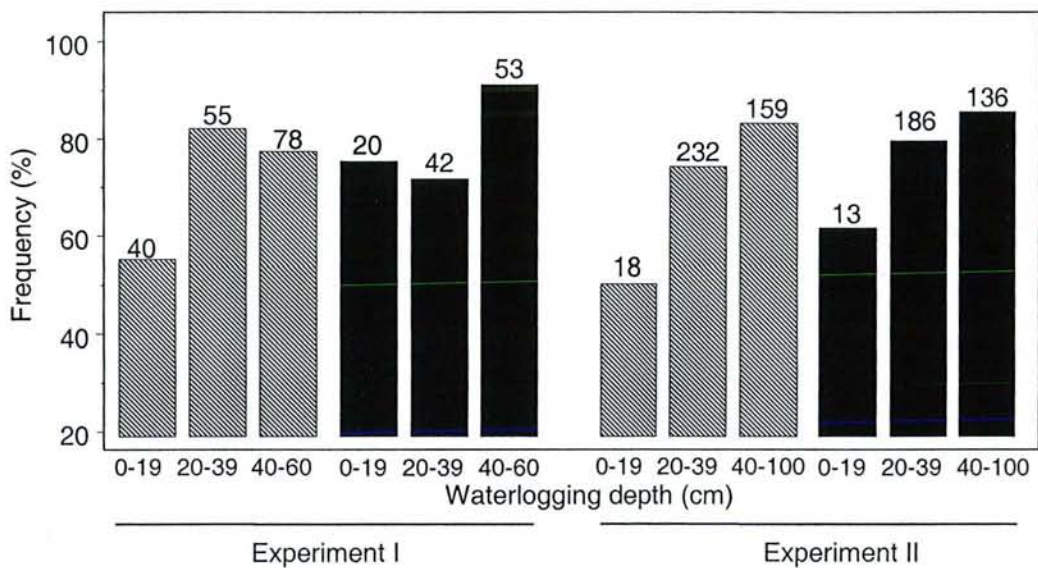
#### 1.4 Data analysis

Inoculum survival was computed from the recorded inoculum condition. For the roots where inoculum could not be retrieved (14 in experiment I and 55 in experiment II), it was assumed that survival had occurred whenever a lesion was present on the inoculated root. A lesion was assumed to be present whenever a necrosis with a depth of penetration in the bark over 3mm was present. It is very difficult to determine whether less developed necrosis are induced by *C. fusipes* as their appearance is non-specific and isolation of the pathogen from them is seldom successful. The infection success was computed as the frequency of lesion per effectively inoculated roots, i.e. roots with an inoculum alive. The relationships between inoculum survival, *C. fusipes* isolates and soil factors and between the success of infection, soil factors and tree characteristics were analysed by generalised linear analysis,

**Table 2.** Factors affecting survival of *C. fusipes* on hazel stem segments and infection success on mature pedunculate oaks (experiment I): component likelihood  $\chi^2$  value associated with the introduction of each effect into the generalised linear model

Source	Survival on hazel stem segments		Infection success <sup>a</sup>
	df	$\chi^2$ (p value)	$\chi^2$ (p value)
Isolate	2	5.7 (0.059)	4.5 (0.104)
Waterlogging	1	5.0 (0.025)	4.7 (0.031)
Dominance class	1	-	6.5 (0.011)
Tree age	1	-	2.0 (0.161)
Age x dominance class	1	-	1.1 (0.287)

<sup>a</sup> Presence of lesion taking into account only inoculated roots where *C. fusipes* was still present on the hazel stem segment at the end of the experiment



**Figure 1:** Survival of *C. fusipes* on hazel stem segments (▨) and infection success (■) for inoculations with *C. fusipes* persisting on the stem segment on mature pedunculate oaks (Experiments I and II) among different categories of waterlogging severity (depth to first traces of iron deposition or depletion). The number of hazel stem segments or the number of seedlings with active inoculum, in each category of waterlogging, is given above the bars.

using the procedure *genmod* of SAS (SAS 1989). A binomial distribution of the data was assumed and the logistic link function was used. The model validity was checked using the deviance degree of freedom ratio, by plotting deviance residuals against the linear predictor and with a half normal plot (Collett, 1991). To study the relationship between the surface area of lesion induced by *C. fusipes*, soil factors and tree characteristics, the lesion surface area was log transformed to obtain a normal distribution of residuals and subjected to an analysis of variance using the procedure *glm* of SAS.

In experiments I and II, we checked that there was no statistical link between tree characteristics, such as crown health status or age, and the inoculum survival before analysing further results.

In experiment II, two types of analyses were performed for variables measured at the plot level (soil factors except depth to waterlogging traces) and at the tree level (depth to waterlogging traces, tree characteristics such as dominance class). For tree level analyses, the plot factor was taken into account by treating plots as blocks. The depth to waterlogging signs was tested in the model at the tree level because waterlogging severity was very variable within most plots. Also traces of iron deposition or depletion in water saturated soil depends on the pH of the soil.

## 2 Results

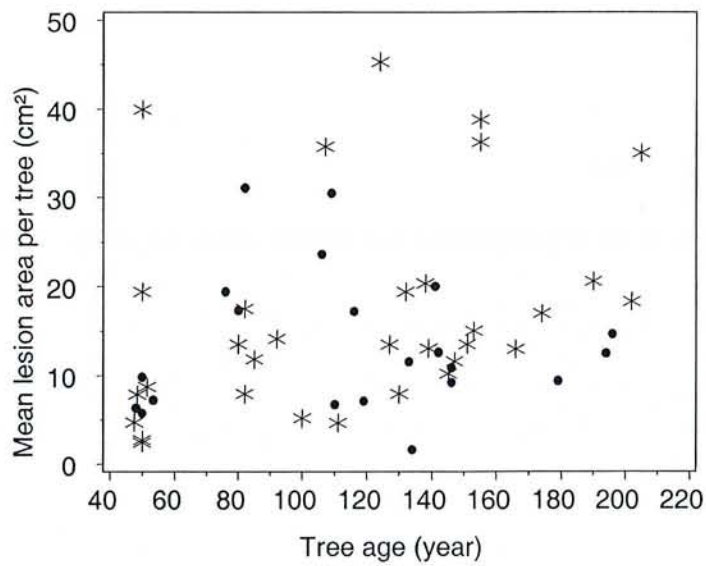
### 2.1 Experiment I

Seven roots could not be retrieved or were infected by a *C. fusipes* isolate that proved to be different from the one inoculated, so altogether 173 of the inoculated roots could be analysed. *Collybia fusipes* was alive in 65 % of the hazel stem segments used as inocula and was isolated from all the active segments. Inoculum survival was not significantly different for the 3 isolates (53%, 69% and 74% for C41, C49 and C52, Table 2) and was significantly related to the severity of waterlogging (Table 2). *Collybia fusipes* did not persist as well on the stem segments in the more severe waterlogging conditions, where traces of waterlogging appeared close to the soil surface (Figure 1).

Lesions were present on 54% of the roots and *C. fusipes* was isolated from 98% of successful infections. Eighty-nine percent of successful infections had reached the cambium. Neither tree age nor the isolate influenced infection success, i.e. the likelihood of infection when the parasite had persisted

**Table 3.** Factors affecting the lesion surface area of successful infections on mature pedunculate oaks (experiment I): an analysis of variance

Source	Df	Mean Square	F value	Pvalue
Model	6	1.04	1.62	0.145
Error	86	0.63		
Isolate	3	0.58	1.04	0.356
Waterlogging	1	0.65	1.03	0.312
Tree age	1	2.39	3.80	0.055
Dominance class	1	0.64	1.01	0.312
Age x dominance class	1	1.04	1.65	0.312



**Figure 2:** Susceptibility to *Collybia fusipes* of mature pedunculate oaks of different age and competition status (Experiment I). \*, Dominant trees; •, Codominant/suppressed trees. Only successful infections are taken into account.

on the segment (Table 2). Infection successes were 71%, 78% and 91% for C41, C49 and C52. Infection success increased significantly with decreasing waterlogging and was slightly higher on suppressed/co-dominant trees (87 %) compared to the dominant trees (76 %, Table 3, Figure 1). The surface area of a successful infections did not depend on tree age (Table 3). However, there was a non significant tendency for trees of 50-years-old to have smaller lesions ( $12.0 \pm 1.4 \text{ cm}^2$  compared to  $16.3\text{-}18.9 \text{ cm}^2$  for trees 80 to over 160-years-old). The surface area of successful infection was also not affected by waterlogging or tree dominance class and was  $14.3 \pm 2.5 \text{ cm}^2$  for dominant trees and  $12.5 \pm 2.5 \text{ cm}^2$  for suppressed/co-dominant trees (Table 3, Figure 2). Two additional measures of tree vigour were used to test the relationship between tree susceptibility to the pathogen and tree vigour, tree radial growth in the ten last years and the height/diameter of trunk ratio. These two measures were not related either with the infection success or with the successful lesion surface area (results not shown).

## 2.2 Experiment II

Because ten trees were wind thrown during the storm of December 1999, 30 roots could not be re-located. Eleven roots had lesions that yielded a *C. fusipes* isolate that was not the one inoculated. So, the results from only 409 of the 450 inoculated roots could be analysed. *Collybia fusipes* was still alive in 76% of hazel segments and was reisolated from 52% of them. Inoculum survival was not different between the *C. fusipes* isolates (Table 4) being 76%, 72% and 81% for C41, C49, and C62. It was not significantly linked with phosphorus, manganese or bulk density (Table 5). By contrast, inoculum survival increased significantly with increasing sand/clay and carbon/nitrogen ratio and decreasing pH, exchangeable potassium, calcium and magnesium content (Table 5, Figure 3). All the soil properties are tightly correlated, in particular pH with exchangeable content, sand/clay and carbon/nitrogen ratio (results not shown). The survival of inoculum was not significantly different in the different plots although it varied from 61% at Arpenans to 88% at les Aynans and Equevilley (Table 4). Within plots, inoculum survival increased with increasing depth to signs of waterlogging (Table 4, Figure 1).

Sixty-six percent of the roots were infected with *C. fusipes*. The rate of *C. fusipes* isolation from the successful infections was only 44%. However, lesions were typical of the type induced by *C. fusipes* as reported in the literature (Marçais and Caël, 2000) and were kept as successful infections. It was

**Table 4:** Factors affecting inoculum survival, infection success and lesion surface area of successful infections (experiment II, analyses at the tree level).

