

MONG-NGOC NGUYEN

**ADAPTATION DE LA TORDEUSE DES BOURGEONS DE L'ÉPINETTE
CHORISTONEURA FUMIFERANA CLEM. À LA RÉSISTANCE DE L'ÉPINETTE
BLANCHE *PICEA GLAUCA* (MOENCH) VOSS.**

**Mémoire présenté
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval
dans le cadre du programme de maîtrise en sciences forestières
pour l'obtention du grade de Maître ès sciences (M. Sc.)**

**SCIENCES FORESTIÈRES
FORESTERIE ET GÉOMATIQUE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC**

2010

© Mong-Ngoc Nguyen, 2010

Résumé

Des travaux réalisés antérieurement ont permis de détecter la présence d'épinettes blanches *Picea glauca* (Moench) Voss. résistantes à la tordeuse des bourgeons de l'épinette *Choristoneura fumiferana* Clem (TBE). Cette découverte ouvre la voie vers l'utilisation d'arbres hôtes résistants à l'insecte dans les programmes de reboisement. Cependant, l'efficacité de cette approche est fortement dépendante de la capacité d'adaptation des populations de TBE à la résistance des plantes hôtes. Pour tester cette hypothèse et documenter le potentiel d'adaptation de la TBE aux variations de qualité du substrat alimentaire, plus de 1200 chrysalides provenant d'épinettes blanches résistantes et défoliées ont été récoltées à l'été 2007 sur le terrain de façon à étudier ces deux types de population. Par la suite, des accouplements intra-populationnels ont été effectués. Les descendants ont été élevés en laboratoire sur des sources de nourriture artificielles simulant des stress alimentaires en sucre et en azote. Dans un premier temps, l'objectif était de mesurer leurs performances biologiques (taux de mortalité, temps de développement, poids, etc.). Puis, des analyses de corrélation entre les performances biologiques des parents et de leur progéniture ont servi à déterminer le niveau d'héritabilité entre les générations. Enfin, différents indices gravimétriques ont également été calculés afin de connaître les processus physiologiques alimentaires des deux populations en situation de stress alimentaire. Les résultats démontrent que le poids des chrysalides et la fécondité réalisée des tordeuses provenant d'épinettes résistantes sont supérieurs à celles issues d'arbres non résistants. En ce qui concerne les progénitures de la génération de laboratoire, la survie des larves de stade 1 est supérieure lorsque les parents sont élevés sur une nourriture stressante de faible qualité alimentaire comparativement à ceux élevés sur une nourriture témoin de bonne qualité. En considérant les interactions entre l'origine des parents et la qualité de nourriture offerte à leur progéniture, la fécondité réalisée et la fertilité sont supérieures chez les tordeuses dont les parents proviennent d'arbres résistants et qui sont élevées sur une diète de piètre qualité. D'autre part, un effet d'héritabilité a été observé sur la variable poids entre la mère et leur progéniture. Toutefois, l'analyse des indices gravimétriques d'utilisation de la nourriture par la TBE révèle que les insectes issus des deux populations sources ont des niveaux d'assimilation de la nourriture équivalents.

Abstract

White spruce [*Picea glauca* (Moench)Voss] trees apparently resistant to spruce budworm (*Choristoneura fumiferana* Clem) were found in a plantation located in Southern Quebec. These finding could provide forest managers with the opportunity to use resistant trees in reforestation programs. However, the success of this approach depends upon the capacity of spruce budworm to develop adaptation mechanism to host tree resistance. To test this hypothesis, 1200 pupae were collected in the field from resistant and susceptible white spruce trees. Adults were mated and offspring was reared under controlled conditions on low and high quality artificial diet. Sugar and nitrogen diet composition was used to provide the larvae with different food quality. Larval biological growth, development and food utilization were investigated as well as spruce budworm heritability according to host tree origin and offspring food quality. The results indicated that the weight of pupae and the realized fecundity were highest when spruce budworms originated from resistant white spruce. Moreover, offspring first instars survival was higher when larvae were fed low quality diet. Offspring from adults collected on resistant spruce and fed with low quality diet produced more eggs and exhibited higher fertility than those fed on high quality diet or originating from non resistant trees. A significant heritability effect was detected between offspring body weight and adult mother weight. Food utilization indices were not significantly different according to host tree origin.

Table des matières

Résumé.....	1
Abstract.....	2
INTRODUCTION.....	6
PROBLÉMATIQUE.....	8
Chapitre 1.....	9
La pression de sélection.....	9
Méthodologie.....	9
Élevage.....	9
Diète artificielle.....	10
Dispositif expérimental et analyses statistiques.....	12
Résultats.....	12
Génération de terrain.....	12
Génération de laboratoire.....	15
Différences entre les générations de terrain et de laboratoire.....	17
Discussion.....	19
Chapitre 2.....	21
L'héritabilité.....	21
Méthodologie.....	21
Tests d'héritabilité.....	21
Analyses statistiques.....	22
Résultats.....	22
Discussion.....	24
Chapitre 3.....	25
L'utilisation de la nourriture.....	25
Méthodologie.....	26
Indices gravimétriques.....	26
Analyses statistiques.....	27
Résultats.....	27
Discussion.....	29
CONCLUSION.....	29
RÉFÉRENCES.....	32