	Inoculum survival		Infection success		Surface area of lesion	
	df	$\chi^2$ (p value)	df	$\chi^2$ (p value)	df	F (p value)
Plot	9	11.41 (0.249)	9	11.31 (0.255)	9	1.08 (0.183)
Isolate	2	3.41 (0.182)	2	2.45 (0.294)	2	1.71 (0.183)
Waterlogging	1	4.91 ( <b>0.027</b> )	1	8.45 ( <b>0.004</b> )	1	0.10 (0.753)
Dominance class	-		1	0.19 (0.660)	1	5.99 ( <b>0.015</b> )

Note : regressors were introduced together in the model, after taking into account the effect of plot. Waterlogging severity and tree characteristics were assessed for every tree.

**Table 5:** Soil factors affecting inoculum survival, infection success and lesion surface area of successful infections (experiment II, analyses at the plot level).

	Inoculum survival		Infection success		Surface area of lesion	
	df	$\chi^2$ (p value)	df	$\chi^2$ (p value)	df	F(p value)
Sand/Clay	1	6.41 ( <b>0.011</b> )	1	0.13 (0.718)	1	0.05 (0.823)
Bulk density	1	3.35 (0.067)	1	0.09 (0.771)	1	0.04 (0.833)
Carbon/nitrogen	1	6.03 ( <b>0.014</b> )	1	0.04 (0.834)	1	0.27 (0.605)
pH	1	6.83 ( <b>0.009</b> )	1	0.81 (0.367)	1	0.23 (0.633)
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	1	1.60 (0.206)	1	2.46 (0.117)	1	0.21 (0.644)
K	1	5.63 ( <b>0.018</b> )	1	0.00 (0.999)	1	0.02 (0.887)
Ca	1	4.84 ( <b>0.028</b> )	1	1.04 (0.308)	1	0.24 (0.627)
Mg	1	6.40 ( <b>0.011</b> )	1	1.35 (0.245)	1	2.50 (0.115)
Mn	1	0.67 (0.412)	1	0.00 (0.975)	1	1.83 (0.177)

Note : Each soil factor was introduced separately in the model. Soil factors were assessed at the plot scale.

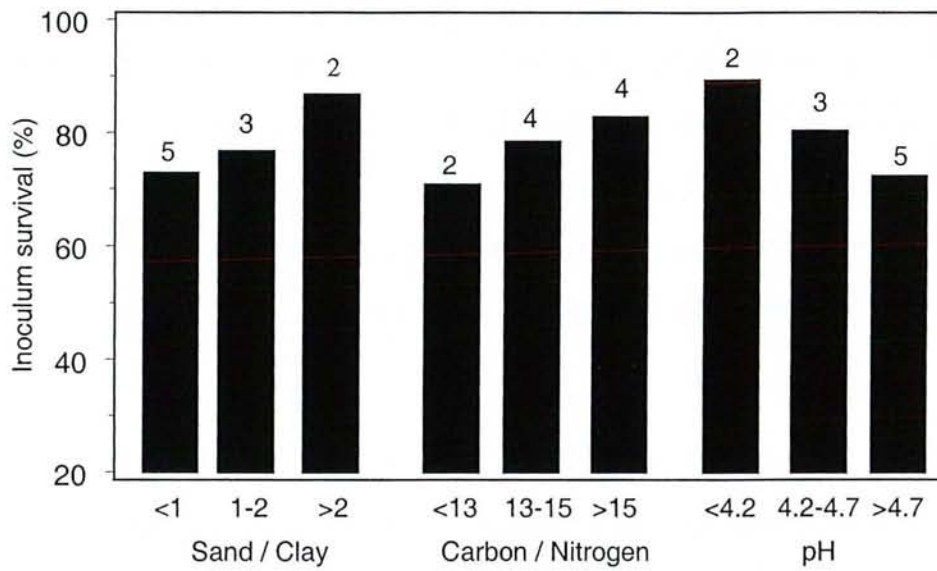
assumed that these infections were induced by the inoculated isolates, because infections induced by wild isolates were usually much bigger than those induced by the inoculated ones. Lesions had reached the cambium in 88% of the successful infections. The infection success was not significantly different for the three *C. fusipes* isolates (Table 4) and was 78% for C49 and C62 and 84% for C41. It ranged from 54% in the plot of Adélans to 94% in the plot of Equevilley (Table 1). Infection success was significantly influenced by waterlogging. Indeed it increased with the depth of waterlogging signs (Table 4, Fig 1). It was not significantly linked with any of the other soil factors or tree characteristics (Tables 4 and 5).

*C. fusipes* isolates did not differ in the size of the lesions they induced ( $df=2$ ,  $F=2.01$ ,  $p$  value=0.136). The surface area of lesions was not significantly different among plots, although it varied from  $30.9 \pm 3.6$  cm<sup>2</sup> in Mersuay to  $54.6 \pm 8.7$  cm<sup>2</sup> in Filain. Lesion surface area was not linked with any of the soil factors (Tables 4 and 5). By contrast, lesion surface area was significantly linked with the dominance class of the trees and was  $33.4 \pm 3.6$  cm<sup>2</sup> for suppressed/co-dominant trees and of  $43.8 \pm 3.6$  cm<sup>2</sup> for dominant ones (Table 4). As found in experiment I, the ratio height/diameter of trunk was not significantly related either with likelihood of infection success or with successful lesion surface area (results not shown).

### 3 Discussion

The early stages of the *C. fusipes* infection process were strongly influenced by soil factors. The pathogen itself and in particular the inoculum survival was clearly affected by the severity of waterlogging and by soil factors linked to texture such as pH, exchangeable cation availability and nitrogen/carbon ratio. Conversely, there were no effects of tree age on infection success or size of successful infections; also the influence of the tree dominance class on these two measures of tree susceptibility to *C. fusipes* was inconsistent between the experiments.

The infection success and lesion mean surface areas obtained on mature pedunculate oaks in the two experiments were similar to those already obtained in previous inoculation experiments on mature oaks, *Q. petraea*, *Q. robur* and *Q. rubra* (Marçais and Caël, 2000). In particular, they were very close to what was obtained on red oak, with infection success over 70 %. In contrast, infection success on sessile oak was only 33 % in this previous work. This could reflect inherently higher susceptibility to



**Figure 3:** Percentage of *C. fusipes* inoculum survival in soils of different sand/clay ratio, carbon/nitrogen ratio and the soil pH (Experiment II). These soil factors were measured at the plot scale. They have been categorised. The number of plots in each category is given above the bars.



*C. fusipes* of *Q. robur* and *Q. rubra* compared to *Q. petraea* and may explain why the disease is more frequent in those two oak species (Piou et al., 2002).

Despite the 2.5 year duration of the experiment, only the early stage of the infection process was studied. Indeed, by field investigations, it was determined that the average period required by *C. fusipes* to affect severely the root system of an oak was about 30 years after the initial infection (Camy and Marçais, 2002). This may be a major pitfall in inoculation studies of slowly evolving root rot pathogen (Redfern, 1983, 1998; Goheen and Hansen, 1994). Indeed, Redfern (1983, 1998) found evidence in a field inoculation experiment with *H. annosum* on Sitka spruce, that whereas infection success was equal in mineral and peat soil after five years, large differences in disease development between the two soil types could be evidenced after 10 years. However, in this case, *H. annosum* was introduced via stump inoculation, so that it clearly took a considerable time to spread to the root systems of neighbouring trees. Even in favourable soil conditions, this must have required a longer period than in our case where *C. fusipes* inoculum was directly fastened to the inoculated roots. It is worth noting that short incubation periods (respectively of four and about one years) were long enough to demonstrate differences in susceptibility to *C. fusipes* of different oak species (Marçais and Caël, 2000) and differences in susceptibility to *Armillaria* of *Q. robur* or *Pinus sylvestris* of different social status (Redfern, 1978; Davidson and Rishbeth, 1988).

Soil factors related to survival of inoculum were tightly correlated. *Collybia fusipes* survived better on woody inocula in coarser and poorer soils. This might be part of the reason why *C. fusipes* is found more in coarse textured soils and why infection has a higher negative impact on tree health in soil with a sandy texture and low pH (Camy et al., 2003c). Blenis et al. (1989) similarly observed a greater survival of *A. ostoyae* inoculum in sandy soils and supposed that such results could be related to the high oxygen availability in such type of soils. This hypothesis could also be applied to *C. fusipes* which appears to be intolerant to hypoxia (Camy et al., 2003b). The negative influence of waterlogging on inoculum survival could also be linked to a strong reduction of oxygen, especially in heavy soils (Lévy and Lefèvre, 2001; Nisbet et al., 1989). Indeed, inoculum survival and infection success decreased in the present study when waterlogging traces appeared close to the soil surface. These results support field observations in which natural *C. fusipes* infection was shown to be more severe when soil is less affected by waterlogging (Piou et al., 2002; Camy and Marçais, 2002; Camy et al., 2003a). However,

in the absence of any relationship between soil apparent density and inoculum survival or infection success there remains no evidence that soil texture affects the pathogen directly through oxygen availability. The coarse soils differ from the finer-textured ones for many factors and it is difficult to pinpoint the reason that makes them more favourable to *C. fusipes* survival.

There was no evidence that oak trees growing in the coarser and more acidic soils showed a higher susceptibility to *C. fusipes*, as far as infection success or successful lesion surface area were concerned. This is in contrast with what is reported for other root rots in the literature. Indeed Singh (1983) and Redfern (1978) reported that seedlings of several species of conifers, inoculated with *Armillaria* spp., showed an increased susceptibility when grown in more coarse and acidic soils. Piri (2000) reported a lower survival of the pathogen in roots of Scots pine inoculated with *H. annosum* on plots fertilised 3 years before inoculation, as well as a lower infection success and extension of this pathogen in roots.

Despite the different parameters assessed reflecting tree vigour, such as dominance class, ratio height/diameter or tree growth, there were no consistent relationships between tree vigour and infection success or size of successful infections. This is in agreement with the results of a six year survey of the evolution of *C. fusipes* natural infections on red oaks which did not show correlation between tree vigour and occurrence of new infections or development of established infection (Camy and Marçais, 2002). Results reported with other root rot diseases are variable. Goheen and Hansen (1994), working on western Hemlock and Douglas fir inoculated with *Phellinus weirii* did not find any correlation between dominance class and infection success or root colonisation. However, Davidson and Rishbeth (1988) demonstrated that *A. gallica*, considered as a secondary pathogen, was able to infect only suppressed trees in field inoculations, whereas *A. mellea* and *A. ostoyae*, considered as primary pathogens could attack co-dominant trees. Also Redfern (1978) showed that suppressed Scots pines inoculated with *Armillaria* spp were more susceptible than dominant ones. Tree past vigour might not be representative of its actual vitality which could be defined as its capacity to survive in a next future, and can often be characterised by amount of energy reserves, such as root starch content (Wargo and Houston, 1974). However we did not quantify any reserves and can therefore draw no conclusions on the relationship between susceptibility to *C. fusipes* and tree vitality.

*Q. robur* is a species requiring good availability of water and mineral nutrients (Becker and Lévy, 1990). Soils favourable to *C. fusipes* often have a deficiency of these requirements, which could lower the vigour of the oak trees. However, our study cannot allow us to conclude that poor vigour or growth in a soil with low nutrient content could lead to an increased susceptibility to *C. fusipes*. In contrast, it is the better persistence of the pathogen on woody debris in the sandy acidic soils favourable to *C. fusipes* that clearly increases the disease risk. Because *C. fusipes* infection progresses at the root/soil interface by ectotrophic mycelial growth, soil conditions favouring pathogen survival could also have a strong positive influence on disease progression on single trees in the long term. Soil conditions probably play a major role in the infection process by favouring the pathogen itself.

### Acknowledgements

The authors wish to thank F. Bernard, S. Luis and G. Maréchal for their technical assistance. The work reported forms part of a PhD thesis submitted to the University of Nancy by the first author and was supported by a grant from the INRA and from the Region Lorraine. The work was also founded by the Office National des Forêts.

### References

- AFNOR (1999) Qualité des sols. Recueil des normes françaises. 4<sup>e</sup> édition, Paris-La Défense.
- Becker M and Lévy G (1990) Le point sur l'écologie comparée du chêne sessile et du chêne pédonculé. *Revue Forestière Française* 42: 148-154.
- Becker M, Nieminen TM and Geremia F (1994) Short-term variations and long-term changes in oak productivity in northeastern France. The role of climate and atmospheric CO<sub>2</sub>. *Annales des Sciences Forestières* 51: 477-492.
- Blenis PV, Mulaga MS and Hiratsuka Y (1989) Soil affects Armillaria root rot of lodgepole pine. *Canadian Journal of Forest Research* 19: 1638-1641.
- Buller HAR (1958) The perennial pseudorhiza of *Collybia fusipes*. In: N.Y. Hafner Publishing CO, USA (ed.), *Researches on Fungi*, Vol 6, pp. 374-396.
- Camy C and Marçais B (2002) Relation between soil factors, root infection by *Collybia fusipes*, and tree health, in *Quercus robur* and *Q. rubra*. In: 10th International conference on Root and Butt rots. Québec, Canada (in press).

- Camy C, Delatour C and Marçais B (2003a) Relationships between soil factors, *Quercus robur* health, *Collybia fusipes* root infection and *Phytophthora* presence. *Annals of Forest Science* (in press).
- Camy C, Dreyer E, Delatour C and Marçais B (2003b) *Collybia fusipes*, soil waterlogging and oxygen availability. *Mycological Research* (submitted).
- Camy C, de Villebonne D and Marçais B (2003c) Soil factors associated with decline of oaks and infection by *Collybia fusipes*. *Forest Pathology* (accepted).
- Collet D. (1991) Modeling binary data, Chapman and Hall, London, UK.
- Davidson AJ and Rishbeth J (1988) Effect of suppression and felling on infection of oak and Scots pine by *Armillaria*. *European Journal of Forest Pathology* 18: 161-168.
- Delatour C and Guillaumin JJ (1984) Un pourridié méconnu : *Collybia fusipes* (Bull. ex Fr.) Quel. *Comptes Rendus de l'Académie d'Agriculture de France* 70: 123-126.
- Goheen E and Hansen E (1994) Tree vigor and susceptibility to infection by *Phellinus werii*: Results of field inoculations. In: Johansson M, Stenlid J (ed.), 8<sup>th</sup> International Conference on Root and Butt Rots. Wik, Sweden and Haiko, Finland (pp. 45-51) Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden.
- Guillaumin JJ, Bernard C, Delatour C and Belgrand M (1985) Contribution à l'étude du dépérissement du chêne : pathologie racinaire en forêt de Tronçais. *Annales des Sciences Forestières* 42: 1-22.
- Kreisel H, (1961) Die phytopathogenen grosspilze Deutschlands. VEB gustav Fisher-Verlag, Jena.
- Lévy G and Lefèvre Y (2001) Les contraintes subies par les arbres sur sol à nappe temporaire. La forêt et sa culture sur sol à nappe temporaire, ENGREF, Nancy, FRANCE.
- Marçais B and Caël, O (2000) Comparison of the susceptibility of *Quercus petraea*, *Q. robur* and *Q. rubra* to *Collybia fusipes*. *European Journal of Plant Pathology* 106: 227-232.
- Marçais B and Caël, O (2001) Relation between *Collybia fusipes* root rot and growth of pedunculate oak. *Canadian Journal of Forest Research* 31: 757-764.
- Marçais B and Delatour C (1996) Inoculation of oak (*Quercus robur* and *Q. rubra*) with *Collybia fusipes*. *Plant Disease* 80: 1391-1394.
- Marçais B, Caël O and Delatour C (1998a) Investigations on the distribution and impact of *Collybia fusipes* in Oak forest, In: Delatour C., Guillaumin JJ, Lung-Escarmant B and Marçais (ed.) 9<sup>th</sup> International Conference on Root and Butt Rots of Forest Trees, Carcans-Maubuisson, France (pp. 215-222) INRA, Colloques de l'INRA n°89, Paris, France.
- Marçais B, Martin F and Delatour C (1998b) Structure of *Collybia fusipes* populations in two infected oak stands. *Mycological Research* 102: 361-367.
- Nisbet TR, Mullins CE and Macleod, DA (1989) The variation of soil water regime, oxygen status and rooting pattern with soil type under Sitka spruce. *Journal of Soil Science* 40 183-197.

- Piou D, Delatour C and Marçais B (2002) Hosts and distribution of *Collybia fusipes* in France. *Forest Pathology* 32: 29-41.
- Piri T (2000) Response of compensatory-fertilized *Pinus sylvestris* to infection by *Heterobasidion annosum*. *Scandinavian Journal of Forest Research* 15: 218-224.
- Redfern DB (1978) Infection by *Armillaria mellea* and some factors affecting host resistance and the severity of the disease. *Forestry*, 51:121-135
- Redfern DB (1983) Factors affecting spread of *Heterobasidion annosum* in plantations, In: Kile GA (ed.) 6<sup>th</sup> international conference on Root and Butt Rots of forest trees. Melbourne, Victoria and Gympie, Queensland, Australia (pp. 104-109) CSIRO, Melbourne, Australia.
- Redfern DB (1998) The effect of soil on root infection spread by *Heterobasidion annosum*, In: Delatour C., Guillaumin JJ, Lung-Escarmant B and Marçais B (ed.) 9<sup>th</sup> International Conference on Root and Butt Rots of Forest Trees, Carcans-Maubuisson, France (pp. 267-273) INRA, Colloques de l'INRA n°89, Paris, France.
- SAS Institute Inc. (1989) SAS/STAT User's guide, Version 6, Fourth edition, Vol I Cary.
- Singh P. (1983) *Armillaria* root rot: Influence of soil nutrients and pH on the susceptibility of conifer species to the disease. *European Journal of Forest Pathology*, 13: 92-101
- Wargo PM and Houston DR (1974) Infection of defoliated sugar maple trees by *Armillaria mellea*. *Phytopathology* 64: 817-822.

## PUBLICATION IV

---

### Responses of the root rot fungus '*Collybia fusipes*' to soil waterlogging and oxygen availability

---

C. Camy, E. Dreyer\*, C. Delatour and B. Marçais

Unité de Pathologie Forestière, INRA, Centre de Nancy, F54280, Champenoux, France

\*UMR INRA UHP « Ecologie-Ecophysiologie Forestières », INRA, Centre de Nancy, F54280, Champenoux, France

**Mots clés** : *Collybia fusipes*, pourridié, engorgement du sol, oxygène

— Soumis à 'Mycological Research'—

## 2 Introduction

*Collybia fusipes* (Bull.: Fr.) Quéf is a primary parasite that induces slowly evolving root rots in various species of broadleaved trees (Delatour & Guillaumin, 1984). In France, *C. fusipes* is common in oak forests and develops mainly at the base of mature pedunculate oaks (*Quercus robur* L.) (Marçais, Caël & Delatour, 1998; Piou, Delatour & Marçais, 2002). The distribution of the parasite in forest ecosystems and the severity of root damage induced during infection strongly depend on soil factors. Indeed, *C. fusipes* is preferentially distributed in oak forests growing on coarse textured soils (Camy *et al.*, 2002b). This root rot pathogen was also reported to occur preferentially in dry soils (Guillaumin *et al.*, 1985; Nanta & Vellinga, 1995). At stand level, temporary waterlogging in the soil is an important factor modulating the severity of *C. fusipes* natural infection on *Q. robur* and *Q. rubra* L. : trees on waterlogged soils are much less prone to disease (Piou *et al.*, 2002; Camy & Marçais, 2002; Camy, Delatour & Marçais, 2002a). Furthermore, the success of direct inoculation of mature oak trees was strongly reduced in waterlogged soils (Camy *et al.*, 2002c).