Liste des tableaux

Tableau 1 Analyse de variance (ANOVA) de la génération de terrain	14
Tableau 2 Analyse de variance (ANOVA) de la génération de laboratoire	16
Tableau 3 Covariances et coefficients de régression ou de corrélation	22
Tableau 4 Corrélation de Pearson du poids des chrysalides	24
Tableau 5 Corrélation de Pearson du poids des chrysalides	24
Tableau 6 Analyse de variance (ANOVA) des indices gravimétriques	28

Liste des figures

Figure 1 Superficie défoliée par la TBE selon les années	7
Figure 2 Schéma de la répartition des TBE de l'expérience.....	11
Figure 3 Poids des chrysalides selon la provenance des TBE et le sexe	14
Figure 4 Fécondité réalisée par la femelle selon la provenance des TBE	15
Figure 5 Pourcentage de survie des larves au stade 1	17
Figure 6 Fécondité réalisée par la femelle	18
Figure 7 Pourcentage de fertilité.....	19

INTRODUCTION

Des épidémies de tordeuses des bourgeons de l'épinette ont pu être retracées depuis le dix-huitième siècle (Morin, 1998). Cependant, au Québec, des registres d'épidémies ne sont disponibles que depuis celle de 1909, période durant laquelle cette épidémie avait dévastée environ 30 millions d'hectares de forêt. Puis, des épidémies ont eu lieu en 1938 et 1967, lesquelles ont infesté respectivement 26 millions et 35 millions d'hectares de forêt résineuse. Il faut noter qu'à cette époque, environ 23 millions de mètres cube de bois résineux étaient récoltés par l'industrie forestière (Ministère de Ressources naturelles et Faune 2003).

Dans la province de Québec, un relevé entomologique de l'année 2008 révèle la présence d'épidémies de tordeuses des bourgeons de l'épinette à une échelle plus ou moins importante selon la localisation géographique. En Outaouais, une épidémie est active depuis 1992. Toutefois, depuis 2002, celle-ci est en régression. En Abitibi-Témiscamingue, les superficies atteintes par la TBE sont restées constantes malgré qu'une augmentation de l'intensité ait été observée depuis 2006. En Mauricie et dans les Laurentides, les zones affectées et l'intensité des dommages ont augmenté légèrement comparativement à 2006. Tandis qu'au Saguenay-Lac-St-Jean, sur la Côte-Nord et sur l'île d'Anticosti, une importante hausse des aires touchées a été détectée, de même que les ravages se sont respectivement intensifiés depuis les années 2007, 2005 et 2007 selon les régions (Ministère des Ressources naturelles et Faune, 2008).

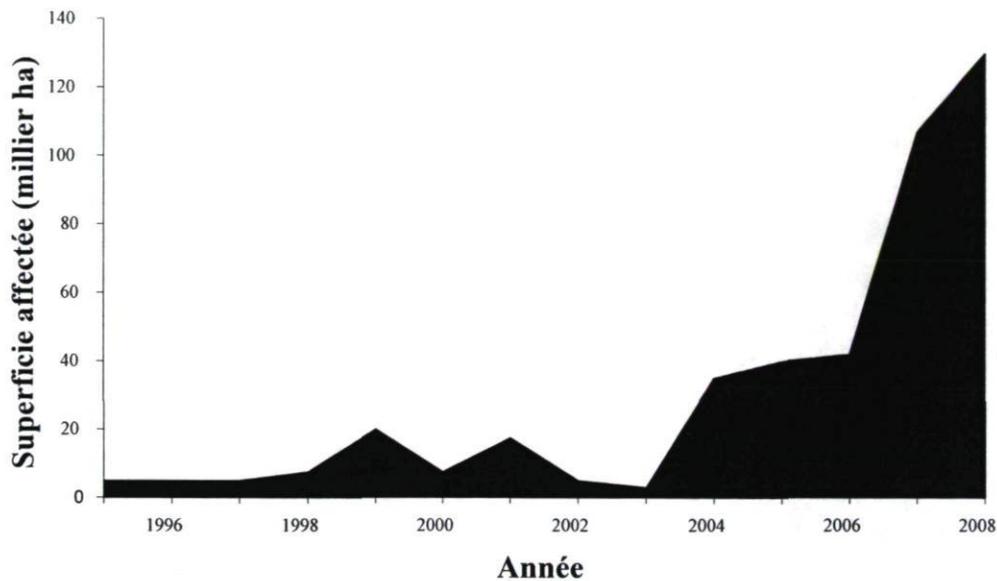


Figure 1 Superficie défoliée par la TBE selon les années (Ministère des Ressources naturelles et Faune, 2008)

Ce graphique illustre la situation actuelle où la superficie annuelle affectée par la TBE augmente au cours des dernières années. La TBE reste l'un des fléaux les plus redoutables de la forêt québécoise encore aujourd'hui. Entre 2006 et 2008, une augmentation drastique des superficies affectées s'est manifestée, pour atteindre près de 140 000 hectares.