Excess of water in soils results in gradual oxygen depletion. As a consequence, chemical and biological soil properties are severely affected with important consequences for the activity of soil micro-organisms and plant roots (Drew & Lynch, 1980). Micro-organisms populations shift to anaerobes and potentially toxic chemicals such as phenolic and aromatic acids or hydrogen sulfides may accumulate (Drew & Lynch, 1980). Denitrification occurs at high rates as a consequence of soil water saturation (Grundmann & Rolston, 1987). Thus, under field conditions, many factors related to waterlogging could interact with *C. fusipes*, and affect mycelium survival, infection and disease development. However, we hypothesised that the low frequency of presence of the pathogen in waterlogged soils, as compared to the very high frequency in coarse textured soils, could primarily result from its high susceptibility to hypoxia. An impact of oxygen availability on the survival and distribution of root rot fungi has already been mentioned by several authors. Blenis, Mulaga & Hiratsuka (1989) observed that the survival of *Armillaria ostoyae* (Romagn.) Herink. on woody inocula was higher in sandy soils and related this observation to a larger oxygen availability in such soils. Production of *Armillaria* spp. rhizomorphs is indeed reduced under hypoxia and their abundance decreases with the depth of soil or soil water saturation in relation with oxygen availability (Morrison, 1976; Rishbeth, 1978; Singh, 1981; Pearce et Malajczuk, 1990). Damages induced by *Heterobasidion annosum* also tend to be larger in soils with a high sand content and adequate aeration (Alexander, Skelly & Morris, 1975; Froelich, Dell & Walkinshaw, 1966). However, *H. annosum* is able to grow in the heartwood of trees, where the oxygen availability is low (Stenlid & Redfern, 1998). In contrast, conflicting results have been published about the direct effect of oxygen availability on *H. annosum* growth *in vitro*, with no effects of a low oxygen (Gundersen, 1961; Lindberg, 1992) or a decrease of growth in other cases (Courtois, 1973). Decreasing O<sub>2</sub> availability was detrimental to the decay activities of several species of heartwood and sapwood fungi (Highley *et al.*, 1983).

**Table 1.** Results of infections after artificial inoculations by two *C. fusipes* isolates of potted *Q. robur* seedlings submitted or not to soil waterlogging (experiment 1)

Substrate	Isolate	Treatment (seedling number)	Number of surviving inocula (%)	Number of seedlings with bark infections	Infected bark area (cm <sup>2</sup> )
1/2 forest soil	C41	Control (7)	6 (85.7)	3	2.4
		Waterlogged (7)	1 (14.3)	0	-
1/2 sand	C49	Control (13)	4 (30.8)	0	-
		Waterlogged (13)	0 (0.0)	0	-
2/3 sand	C41	Control (7)	5 (71.4)	3	4.39
		Waterlogged (7)	1 (14.3)	1	9.28
1/3 peat	C49	Control (11)	9 (81.8)	5	3.14
		Waterlogged (11)	0 (0.0)	0	-



The objectives of this study were to check, under controlled conditions or in forest ecosystems, whether the absence of *C. fusipes* in waterlogged soil could be explained by reduced O<sub>2</sub> during soil water saturation. Susceptibility of waterlogged oak seedlings to *C. fusipes* was tested in a greenhouse and the survival of the pathogen in woody substrates was assessed in waterlogged soils in a forest. In a final step the growth of *C. fusipes* mycelium on agar media under low O<sub>2</sub> atmospheres was measured and compared with that of *A. mellea* (Vahl.: Fr.) Kumm. and *H. annosum* (Fr.) Bref.

### 3 Material and methods

#### 3.1 Root rot fungi isolates and *C. fusipes* inoculum production

Five isolates were used in the three following experiments. *C. fusipes*, C41, C49, C62 were isolated from *Q. robur* (south-west of France, 1994), *Q. rubra* (centre, 1992) and *Q. petraea* (Matt) Liebl. (north-east, 1994), respectively. *A. mellea*, M2 was isolated by J. J. Guillaumin, from *Prunus persicae* (South-east, 1969). Isolate of *H. annosum* 47-R1-6 (P group) was isolated from *Pseudotsuga menziesii* (north-east, 2000).

*C. fusipes* inoculum was produced according to Marçais & Delatour (1996). Briefly, stems of hazel, *Corylus avellana* L., 1.5-2.5 cm in diameter, were cut into 3 cm segments, placed in plastic jars and inoculated with blocks from a *C. fusipes* agar culture. Care was taken to maximise the aeration of the jars by drilling a hole in the jar top and plugging it with cotton wool. The jars were incubated at 23°C for 9-11 months. These hazel segments, colonised by *C. fusipes*, were used for inoculations in experiment 1 and to assess the effects of waterlogging under field conditions in experiment 2.

*C. fusipes*, *H. annosum* and *A. mellea* isolates were used to check their differences in mycelium growth on malt-agar under low O<sub>2</sub> mole fraction, in experiment 3.

#### 3.2 Experiment 1: inoculation by *C. fusipes* and waterlogging under controlled conditions

Seventy-six one-year-old seedlings of pedunculate oak (*Quercus robur* L., north-eastern France) were planted in 5 litre pots. Half of the pots were filled with a 1/1 v/v mix of forest soil (from Amance forest, Meurthe-et-Moselle) with a clay loam texture and of sand. Final texture was: 13% clay, 22% silt, 65% sand. The other half was filled with a peat / sand 1/2 v/v substrate (over 90% sand). Potted seedlings were grown in a greenhouse at Champenoux, N-E France. The temperature was kept above 5°C during winter. Seedlings were inoculated with *C. fusipes* nine months later, during December 2000. Top soil was removed at the base of the seedlings, and root collar was cleaned. A hazel stem segment was fastened directly against the bark with an elastic link, 2-5 cm below soil surface and soil was replaced. Fourteen seedlings were inoculated with isolate C41 and 22-26 with isolate C49 in each substrate. Half of the seedlings of each of the 4 categories were completely waterlogged with tap water one month after inoculation (Table 1). Waterlogging was maintained during three

**Table 3.** Main soil properties in the selected plots in *Q. robur* stands in different forests of North Eastern France and survival of *C. fusipes* on woody inocula after one year burial (experiment 2).

	Plot	Soil sand content (%)	Depth of first traces of hydromorphia (cm)	Depth of hazel stem segments (cm)	Hazel segments with surviving <i>C. fusipes</i> (%)
Severely waterlogged areas	Filain	6.9	25	45	80
	Amance	8.3	4	23	0
	Adelans	17.4	10	23	70
	Mersuay	30.4	5	27	0
	Ainville	38.6	6	40	30
	Vitrimont	41.3	6	27	0
Mildly waterlogged areas	Filain	8.3	44	21	90
	Amance	5.4	48	23	89
	Adelans	24.2	48	20	90
	Mersuay	34	none until 100	24	90
	Ainville	64.1	60	21	70
	Vitrimont	67.5	58	20	100

NOTE : N = 10 inocula per plot

months from January to March, and the level of the water table controlled daily, in order to induce conditions close to those encountered in forest soils. One year after inoculation, seedlings were removed from the pots and root collars and inocula were examined. Survival rate of inoculum was recorded. *C. fusipes* was assumed to have survived in the hazel stem segments whenever black crusts covered the inoculum and white mycelium was present underneath and/or when the wood had a bright orange colour. Otherwise *C. fusipes* was assumed to have disappeared from the hazel stem segment. Width and height of necrotic bark were recorded. Surface of induced lesions was estimated from the geometric mean of these two diameters ( $\pi \times (\text{height} \times \text{width})/4$ ). Isolations of the fungus were attempted both from inoculum and host tissues. Tissues were washed under water, surface sterilised during 1 min in sodium hypochlorite at 3.75% active chlorine and rinsed three times in sterile water. Chips of dead root collar bark or decayed wood were plated on MAT medium (10 g.l<sup>-1</sup> of malt Difco, 15g.l<sup>-1</sup> agar, 100 mg.l<sup>-1</sup> penicillin, 100 mg.l<sup>-1</sup> streptomycin and 250 mg.l<sup>-1</sup> thiabendazole).

A second test was set up to study survival of *C. fusipes* in hazel stem segments during waterlogging. Eight 3-litre pots were filled with the peat/sand substrate and 8 others with the soil/sand substrate. During April 2001, 2-3 hazel stem segments colonized by *C. fusipes* isolate C41 were buried in each pot 2 to 5 cm below soil surface (total of 47 segments). The pots were all completely flooded one month later with tap water and kept in a glasshouse during 53 days. The level of the water table was checked daily. One hazel stem segment was removed from each pot at three dates: 21, 35 and 53 days after flooding. Survival of the inoculum in the stem segments was recorded based on the previously described method.

### **3.3 Experiment 2: Relationship between hydromorphia and *C. fusipes* survival under field conditions**

Six oak stands located in north-eastern France, in which *C. fusipes* had been detected, were selected based on contrasted soil texture and large within-stand heterogeneity in the level of hydromorphia (Table 3). The assessment of hydromorphia was based on the depth of reddish traces of insoluble oxydized iron and/or discoloration indicating iron depletion, which reflects the severity of waterlogging. During January 2001, 10 hazel stem segments colonized by the *C. fusipes* isolate C41 were buried in the soil of the severely hydromorphic area and 10 others in the mildly hydromorphic area of each stand. The inoculum was inserted at about 1 m from stem basis on both sides of five trees in each area. The segments were buried below the hydromorphic soil layer in severely hydromorphic areas and above this layer in mildly hydromorphic areas. The hazel stem segments were excavated one year later and brought back to the laboratory. As a few segments could not be recovered at the end of experiment, only 8 segments were assessed per individual area in Vitrimont and 9 in the well drained area of Amance. Survival rates of *C. fusipes* inoculum were recorded similarly to experiment 1.

### **3.4 Experiment 3: growth of *C. fusipes*, *A. mellea* and *H. annosum* under reduced oxygen mole fraction**

*In vitro* growth of three isolates of *C. fusipes*, one of *A. mellea* and one of *H. annosum*, was measured under different O<sub>2</sub> mole fractions. For each isolate, a 4 mm malt agar disk was cut from the margin of a young colony and placed on the surface of 20 ml solid malt-agar plates. Venting ribs were present on the lower side of the Petri dishes lids in order to provide adequate O<sub>2</sub> supply to the cultures. After one week for *C. fusipes* and *A. mellea* and 3 days for *H. annosum*, cultures were placed in airtight plastic jars of 50 X 50 X 50 cm filled with air mixtures differing in O<sub>2</sub> mole fractions: 21% (normal atmospheric concentration), 8.0%, 5.0%, 3.0%, 0.5%, 0.3% and 0.1%. Target O<sub>2</sub> mole fractions were reached by injecting N<sub>2</sub> into the jars. O<sub>2</sub> mole fractions were measured with a medical O<sub>2</sub> monitor (Toptronic, model 74223, with a resolution of 0.1%). A little fan homogenised the atmosphere within each jar and avoided CO<sub>2</sub> accumulation in the plates. Eight experiments were carried out. In each experiment, 2 to 3 different oxygen concentrations plus 21% oxygen were tested (3-4 jars). Each concentration was tested 3 to 4 times. At first, 25 cultures (5 repetitions per isolate) per jar were preincubated for acclimation during 24 hours under the target O<sub>2</sub> mole fraction. Then, cultures were removed and their perimeter was marked as starting point for the measurement of hyphal growth. Cultures were replaced into jars for seven days, O<sub>2</sub> mole fractions were readjusted and controlled twice a day. After this period, cultures were removed again from jars and hyphal growth during the preceding seven days was measured.

### **3.5 Statistical analyses**

The survival of *C. fusipes* in hazel stem segments (experiments 1 and 2) was analysed by logistic regression, using the procedure 'genmod' of SAS. The model validity was checked using the deviance/degree of freedom ratio, by plotting deviance residuals against the linear predictor and with a half-normal plot (Collett, 1991). In experiment 1, since few inocula had survived in waterlogged pots, infection success was taken into account only for control seedlings with surviving inoculum. In experiment 3, the effect of the experiment was taken into account by using the growth of isolates under reduced atmospheres divided per the mean isolate growth under ambient atmosphere during the same experiment as the dependent variable. This variable was subjected to an analysis of variance, using SAS software (SAS, 1989). In the model, the isolate effect was tested as independent variable nested in the species effect.

## **4 Results**

### **4.1 Experiment 1: inoculations and waterlogging under controlled conditions**

*C. fusipes* was isolated from all surviving inocula and all lesions. There was a severe and negative effect of waterlogging on inoculum survival independently of the growth substrate and of the

**Table 2.** Logistic regression analysis of the relationship between inoculum survival, type of substrate (peat/sand or soil/sand), waterlogging during 3 months and fungal isolate (C41 or C49 ; Experiment 1).

Source	deviance	df	Chi-square	Pr>Chi-square
Intercept	45.6	-	-	-
Substrate	43.9	1	1.69	0.193
Waterlogging	10.9	1	33.01	<0.001
Isolate	6.0	1	4.85	0.028
Waterlogging x Substrate	5.4	1	0.58	0.447
Waterlogging x Isolate	3.9	1	1.58	0.208

**Table 4.** Logistic regression analysis of the relationship between survival of *C. fusipes* in hazel stem segments in forest plots and soil factors (experiment 2).

Source	deviance	df	Chi-square	Pr>Chi-square
intercept	155.6	-	-	-
Sand content	155.6	1	0.00	0.949
Plot	120.6	5	34.94	< 0.001
waterlogging	90.9	1	29.67	< 0.001
Waterlogging x plot	72.4	4	18.50	0.001

*C. fusipes* isolate (Table 1). Survival was slightly higher in the isolate C41 (Tables 1 and 2). After 3 months waterlogging, only one inoculum had survived in the soil/sand substrate and one in the peat/sand substrate. A tendency towards more seedlings with infected bark in peat/sand than in soil/sand substrate was visible (respectively 57% and 30%, Table 1). But the low number of replicates did not allow any statistical test of this observation.

During the second test, set up to follow the dynamic of *C. fusipes* survival during waterlogging, the fungus had completely disappeared from hazel stem segments after 21 d of water-logging since it could never be isolated from the segments after 21, 35 and 53 days of flooding, whatever the substrate.

#### **4.2 Experiment 2: relationship between hydromorphia and *C. fusipes* survival under field conditions**

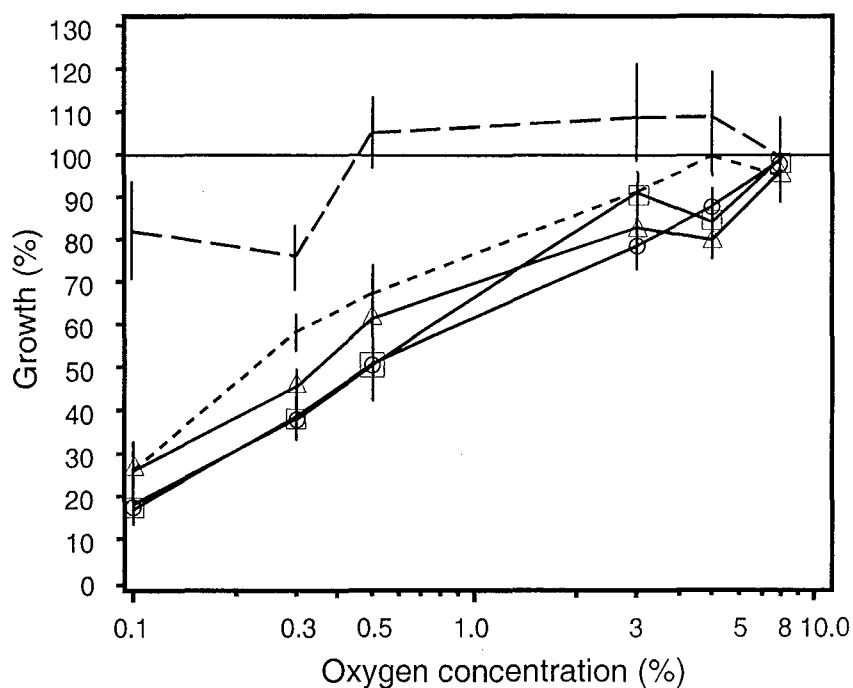
The survival of *C. fusipes* after one year in hazel stem segments was independent of the sand content of soils but differed among plots (Tables 3 and 4). It was smaller in a majority of severely hydromorphic areas in comparison with mildly hydromorphic ones. However, the interaction 'hydromorphia' x 'plot' was significant. Indeed, the survival of *C. fusipes* was high in the mildly waterlogged area in each stand. Conversely, its survival in the severely waterlogged areas was high only in Filain and Adelans (Table 2).

#### **4.3 Experiment 3: growth of *C. fusipes*, *A. mellea* and *H. annosum* under reduced oxygen mole fractions**

Under ambient O<sub>2</sub>, *A. mellea*, *C. fusipes* and *H. annosum* displayed a daily growth of 0.75±0.03 mm, 1.81±0.04 mm and 7.18±0.12 mm, respectively. There was a significant effect of O<sub>2</sub> mole fraction, species and isolates on root rot fungi growth under hypoxia in comparison with their growth under ambient atmospheres (Table 5, Fig. 1). *C. fusipes* growth gradually decreased when O<sub>2</sub> mole fraction dropped below 8% and was slightly more affected than that of *H. annosum*. The significant interaction between O<sub>2</sub> mole fraction and species is mainly due to the smaller influence of hypoxia on *A. mellea* growth compared to *C. fusipes* and *H. annosum* (Table 5, Fig. 1). There was also a significant interaction between oxygen concentration and isolates, which could be explained by the slightly lower growth of the *C. fusipes* isolate C49, under oxygen concentration higher than 5%, in comparison with the two other *C. fusipes* isolates and by its slightly greater growth under concentrations lower than 0.5%. When cultures of *C. fusipes*, *H. annosum* and *A. mellea* were replaced under ambient atmosphere, after exposure to hypoxia the mycelium growth resumed at initial rates (results not shown).

**Table 5.** Analysis of variance of the relationship between mycelium growth under low O<sub>2</sub> and the species of root rot fungi, *C. fusipes*, *A. mellea* and *H. annosum* (experiment 3).

Source	df	F	p
O <sub>2</sub> mole fraction	1	406.37	< 0.001
Species	2	149.88	< 0.001
Isolate (Species)	2	3.68	0.026
O <sub>2</sub> mole fraction x species	2	34.10	<0.001
O <sub>2</sub> mole fraction x isolate (Species)	2	2.88	0.057



**Fig. 1.** growth of *A. mellea* (— — —), *H. annosum* (.....) and *C. fusipes* isolates, (—○—), C41, (—△—) C49 and (—□—) C62, under reduced oxygen mole fraction (8, 5, 3, 0.5, 0.3 and 0.1 %) in comparison with growth of isolates at ambient atmosphere (20.9%). The bars represent the confidential interval of the mean.

## 5 Discussion

We have evidenced a direct and detrimental effect of soil waterlogging on *C. fusipes* survival both under controlled conditions and in forest stands. We have also demonstrated that hypoxia induced a drastic reduction of *C. fusipes* and *H. annosum* mycelial growth whereas *A. mellea* was almost insensitive.

Earlier work had shown that *C. fusipes* survival increased with soil sand content (Camy *et al.*, 2002c). In this study, we expected to confirm this tendency basing on the survival of *C. fusipes* in stem segments buried in forest soils. This was not the case, possibly due to the low number of investigated stands (6 vs. 10) and the short duration of the experiment compared with the previous work (1 vs. 2.5 years). In these forest soils, the survival of *C. fusipes* was strongly contrasted between severely hydromorphic areas in the different stands. *C. fusipes* survival in the hydromorphic areas of Filain and Adelans was large despite a relatively low soil sand content. This high survival rate might be explained by the difference of depth of hydromorphic traces which appeared slightly deeper in these 2 stands.

Waterlogging of inoculated seedlings allowed us to confirm under controlled condition the direct negative effect of soil water saturation on *C. fusipes* survival in conditions close to those encountered in forest. However, chemical and biological properties of forest soil could not be the same than those of our pot substrates, especially in the peat/sand substrate. This did not interact with waterlogging effects on *C. fusipes* survival, which was very low in the both types of substrates. The low ability of *C. fusipes* to survive an episode of waterlogging in the soil probably explains why natural infections are more developed in dry or mildly hydromorphic soils (Piou *et al.*, 2002; Camy *et al.*, 2002a). It shows also that *C. fusipes* probably reacted directly and negatively to the degree of hypoxia rather than to secondary soil properties induced by waterlogging like accumulation of toxic compounds.

This high susceptibility of *C. fusipes* to hypoxia was evidenced also by reduced growth of mycelium on malt-agar under hypoxia. The hypoxia induced growth reductions were completely reversible as *C. fusipes* recovered a normal growth once replaced under ambient atmosphere. Effects of soil water saturation on *C. fusipes* were more drastic, since the fungus did not survive in waterlogged soil after 21 days. This could be explained by the shorter exposure to reduced oxygen availability in the *in vitro* experiment (7 days versus 21-90 days) or the extremely low oxygen availability in soil water. It could also be due to the fact that *C. fusipes* in soil was submitted to competitors, much more adapted to hypoxic conditions.