Dans une situation de rareté de la matière ligneuse, l'épinette blanche constitue une essence de prédilection dans les programmes de reboisement. L'épinette blanche possède des mécanismes de résistance naturelle contre les attaques de défoliateurs entomologiques. Cette résistance peut se manifester par des mécanismes de désynchronisation phénologique tel qu'observé chez la tordeuse de l'épinette *Zeiraphera canadensis* Mutuura and Freeman (Quiring et al. 1999) ou encore par des processus d'antixénose (Pedigo 2002). La résistance aux défoliateurs peut aussi être le résultat d'une plus grande tolérance aux dégâts c'est-à-dire, la capacité de la plante à supporter les attaques des ennemis (Bauce et al. 2001). La production de composés secondaires par la plante tels que les tannins et les monoterpènes peut constituer une forme de résistance contre les insectes (Mueller et al. 1999). Enfin, les composés nutritionnels peuvent être impliqués dans la résistance

chimique de la plante (Mattson et al. 1997). Dans le cadre de la présente étude, les composés nutritionnels ont été retenus afin de simuler la résistance naturelle des arbres hôtes en exerçant une pression alimentaire sur l'insecte. Ainsi, en ajustant strictement les niveaux de sucre et d'azote dans la nourriture artificielle, un stress alimentaire a pu être généré.

PROBLÉMATIQUE

Au fil du temps, les organismes évoluent et par conséquent les rapports entre les organismes changent. Ce phénomène se nomme l'adaptation. Elle se concrétise par des parties d'organismes ou de processus intérieurs à un organisme qui ont été modifiées les unes par rapport aux autres et du même coup, ont été ajustées par rapport au milieu. Plus précisément, l'adaptation se définit par la capacité d'un organisme à exister et à se reproduire dans des conditions déterminées (Wiebes, 1982). Par conséquent, la TBE pourrait s'adapter aux conditions de stress alimentaire au fil des générations.

La capacité de la TBE à s'adapter aux épinettes blanches résistantes peut s'avérer être un facteur déterminant pour le succès des programmes de reboisement visant à réduire les impacts de la TBE sur les approvisionnements ligneux. L'objectif de la présente étude consiste à déterminer si la TBE peut s'adapter aux mécanismes de résistance des épinettes blanches et à connaître de quelle manière les populations de TBE s'adaptent à cette résistance naturelle. Comme il a été mentionné précédemment, l'étude présente traitera strictement de l'adaptation de la TBE aux mécanismes de résistance chimique de l'épinette blanche.

Nos hypothèses afin d'atteindre notre objectif sont au nombre de trois. Dans un premier temps, nous avançons qu'une pression de sélection s'exerce au sein des populations de TBE par des critères de performance biologique. Puis, nous impliquons les caractères génétiques pour expliquer l'adaptation de la TBE à la résistance de l'épinette blanche. Finalement, notre dernière hypothèse affirme que la TBE adopte différentes stratégies nutritionnelles afin de s'adapter à la résistance de l'épinette.

Chapitre 1

La pression de sélection

L'adaptation se manifeste par le mécanisme de la sélection naturelle, c'est-à-dire lorsque le milieu exerce une pression sur l'organisme. Selon Darwin, la sélection naturelle permettait de lutter pour la vie ou le fitness qui se traduit par exemple par un nombre de descendants qui assure la survie de l'espèce (Wiebes, 1982). En ce sens, Stern (1970) observe la sélection naturelle aussi par le succès reproductif de l'organisme. Par exemple, la pression de sélection a conduit les insectes à mettre au point des moyens de détoxifier les produits chimiques que renferment les plantes afin de leur permettre de s'alimenter de cette ressource (Nicole, 2002). Nous nous attendons à ce que les insectes provenant d'épinette résistante et élevés sur une diète avec un fort stress démontre des critères de performance biologique meilleurs. Par exemple, une larve dont les parents ont un poids de chrysalides élevé devrait avoir à son tour un poids de chrysalide élevé. En fait, au niveau des parents, il y a eu une sélection et les individus les plus forts ont survécu et ont pu se reproduire entre eux, ce qui constitue des individus plus forts au fil des générations.

Méthodologie

Élevage

Afin de vérifier les hypothèses de recherche, une sélection de huit épinettes résistantes et huit épinettes susceptibles à la TBE a été réalisée sur le terrain expérimental de Drummondville, Québec, Canada (coordonnées 45° 53' 0'' N 72° 29' 0'' O) en juin 2007. Ces épinettes ont été sélectionnées d'après des pourcentages de défoliation causée par la TBE. Une épinette résistante présente une défoliation de 10% et moins de son feuillage global, son apparence est saine et vigoureuse. Tandis qu'une épinette susceptible montre une défoliation entre 50 et 65%, elle est donc non résistante à la TBE. Ce site abrite une plantation d'épinettes blanches d'environ 40 ans où des infestations de tordeuses des bourgeons de l'épinette sévissent depuis 1999. Au total, 1360 chrysalides ont été récoltées et transportées au laboratoire. De ces chrysalides, 700 proviennent d'arbres résistants et 660 proviennent d'arbres susceptibles (figure 2). Des accouplements simples (un mâle et une femelle) et intra-populationnels ont été effectués en milieu contrôlé (Photopériode

P16:S8; température de 23 °C et humidité relative de 65%). Lorsque la diapause de 25 semaines a été complétée, les descendants ont été élevés dans une chambre de croissance réglée aux mêmes conditions que celles qu'ont connues leurs parents durant l'accouplement. De ces insectes, certains serviront à vérifier les hypothèses sur l'héritabilité et celles sur les comportements nutritionnels.