The growth of *A. mellea* *in vitro* was slightly affected by hypoxia. This could explain the fact that *A. mellea* appears preferentially distributed in heavy soils (Termorshuizen & Arnolds, 1994). By contrast *H. annosum* growth was strongly affected by hypoxia. Courtois (1973) found similar



## 5 Discussion

We have evidenced a direct and detrimental effect of soil waterlogging on *C. fusipes* survival both under controlled conditions and in forest stands. We have also demonstrated that hypoxia induced a drastic reduction of *C. fusipes* and *H. annosum* mycelial growth whereas *A. mellea* was almost insensitive.

Earlier work had shown that *C. fusipes* survival increased with soil sand content (Camy *et al.*, 2002c). In this study, we expected to confirm this tendency basing on the survival of *C. fusipes* in stem segments buried in forest soils. This was not the case, possibly due to the low number of investigated stands (6 vs. 10) and the short duration of the experiment compared with the previous work (1 vs. 2.5 years). In these forest soils, the survival of *C. fusipes* was strongly contrasted between severely hydromorphic areas in the different stands. *C. fusipes* survival in the hydromorphic areas of Filain and Adelans was large despite a relatively low soil sand content. This high survival rate might be explained by the difference of depth of hydromorphic traces which appeared slightly deeper in these 2 stands.

Waterlogging of inoculated seedlings allowed us to confirm under controlled condition the direct negative effect of soil water saturation on *C. fusipes* survival in conditions close to those encountered in forest. However, chemical and biological properties of forest soil could not be the same than those of our pot substrates, especially in the peat/sand substrate. This did not interact with waterlogging effects on *C. fusipes* survival, which was very low in the both types of substrates. The low ability of *C. fusipes* to survive an episode of waterlogging in the soil probably explains why natural infections are more developed in dry or mildly hydromorphic soils (Piou *et al.*, 2002; Camy *et al.*, 2002a). It shows also that *C. fusipes* probably reacted directly and negatively to the degree of hypoxia rather than to secondary soil properties induced by waterlogging like accumulation of toxic compounds.

This high susceptibility of *C. fusipes* to hypoxia was evidenced also by reduced growth of mycelium on malt-agar under hypoxia. The hypoxia induced growth reductions were completely reversible as *C. fusipes* recovered a normal growth once replaced under ambient atmosphere. Effects of soil water saturation on *C. fusipes* were more drastic, since the fungus did not survive in waterlogged soil after 21 days. This could be explained by the shorter exposure to reduced oxygen availability in the *in vitro* experiment (7 days versus 21-90 days) or the extremely low oxygen availability in soil water. It could also be due to the fact that *C. fusipes* in soil was submitted to competitors, much more adapted to hypoxic conditions.

The growth of *A. mellea* *in vitro* was slightly affected by hypoxia. This could explain the fact that *A. mellea* appears preferentially distributed in heavy soils (Termorshuizen & Arnolds, 1994). By contrast *H. annosum* growth was strongly affected by hypoxia. Courtois (1973) found similar

decreases in *H. annosum* growth under low O<sub>2</sub>. The literature reported also not or very slight influence of high hypoxia on its growth in comparable conditions (Gundersen, 1961; Lindberg, 1992).

Unfavourable effects of wood moisture content on growth of *H. annosum* had also been evidenced under controlled conditions (Kuhlman, 1980; Lindberg & Johansson, 1992). Johansson & Stenlid (1985) studied interactions between host and *H. annosum* during the initial stages of infection process in living sapwood of excised spruce roots, in water-saturated roots as well as in Nitrogen atmosphere. They demonstrated a reduction in *H. annosum* mycelium growth linked with modifications of enzyme activities, dependent on oxygen supply. Cwielong & Hüttermann (1987) demonstrated that a minimum concentration of oxygen was required for oxidation of toxic phenolic compounds, below which growth of *H. annosum* is inhibited.

Furthermore, Redfern (1998) found after artificial field inoculations, a low level of infection induced by *H. annosum* in peat soils and hypothesised a direct and negative effect of soil moisture and pH, to the transfer of infection from a tree to its neighbours. Negative impact of soil water saturation under field conditions was also reported on *Inonotus tomentosus* (Fr.) Teng. and on *A. ostoyae* which incidence decreased in soils with wet moisture regimes (Bernier & Lewis, 1999; Whitney, 1995).

The direct and negative effect of hypoxia induced by water saturation of soil on *C. fusipes*, demonstrated in this study, is certainly the major explanation of earlier results showing that oak trees were less frequently infected in such soil conditions (Piou *et al.*, 2002; Camy & Marçais, 2002; Camy *et al.*, 2002a). The strong susceptibility of *C. fusipes* mycelium to hypoxia might be one of the reasons why this parasite is more frequently present in coarse textured soils where oxygen availability is expected to be higher.

### Acknowledgements

The authors wish to thank O. CAËL, and B. BERTIN for their technical assistance and P. GROSS and C. BRECHET for their technical advice. The work reported forms part of PhD thesis submitted to the University of Nancy by the first author and was supported by a grant from the 'Institut National de la Recherche Agronomique' and from the 'Région Lorraine'

### References

- Alexander, S.A., Skelly, J.M. & Morris, C.L. (1975). Edaphic factors associated with the incidence and severity of disease caused by *Fomes annosus* in loblolly pine plantations in Virginia. *Phytopathology* **65**, 585-591.
- Bernier, D. & Lewis, K.J. (1999). Site and soil characteristics related to the incidence of *Inonotus tomentosus*. *Forest Ecology and Management* **120**, 131-142.
- Blenis, P.V., Mulaga, M.S. & Hiratsuka, Y. (1989). Soil affects *Armillaria* root rot of lodgepole pine. *Canadian Journal of Forest Research* **19**, 1638-1641.

- Camy, C. & Marçais, B. (2002). Relation between soil factors, root infection by *Collybia fusipes*, and tree health, in *Quercus robur* and *Q. rubra.*, In Proceedings of the 10<sup>th</sup> International conference on Root and Butt rots, Québec, Canada. In press
- Camy, C., Delatour, C. & Marçais, B. (2002a). Relationships between soil factors, *Quercus robur* health, *Collybia fusipes* root infection and *Phytophthora* presence. *Annals of Forest Science*. Accepted.
- Camy, C., de Villebonne, D., Delatour C. & Marçais, B. (2002b). Soil factors associated with decline of oaks and infection by *Collybia fusipes*. *Forest Pathology*. Accepted.
- Camy, C., Delatour, C., Caël, O. & Marçais, B. (2002c). Inoculation of mature pedunculate oaks (*Quercus robur*) with the root rot fungus *Collybia fusipes* and relationships with tree vigour and soil factors. *European Journal of Plant Pathology*. Submitted.
- Collett D., Modeling binary data, C. Hal.(ed), 1991, 369 pp.
- Courtois, H. (1973). Einfluss von temperatur, Licht und anderen faktoren auf das mycelwachstum von *Fomes annosus* (Fr.) Cooke. *Angewandte Botanik* **47**, 141-158.
- Cwielong, P. & Hüttermann, A. (1989). Biochemical mechanisms of action of phenolic substances on *Heterobasidion annosum*, In Proceedings of the 7<sup>th</sup> conference on root and butt rots of forest trees ( ed. D.J. Morrisson). pp. 208-225. Forestry Canada, Victoria, British Columbia, Canada.
- Delatour, C. & Guillaumin, J.J. (1984). Un pourridié méconnu : *Collybia fusipes* (Bull. ex Fr.) Quel. *Compte-Rendu de l'Académie d'Agriculture de France* **70**, 123-126.
- Drew, M.C. & Lynch, J.M. (1980). Soil anaerobiosis, microorganisms, and root function. *Annual Review of Phytopathology* **18**, 37-66.
- Froelich, R.C., Dell, T.R. & Walkinshaw, C.H. (1966). Soil factors associated with *Fomes annosus* in the Gulf States. *Forest Science* **12**, 356-361.
- Grundmann, G.L. & Rolston, D.E. (1987). A water function approximation to degree of anaerobiosis associated with denitrification. *Soil Science* **144**, 437-441.
- Guillaumin, J.J., Bernard, C., Delatour, C. & Belgrand, M. (1985). Contribution à l'étude du dépérissement du chêne : pathologie racinaire en forêt de Tronçais. *Annales des Sciences Forestières* **42**, 1-22.
- Gundersen K. (1961). Growth of *Fomes annosus* under reduced oxygen pressure and the effect of carbon dioxide. *Nature* **190**, 649.
- Highley, T.L., Bar-Lev, S.S., Kirk, T.K. & Larsen, M.J. (1983). Influence of O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> on wood decay heartrot and saprot fungi. *Phytopathology* **73**, 630-633.
- Johansson, M. & Stenlid, J. (1985). Infection of roots of Norway spruce (*Picea abies*) by *Heterobasidion annosum*. *European Journal of Forest Pathology* **15**, 32-45.
- Kuhlman, E.G. (1980). Influence of moisture on rate of decay of loblolly pine root wood by *Heterobasidion annosum*. *Canadian Journal of Botany* **58**, 36-39.
- Lindberg, M. (1992). S and P intersterility groups in *Heterobasidion annosum*; Infection frequencies through bark of *Picea abies* and *Pinus sylvestris* seedlings and *in vitro* growth rates at different oxygen levels. *European Journal of Forest Pathology* **22**, 41-45.
- Lindberg, M. & Johansson, M. (1992). Resistance of *Picea abies* seedlings to infection by *Heterobasidion annosum* in relation to drought stress. *European Journal Forest Pathology* **22**, 115-124.