Diète artificielle

Les tordeuses ont été soumises à l'un des deux types de diète artificielle préparée en laboratoire, laquelle est inspirée des travaux de McMorran (1965). La différence entre les diètes repose sur les taux de sucre et d'azote contenus dans les diètes. Le sucre joue un rôle primordial dans l'apport d'énergie nécessaire au développement de la tordeuse au cours des derniers stades larvaires (Harvey, 1974), tandis que l'azote représente un élément nutritif essentiel dans la croissance de la tordeuse dans les premiers stades larvaires (Bidon, 1999). La diète témoin simule une situation sans stress alimentaire pour la TBE avec un taux de sucre de 12% et un pourcentage d'azote de 5% en poids sec. Elle simule la bonne qualité de nutriments que la TBE retrouve dans le feuillage d'une épinette susceptible. La diète représentant un fort stress alimentaire affiche un taux de sucre de 1,5% et un taux d'azote de 7%. Cette dernière simule des conditions de stress alimentaire comparables à celles retrouvées chez une épinette résistante. En fait, ces diètes ont été préalablement testées en laboratoire, les taux de sucre et d'azote retenus sont ceux ayant engendré des taux de mortalité larvaire les plus représentatifs comparativement à ceux retrouvés sur le terrain expérimental. La mortalité larvaire est semblable pour les larves évoluant sur un arbre résistant et sur une diète avec un fort stress. Quant à la diète sans aucun stress, elle provoque une mortalité supérieure à celle correspondant aux larves se nourrissant d'arbres susceptibles (Bauce et al. 2007). Les constituants faisant varier le taux de sucre dans les diètes sont le sucrose et le germe de blé. Tandis que les ingrédients tels que la caséine, l'auréomycine, le germe de blé et la choline chlorure font altérer le taux d'azote des diètes. Donc, les descendants des chrysalides provenant d'épinettes résistantes et susceptibles ont été répartis sur les diètes sans aucun stress et avec un fort stress (figure 2).

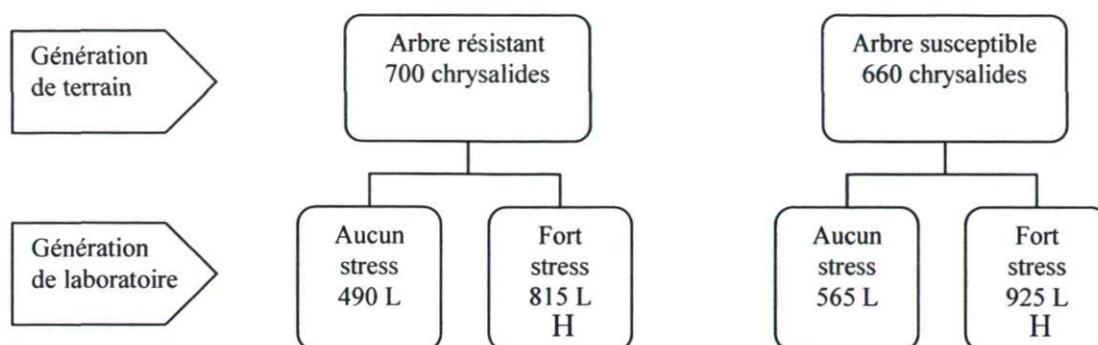


Figure 2 Schéma de la répartition des TBE de l'expérience selon la provenance et les types de diètes (H : larves servant aux tests d'héritabilité)

Tout au long des élevages des générations de terrain et de laboratoire, des paramètres biologiques ont été observés. Premièrement, le poids de la chrysalide a été pris dès la formation de celle-ci et des observations ont par la suite été effectuées sur une base quotidienne. Toutefois, étant donné que la première génération de tordeuses provient du terrain et qu'elles ont été récoltées au stade de la chrysalide, ces dernières sont pesées immédiatement lors de leur entrée en laboratoire. En fait, le poids de la chrysalide représente un paramètre fréquemment utilisé pour évaluer la qualité nutritionnelle des plantes hôtes et leurs effets sur la performance biologique des insectes (Montgomery 1983). De plus, le temps de développement de la larve du stade 2 jusqu'à la mort du papillon a été noté pour la génération de laboratoire. La fécondité réalisée a été mesurée par le décompte des œufs pondus par la femelle. La fertilité quant à elle s'est effectuée par le dénombrement des larves écloses versus le nombre d'œufs pondus. La survie larvaire telle que mesurée au cours de ce projet correspond au nombre de larves ayant pu atteindre le deuxième stade larvaire. Pour la survie hivernale, elle a été calculée en dénombrant les larves vivantes après diapause.

- a) Fécondité réalisée = œufs total pondus par la femelle
- b) Fertilité = nombre de larves émergées/ nombre total d'œufs pondus
- c) Survie des larves au stade 1 = nombre de larves au stade 2/ nombre de larves total
- d) Survie hivernale : nombre de larves vivantes après diapause/ nombre de larves L2

Une fois ces données recueillies, des comparaisons de paramètres ont été effectuées entre les deux générations afin de détecter des effets parentaux entre les différentes générations selon les types de diète. Les effets parentaux sont des effets non génétiques, du phénotype maternel ou paternel ou encore de l'environnement, sur le phénotype des descendants (Mousseau et al. 1991). En particulier, les effets maternels peuvent influencer le taux de croissance et la fécondité des progénitures de la génération suivante (Rossiter 1991). Ainsi, les conditions alimentaires auxquelles sont exposés les parents, affectent le comportement de leur progéniture durant les générations à venir (Carisey et al. 2002).

Dispositif expérimental et analyses statistiques

Le dispositif expérimental correspond à un plan factoriel 2X2X2 dont l'unité expérimentale est représentée par l'insecte. Le premier facteur est caractérisé par l'origine des larves, c'est-à-dire, épulette résistante ou susceptible. Le second indique le traitement appliqué aux larves, soit une diète sans aucun stress ou avec un fort stress. Le dernier facteur est constitué du sexe de l'individu (mâle ou femelle).

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel SAS, la version 9.1. Les procédures MEANS, GLM et LOGISTIC ont été utilisées. La procédure MEANS a permis de déterminer la moyenne des données, la procédure GLM, à exécuter une anova et la procédure LOGISTIC a permis d'analyser le taux de survie des larves. En ce qui concerne la procédure GLM, les postulats d'homogénéité de la variance et la normalité des résidus ont été vérifiés tel que nécessite l'utilisation de cette commande. De plus, l'erreur-type correspondant sera illustrée pour chacun des graphiques ci-dessous.

Résultats

Génération de terrain

Le tableau 1 permet de constater que le poids de la chrysalide est différent selon l'interaction entre l'origine et le sexe ($P < 0.0001$). Plus précisément, la figure 3 montre des chrysalides femelles provenant d'arbres résistants possédant un poids plus élevé comparativement à celles issues d'arbres susceptibles. En ce qui concerne la fécondité réalisée, une différence significative est observée selon l'origine des tordeuses (tableau 1).

Ainsi, les femelles TBE provenant d'arbres résistants ont pondu plus d'oeufs comparativement à celles issues d'arbres susceptibles (figure 4).

Tableau 1 Analyse de variance (ANOVA) du poids et du temps de développement des tordeuses en fonction de leur origine et de leur sexe pour la génération de terrain

Paramètres	d.l.	Valeur de F	P
Poids			
Origine	1	87.37	<0.0001**
Sexe	1	1341.41	<0.0001**
origine*sexe	1	20.28	<0.0001**
Fécondité réalisée			
Origine	1	4.17	0.0418*
Fertilité			
Origine	1	1.15	0.2839
Survie des larves au stade 1			
Origine	1	0.33	0.5667
Survie hivernale			
Origine	1	0.05	0.8283

* Effet significatif ($P < 0.05$), ** effet hautement significatif ($P < 0.0001$)

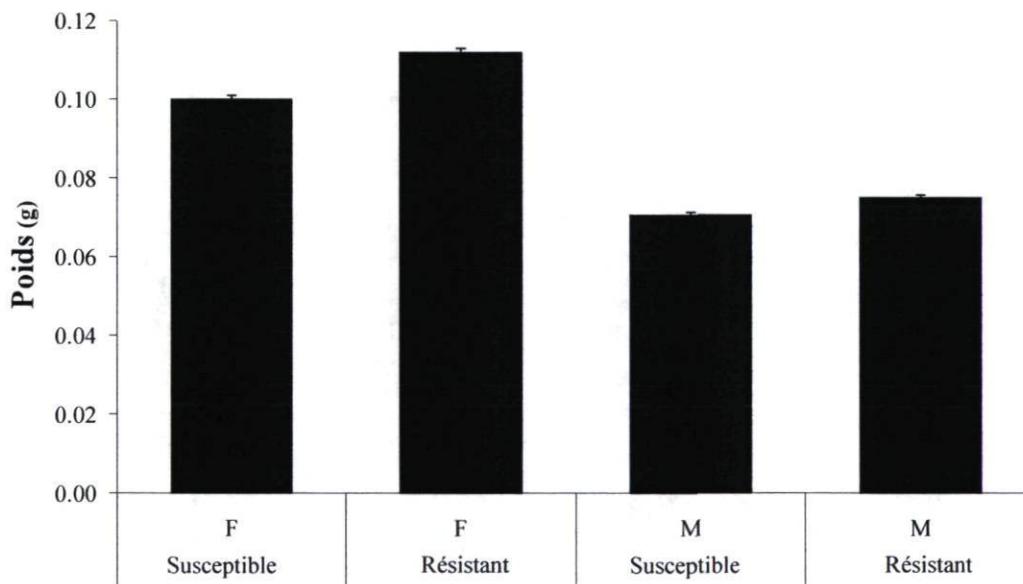


Figure 3 Poids des chrysalides selon la provenance des TBE et le sexe : Erreur-type de l'interaction entre la provenance et le sexe des TBE