- Marçais, B. & Delatour, C. (1996). Inoculation of oak (*Quercus robur* and *Q. rubra*) with *Collybia fusipes*. *Plant Disease* **80**, 1391-1394.
- Marçais, B., Caël, O. & Delatour, C. (1998). Investigations on the distribution and impact of *Collybia fusipes* in Oak forest, *In Proceedings of the 9<sup>th</sup> International Conference on Root and Butt Rots of Forest Trees*. (ed. C. Delatour, J.J. Guillaumin, B. Lung-Escarment and B. Marçais.). pp. 215-222. Colloques de l'INRA n°89, Paris, France.
- Morrison, D.J. (1976). Vertical distribution of *Armillaria mellea* rhizomorphs in soil. *Transaction of the British mycological Society* **66**, 393-399.
- Nanta, M. & Vellinga, E.C. (1995). Atlas van Nederlandse Paddesstoelen. A. A. Balkema, Rotterdam, Brookfield pp. 352.
- Pearce, M.H. & Malajczuk, N. (1990). Factors affecting growth of *Armillaria luteobubalina* rhizomorphs in soil. *Mycological Research* **94**, 38-48.
- Piou, D., Delatour, C. & Marçais, B. (2002). Hosts and distribution of *Collybia fusipes* in France. *Forest Pathology* **32**, 29-41.
- Rishbeth, J. (1978). Effects of soil temperature and atmosphere on growth of *Armillaria* rhizomorphs. *Transaction of the British mycological Society* **70**, 213-220.
- Redfern, D. B. (1998). The effect of soil on rot infection and spread by *Heterobasidion annosum*. *In Proceedings of the 9<sup>th</sup> International Conference on Root and Butt Rots of forest trees*. (ed. C. Delatour, J.J. Guillaumin, B. Lung-Escarment and B. Marçais). pp. 267-273. Colloques de l'INRA n°89, Paris, France.
- SAS, Institute Inc. (1989). SAS / STAT user's guide, Version 6, Fourth edition, Vol I Cary
- Singh, P. (1981). *Armillaria mellea*: growth and distribution of rhizomorphs in the forest soils of Newfoundland. *European Journal of Forest Pathology* **11**, 208-220.
- Stenlid, J. & Redfern, D.B. (1998). Spread within the tree and stand. *In Heterobasidion annosum, Biology, Ecology, Impact and Control*. (ed. S. Woodward, J. Stenlid, R. Karjalainen and A. Hüttermann). pp. 125-143 CAB International, UK.
- Termorshuizen, A.J. & Arnolds, J.M. (1994). Geographical distribution of the *Armillaria* species in the Netherlands in relation to soil type and hosts. *European Journal of Forest Pathology* **24**, 129-136.
- Whitney, R.D. (1995). Root-rotting fungi in white spruce, black spruce, and balsam fir in northern Ontario. *Canadian Journal of Forest Research* **25**, 1209-1230.

## ANNEXE

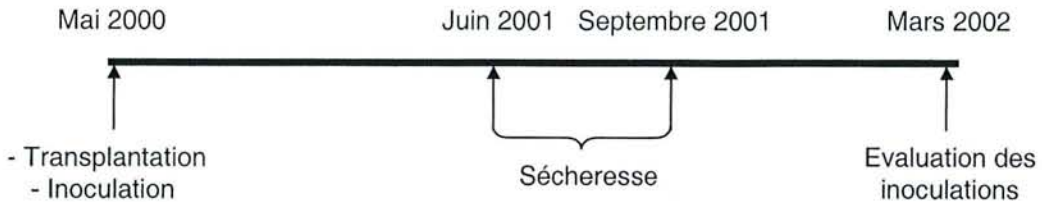
---

Influence de la sécheresse sur la sensibilité du chêne pédonculé  
(*Quercus robur*) à *Collybia fusipes*

---

# Influence de la sécheresse sur la sensibilité du chêne pédonculé (*Quercus robur*) à *Collybia fusipes*

## 1 Protocole expérimental



### 1.1 Matériel végétal et fongique

En mai 2000, soixante et onze plants de *Quercus robur*, âgés d'une année, ont été transplantés en pots de 9 litres dans un mélange de sable et tourbe blonde non tamisée (2/3 - 1/3). Ils ont été fertilisés à la plantation grâce à un engrais à libération contrôlée (Nutricote 100, 13-13-13). Les plants ont été installés en serre à température ambiante et sous luminosité naturelle jusqu'en mars 2002. La température de la serre était maintenue supérieure à 5°C en hiver.

L'isolat C49 de *Collybia fusipes*, issu de chêne rouge (*Q. rubra*) et récolté en 1992 à l'arboretum des Barres (Loiret), a été utilisé pour l'inoculation des jeunes plants de chênes.

### 1.2 Irrigation et suivi du statut hydrique

En 2000, l'ensemble des plants a été arrosé de façon optimale, automatiquement avec 2 irrigouttes par pot. L'apport en eau était en moyenne de 450 ml par jour. L'arrosage se faisait quotidiennement en deux fois afin d'obtenir une humidité optimale et constante des substrats.

Au début de l'été 2001, après mise à la capacité au champ des substrats, des mesures de transpiration de l'ensemble des plants ont été réalisées par pesées à 24 h d'intervalle lors de journées ensoleillées. La consommation en eau des plants variait de 50 ml à 750 ml par jour. Une déficience hydrique a été imposée à partir du 21 juin 2001 sur la moitié des plants inoculés par *C. fusipes* et sur la moitié des plants non inoculés, et ce jusqu'au 6 septembre, soit pendant 77 jours. Les plants soumis au déficit hydrique ont été arrosés chaque jour manuellement à 1/3 de leur demande mesurée avant sécheresse. L'apport en eau variait de 15 à 250 ml. Les autres plants étaient alimentés en eau de façon optimale, automatiquement par irrigoutte. L'apport en eau était en moyenne de 700 ml. L'arrosage se faisait toujours quotidiennement en deux fois afin d'obtenir une humidité constante des substrats.

L'humidité du substrat a été suivie régulièrement, tout au long de l'été en 2000 et 2001 sur l'ensemble des plants, par mesure de l'humidité du sol avec une TDR TRIME-FM3 équipée d'une sonde P3 à trois tiges de 160 mm de long (IMKO, Ettlingen, Allemagne). Les mesures ont été effectuées entre deux périodes d'arrosage, environ 6 heures après le premier arrosage.

En 2001, des mesures de potentiel hydrique foliaire de base ont été effectuées à l'aide d'une chambre à pression PMS-610 (PMS Instrument co., Oregon, USA) au 22<sup>e</sup>, 36<sup>e</sup> et 63<sup>e</sup> jour de déficit hydrique. Ce suivi a été réalisé sur l'ensemble des plants soumis à la sécheresse ainsi que sur 9 plants non inoculés et 12 plants inoculés recevant une alimentation optimale en eau. Les mesures ont été effectuées dans l'heure précédant le lever du soleil.

### **1.3 Production de l'inoculum et protocole d'inoculation**

La production de l'inoculum a été mise au point par Marçais et Delatour (1996) d'après une adaptation de la méthode établie par Guillaumin (1977) pour l'Armillaire. Brièvement, des tiges de noisetier (*Corylus avellana* L.) de 1,5 à 2,5 cm de diamètre et 3 cm de long ont été stérilisées et mises en incubation à 23°C avec l'isolat de *C. fusipes* durant 12 mois.

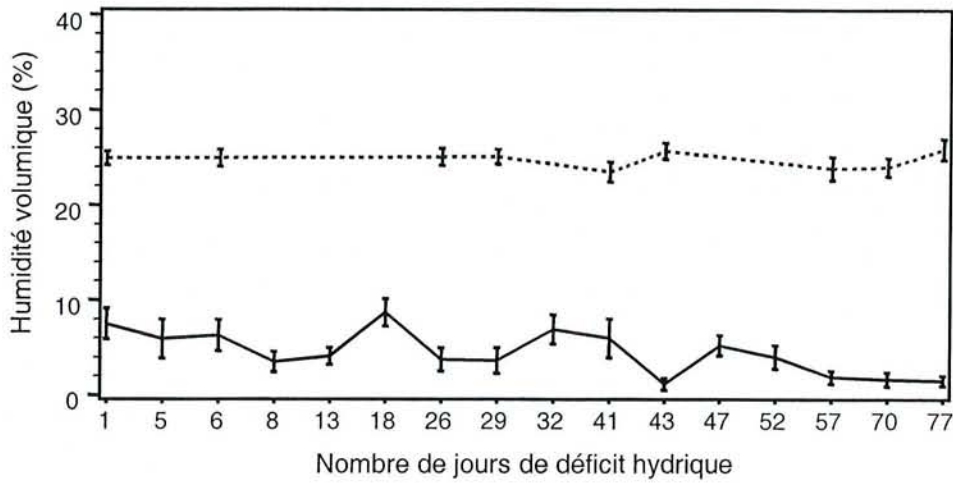
En mai 2000, cinquante trois plants ont été inoculés à la plantation d'après la technique décrite par Marçais et Delatour (1996). Cette technique consiste à apposer une bûchette de noisetier colonisée par *C. fusipes* directement contre l'écorce de chaque collet (2-5 cm sous la surface du sol) sans blessure préalable, et à l'y fixer fortement par un élastique. Les inoculations ont été relevées en mars 2002, soit 20 mois après l'inoculation et 6 mois après l'arrêt du stress hydrique. Pour chaque plant, la survie de *C. fusipes* dans la bûchette a été notée positive lorsque du mycelium était visible sous des croûtes noires présentes en périphérie de la bûchette et/ou lorsque le bois présentait une couleur orange vif. Dans tous les autres cas, la survie de *C. fusipes* a été notée comme étant négative. Les infections ont été considérées comme réussies lorsque *C. fusipes* avait pu être isolée des lésions et/ou lorsque le cambium était atteint. L'efficacité d'infection correspond au pourcentage de plants infectés, lorsque l'inoculum est resté vivant. Les longueur et largeur des lésions présentes au niveau de la zone du collet ont été relevées et leur surface a été calculée d'après la formule suivante :  $(\pi \times (\text{longueur} \times \text{largeur}) / 4)$ . Des isolements ont été réalisés à partir des tissus nécrosés et des inocula, afin de s'assurer de la présence de *C. fusipes*.

### **1.4 Mesures et observations**

La croissance en hauteur de chaque plant a été mesurée en 2000 et 2001, ainsi que la surface foliaire en 2001 uniquement.

### **1.5 Analyses statistiques**

Un test t de Student a été réalisé pour comparer, entre modalités d'alimentation en eau, les moyennes d'humidité volumique des substrats, de potentiel hydrique foliaire de base, de croissance



**Figure 1.** Evolution de l'humidité volumique du substrat des plants en pots en fonction du temps écoulé entre le 21 juin et 06 septembre 2001, chez les plants bien alimentés en eau (....) et ceux recevant 1/3 de l'alimentation optimale (—).

**Tableau 1.** Différence de croissance en hauteur, de surface foliaire et de potentiel hydrique foliaire de base en fonction des modalités d'alimentation en eau et test statistique associé.