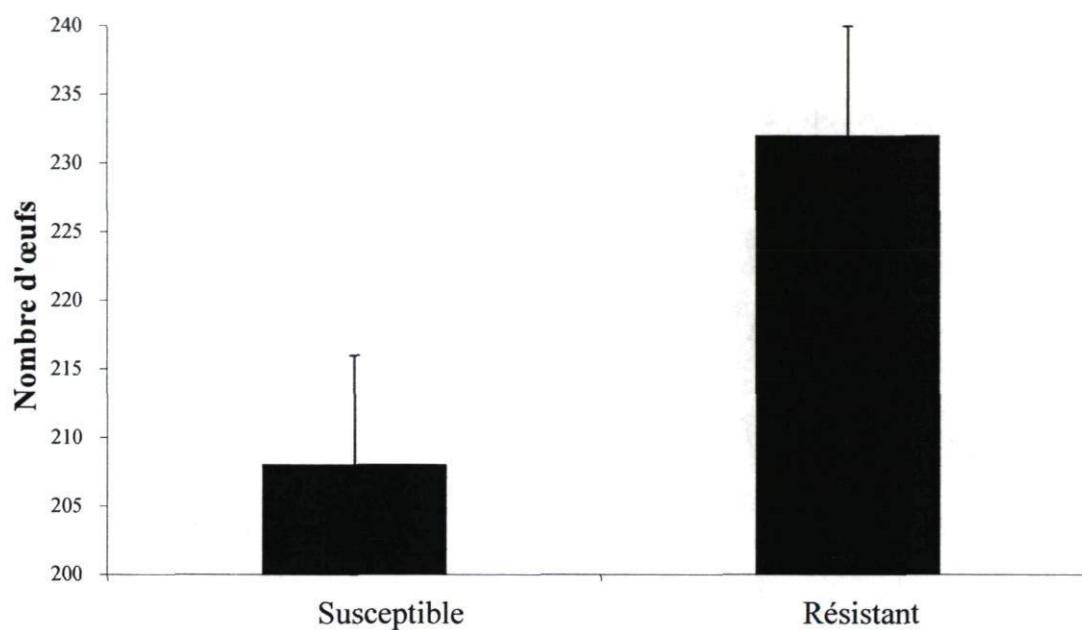


Figure 4 Fécondité réalisée par la femelle selon la provenance des TBE : Erreur type de la provenance des TBE

Génération de laboratoire

Les analyses statistiques révèlent que la survie des larves au stade 1 diffère selon le traitement appliqué aux larves ($P= 0.0430$). Ainsi, la figure 5 illustre le taux de survie plus élevé chez les tordeuses soumises à un fort stress comparativement aux larves élevées sur une diète alimentaire sans aucun stress.

Tableau 2 Analyse de variance (ANOVA) du poids et du temps de développement des populations de tordeuses en fonction de leur origine et de leur sexe pour la génération de laboratoire

Paramètres	d.l.	Valeur de F	P
Poids			
origine	1	0.02	0.8863
traitement	1	143.59	<0.0001**
origine*traitement	1	2.03	0.1543
sexe	1	236.46	<0.0001**
origine*sexe	1	0.85	0.3566
traitement*sexe	1	6.16	0.0133*
origine*traitement*sexe	1	0.79	0.3729
Temps de développement			
origine	1	0.20	0.6563
traitement	1	0.80	0.3718
origine*traitement	1	0.37	0.5413
sexe	1	15.61	<0.0001**
origine*sexe	1	0.12	0.7271
traitement*sexe	1	1.65	0.1990
origine*traitement*sexe	1	0.00	0.9828
Fécondité réalisée			
origine	1	0.85	0.3569
traitement	1	1.10	0.2950
origine*traitement	1	8.97	0.0029*
Fertilité			
origine	1	6.57	0.0108*
traitement	1	38.50	<0.0001**
origine*traitement	1	4.80	0.0291*
Survie des larves au stade 1			
origine	1	0.11	0.7448
traitement	1	4.17	0.0430*
origine*traitement	1	0.05	0.8249
Survie hivernale			
origine	1	1.42	0.2356
traitement	1	1.54	0.2171
origine*traitement	1	0.11	0.7433

* Effet significatif ($P < 0.05$), ** effet hautement significatif ($P < 0.0001$)

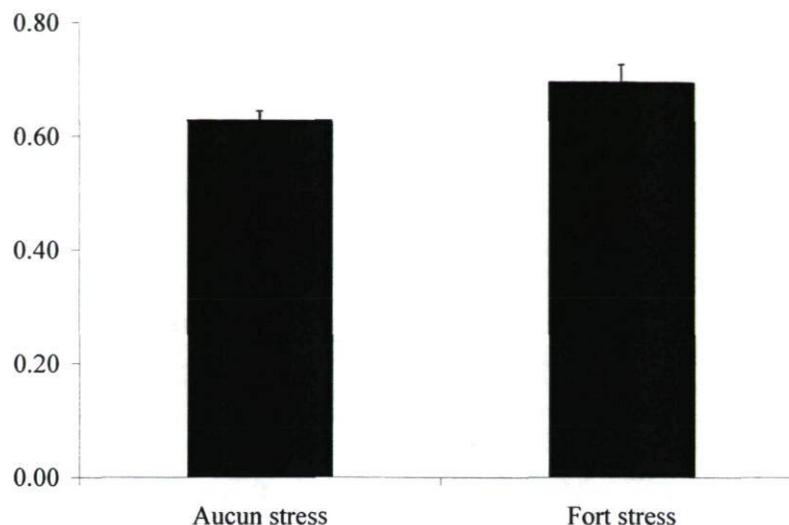


Figure 5 Pourcentage de survie des larves au stade 1 en fonction de la diète : Erreur-type du traitement

Différences entre les générations de terrain et de laboratoire

Les interactions entre l'origine et la diète sont significativement différentes en ce qui a trait à la fécondité réalisée et à la fertilité ($P= 0.0029$ et $P= 0.0291$ respectivement). En fait, la fécondité réalisée est supérieure chez les tordeuses dont les parents proviennent d'arbres résistants et dont les rejets ont été élevés sur une nourriture sans aucun stress (figure 6). La fertilité quant à elle est meilleure chez les tordeuses dont les parents proviennent d'arbres résistants, indépendamment de la qualité alimentaire imposée aux progénitures (figure 7).

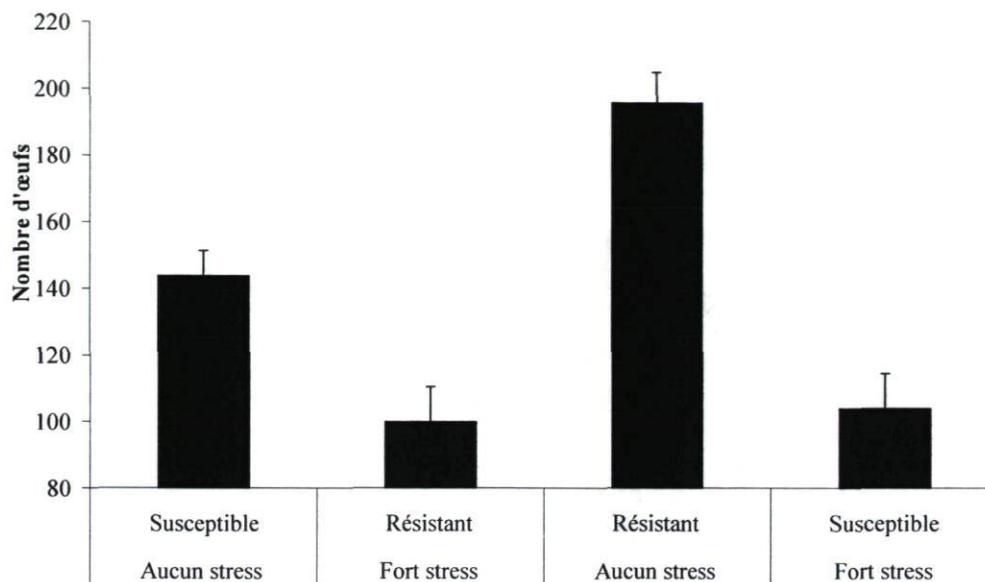


Figure 6 Fécondité réalisée par la femelle en fonction de la provenance des TBE et le type de diète soumis à la progéniture : Erreur-type de l'interaction entre l'origine et le traitement des tordeuses

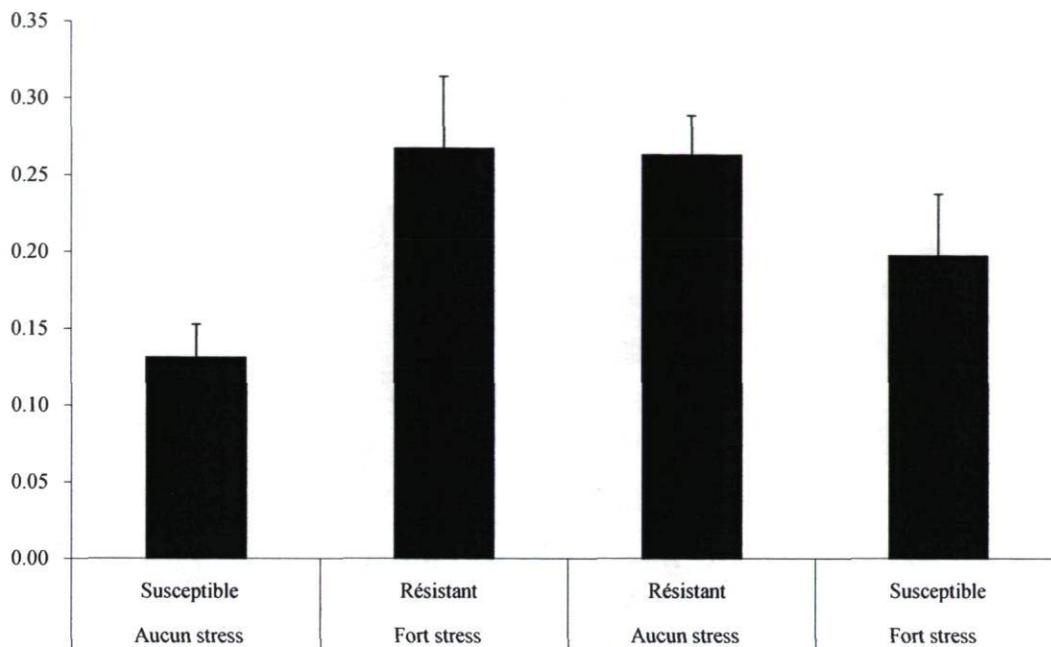


Figure 7 Pourcentage de fertilité selon la provenance des TBE et le type de diète soumis à la progéniture : Erreur-type de l'interaction entre l'origine et le traitement des tordeuses