	Alimentation hydrique <sup>(1)</sup>		Test t de Student	
	Optimale	Déficiente	Valeur de t	probabilité
Croissance en hauteur 2000 (cm)	83.99±5.69	91.37±5.88	-0.90	0.370
Croissance en hauteur 2001 (cm)	96.29 ±5.98	77.44±2.81	2.44	0.017
Surfaces foliaires 2001 (m <sup>2</sup> )	0.63±0.02	0.47±0.02	3.36	0.001
Potentiel hydrique de base (MPa)				
22 <sup>e</sup>				
jour de déficience hydrique	-0.19±0.02	-0.67±0.03	12.31	<0.001
36 <sup>e</sup>	-0.18±0.01	-0.93±0.07	10.20	<0.001
63 <sup>e</sup>	-0.18±0.01	-1.17±0.07	12.03	<0.001

(1) En 2000, l'ensemble des plants était alimenté de façon optimale. La sécheresse n'a été imposée que l'année suivante en 2001.

**Tableau 2.** Relations entre la survie de *C. fusipes* dans les bûchettes, l'efficacité d'infection, la surface des lésions induites, la déficience hydrique et la croissance en hauteur des plants.

	Survie de <i>C. fusipes</i>	Efficacité d'infection <sup>(1)</sup>		Surface de lésion	
	$\chi^2$ (probabilité)	df	$\chi^2$ (probabilité)	df	F(probabilité)
Déficience hydrique	1.95 (0.162)	1	0.53 (0.465)	1	0.06 (0.801)
Croissance hauteur (2000)	-	1	12.48 (<0.001)	1	0.45 (0.509)
Croissance hauteur (2001)	-	1	1.42 (0.233)	1	1.93 (0.175)

(1) L'efficacité d'infection a été calculée à partir des plants pour lesquels *C. fusipes* était encore vivante à l'intérieur des bûchettes de noisetier. La surface de lésion est prise en compte pour les plants dont l'infection est réussie.



en hauteur des plants et de surface foliaire. Une régression logistique a permis d'analyser la survie de *C. fusipes* dans les bûchettes de noisetier ainsi que l'efficacité d'infection, grâce à la procédure genmod du logiciel SAS (SAS, 1989). Une analyse de variance (procédure GLM de SAS) a été utilisée pour l'analyse des surfaces de lésions induites par *C. fusipes*.

## 2 Résultats

### 2.1 Impact de la déficience hydrique sur le statut hydrique et la croissance des plants

En 2000, l'humidité volumique moyenne de l'ensemble des plants est de 25%. En 2001, année de l'application de la sécheresse, l'humidité volumique des plants est significativement différente dans les pots de la modalité d'alimentation optimale en eau et dans la modalité déficiente (Figure 1 ;  $t=56,04$ ,  $p<0,001$ ). Les potentiels hydriques foliaires de base sont également significativement plus faibles chez les plants déficients en eau que chez ceux alimentés de façon optimale, et ceci pour les trois dates de mesures (Tableau 1).

En 2000, aucune différence de croissance n'est observée entre les plants alimentés de façon optimale en eau les deux années et ceux qui allaient subir un déficit hydrique l'année suivante. En 2001, les croissances en hauteur des plants ainsi que leurs surfaces foliaires sont significativement plus faibles chez les plants soumis au déficit hydrique que chez les plants alimentés de façon optimale en eau (Tableau 1).

### 2.2 Impact des inoculations par *C. fusipes* et relation avec les différents paramètres mesurés

Lorsque, après observation, l'inoculum paraît vivant, *C. fusipes* est isolée des bûchettes dans tous les cas. *C. fusipes* a pu être isolée de 91% des lésions observées. Les 3 plants pour lesquels les isolements ont été négatifs à partir de la lésion, ont été considérés comme non infectés. En effet, ces lésions n'atteignaient pas le cambium et leurs surfaces étaient peu développées ( $< 1\text{cm}^2$ ).

*C. fusipes* est restée vivante dans 41 bûchettes de noisetier (77%). Sa survie dans les bûchettes est plus importante dans la modalité d'alimentation optimale en eau (85%) que dans la modalité de déficience hydrique (69%). Cette tendance n'est cependant pas significative (Tableau 2).

Lorsque *C. fusipes* est vivante dans la bûchette, la majorité des plants est infectée (78% des cas). Les lésions induites atteignent le cambium dans 81% des cas. L'efficacité d'infection est plus faible dans la modalité d'alimentation optimale en eau (74%) que dans la modalité d'alimentation hydrique déficiente (83%). Cette tendance n'est pas significative (Tableau 2). L'efficacité d'infection n'est pas liée à la croissance en hauteur de l'année 2001. Cependant, les plants non infectés en 2001

ont une croissance en hauteur moyenne significativement plus élevée en 2000, que les plants infectés (respectivement  $99\pm 7.27$  cm et  $75\pm 5.24$  cm, Tableau 2).

La surface des lésions est légèrement plus importante chez les plants déficients en eau que chez les plants alimentés de façon optimale (respectivement :  $12.71\pm 2.25$  cm<sup>2</sup> et  $10.79\pm 2.14$  cm<sup>2</sup>). Cette différence n'est cependant pas significative (Tableau 2). La surface d'infection n'est également pas liée aux croissances en hauteur des plants en 2000 et 2001.

Au sein de chaque modalité d'alimentation en eau, les plants inoculés et infectés ne montrent pas de potentiels hydriques foliaires de base différents des plants non inoculés ou non infectés (respectivement pour les modalités d'alimentation optimale en eau et d'alimentation déficiente :  $t=0.82$  et  $1.33$  ;  $p= 0.418$  et  $0.189$ ).

Mademoiselle CAMY Cécile

DOCTORAT de l'UNIVERSITE HENRI POINCARÉ, NANCY 1

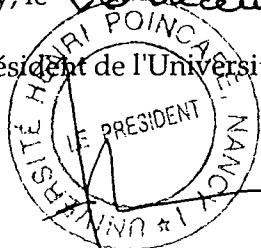
en BIOLOGIE FORESTIERE

VU, APPROUVÉ ET PERMIS D'IMPRIMER

n° 772

Nancy, le 26 décembre 2002

Le Président de l'Université



Cl. BURLET

## **Influence des facteurs édaphiques et sylvicoles sur le développement du pourridié à *Collybia fusipes* dans la chênaie pédonculée**

*Collybia fusipes* est l'agent d'un pourridié sur chênes. Parasite primaire des racines commun en France, il est particulièrement inféodé au chêne pédonculé (*Quercus robur*). Il se développe lentement et peut être à long terme responsable d'une destruction totale du système racinaire. Ponctuellement, il a été associé à des problèmes de dépérissements, potentiellement en relation avec la nature du sol.

L'objectif de ce travail de thèse était donc de définir les situations écologiques où *C. fusipes* pose des problèmes sur chênes pédonculés, en caractérisant notamment les facteurs édaphiques et sylvicoles liés à sa distribution et son impact. Ce dernier a été évalué en terme d'association au dépérissement ou en terme de dommages racinaires. Des observations de terrain ainsi que des expérimentations d'inoculations par le parasite en forêt et en conditions contrôlées nous ont permis de répondre à cet objectif.

Nous avons montré que *C. fusipes* est préférentiellement distribuée dans les sols à textures grossières. L'impact de la maladie augmente avec la teneur en sable du sol, la diminution de l'engorgement du sol par l'eau ainsi que la diminution de la richesse chimique du sol. Dans ce type particulier de situations écologiques à risques, parmi l'ensemble des facteurs biotiques et abiotiques que nous avons observés, c'est le niveau d'infection induit par *C. fusipes* qui est le mieux corrélé au dépérissement du chêne. Les conditions de sols liées à un impact accru de la maladie interviennent de façon positive directement sur le parasite en favorisant sa survie ainsi que l'efficacité d'infection ; l'engorgement du sol étant un facteur déterminant. Les conditions édaphiques semblent plus particulièrement intervenir en favorisant le parasite plutôt qu'en défavorisant son hôte. En effet, la sensibilité du chêne à *C. fusipes* n'est pas liée à la vigueur de l'hôte. Elle n'est pas non plus accrue dans les conditions de sols susceptibles d'affaiblir l'hôte, c'est-à-dire dans les sols à textures grossières, à faible richesse chimique ou en conditions de sécheresse. L'aspect positif des sols à textures grossières ainsi que l'aspect négatif de l'engorgement du sol sur le parasite ont pu être expliqués par la forte sensibilité de *C. fusipes* à l'hypoxie.

**Mots clés :** *Collybia fusipes*, champignon, pourridiés, distribution, impact, écologie, inoculations, hypoxie, *Quercus robur*, dépérissement du chêne, facteurs édaphiques.

## **Influence of soil and sylvicultural factors on development of the root rot fungus, *Collybia fusipes*, in pedunculate oak forests**

*Collybia fusipes* is a root rot fungus, widespread throughout the French forest. It is preferentially distributed in stands of pedunculate oak (*Quercus robur*). *C. fusipes* is a slow primary parasite which can induce drastic destruction of the root systems. This root rot fungus has been occasionally associated with oak decline possibly linked to soil conditions.

The objective of this work was to determine the ecological situations where *C. fusipes* could induce problems on pedunculate oak. The effects of soil and sylvicultural factors potentially related to *C. fusipes* distribution and impact, were assessed. Impact of the disease was evaluated through oak decline and infection severity. Field observations as well as inoculations in controlled and field conditions allowed us to examine this issue.

We have shown that *C. fusipes* is preferentially distributed in coarse textured soils. The impact of the disease increases with soil sand content, lower soil water saturation and lower soil fertility. In these particular soil conditions, among the biotic and abiotic factors observed, the severity of infection induced by this parasite is highly correlated with oak decline. Soil conditions linked with increasing disease impact, have a positive and direct effect on the parasite by favouring its survival and infection success. In this respect, soil waterlogging is a significant factor reducing fungus vigour. Soil conditions probably play a major role by favouring the pathogen rather than by weakening the host. Indeed, the susceptibility of pedunculate oak does not depend on host vigour and does not increase with conditions susceptible to weaken the tree, such as coarse soil textures, low fertility or conditions of low water availability. The positive aspect of coarse soil texture and the negative impact of soil water saturation were explained by the high susceptibility of *C. fusipes* to hypoxia.

**Key words :** *Collybia fusipes*, fungus, distribution, impact, root rot, ecology, inoculations, hypoxia, *Quercus robur*, oak decline, soil factors.