Discussion

Le poids des chrysalides et la fécondité réalisée sont supérieurs chez les TBE issues d'arbres résistants comparativement aux TBE provenant d'épinettes susceptibles. En d'autres termes, les chrysalides provenant d'épinettes résistantes démontrent des critères de performances biologiques supérieurs à celles issues d'épinettes susceptibles. Par surcroît, le poids des chrysalides est étroitement lié au potentiel de fécondité chez les femelles (Wagner et al. 1987). Donc, une pression de sélection s'opère au sein de la population de tordeuses provenant d'épinettes résistantes puisque dans un tel contexte de stress alimentaire les plus faibles meurent. Cette population de tordeuses issue d'arbres résistants possède donc une moyenne de poids de chrysalide plus élevée et une fécondité plus grande. À l'opposé, dans la population de tordeuses provenant d'épinettes susceptibles, les individus plus faibles survivent, ce qui diminue la moyenne des poids de chrysalide et la fécondité réalisée de la population. Ainsi, la qualité de la nourriture joue un rôle primordial quant aux performances biologiques de la TBE (Mattson et al. 1997).

L'effet de la diète affecte aussi la survie des larves au stade 1. Les tordeuses élevées sur une diète avec fort stress ont donné des descendants plus nombreux comparativement aux tordeuses mises sur une diète sans aucun stress.

Comme l'indique les résultats, la fécondité réalisée est supérieure pour les insectes provenant d'épinettes résistantes et élevés sur une diète sans aucun stress. Toutefois, malgré une fécondité réalisée plus importante chez les tordeuses dont les parents proviennent d'arbres susceptibles et élevés sur une diète sans aucun stress, le taux de fertilité est moindre pour ces tordeuses comparativement aux tordeuses issues d'épinettes résistantes. Ces données sur la fécondité réalisée et la fertilité révèlent que³, les populations de tordeuses en provenance d'épinettes possédant une résistance chimique naturelle sont plus performantes que les populations provenant d'arbres susceptibles puisque la fertilité est meilleure chez les tordeuses provenant d'épinettes résistantes qu'elles soient élevées sur un milieu avec stress ou sans aucun stress. Cette affirmation est soutenue par Mousseau et al. (1991) qui ont trouvé que les effets maternels influencent la taille de la progéniture. En ce sens, Rossiter (1991) avance que ces effets s'expriment sur le potentiel de la progéniture quant à leur capacité de croître et de se reproduire.

Cette situation démontre que lorsque les parents connaissent des conditions de développement défavorables et que leurs descendants sont soumis par la suite à des conditions favorables, ils seront les plus performants. Cette adaptation se manifeste par une pression de sélection exercée par la qualité nutritionnelle puisque les meilleurs individus survivent dans de mauvaises conditions alimentaires. Ainsi, la performance relative de la population est améliorée (Tremblay, 2007).

Chapitre 2

L'héritabilité

La génétique quantitative étudie l'hérédité des caractères quantifiables entre individus ou groupes d'individus (Nanson, 2004). Elle s'exprime par les variations génétiques par rapport aux variations phénotypiques. Elle permet d'expliquer les propriétés observées sur une population en fonction de leurs gènes ou par l'influence des facteurs autres que la génétique. Ainsi, le phénotype s'exprime d'une part par la variation des gènes et d'autre part par l'environnement ou le milieu. (Zobel, B. et J. Talbert, 1984). Comme la présente étude tente de comprendre le phénomène héréditaire entre les deux générations subséquentes, la part de la variation phénotypique attribuable aux gènes doit être isolée. L'héritabilité permet d'obtenir une estimation propre à une population vivant dans un environnement et à un moment déterminé.

Méthodologie

Tests d'héritabilité

Comme indiqué plus haut, les croisements entre papillons ont été effectués par accouplements simples et intra-populationnels. Afin d'observer l'effet d'héritabilité entre les générations de terrain et de laboratoire, des familles ont été sélectionnées dans les deux groupes mentionnés à la figure 2, il s'agit des TBE élevées sur la diète avec un fort stress et provenant d'épinette résistante ainsi que les TBE élevées sur la diète sans aucun stress et provenant d'épinette susceptible. Puis, des corrélations ont été réalisées avec les familles dont les descendants comportent au moins trois mâles et trois femelles. Plus précisément, les critères biologiques tels que le poids de la chrysalide, la fécondité, la fertilité, la survie des larves au stade 1 et la survie hivernale ont été corrélés de façon à déterminer s'il y a relation entre ceux des parents et ceux des progénitures, pour chacun des quatre groupes de TBE étudiés. Deux méthodes sont principalement employées pour estimer l'héritabilité, soit par l'analyse de la variance ou à l'aide de la régression entre apparentés (Minvielle, 1990).

Tableau 3 Covariances et coefficients de régression ou de corrélation en fonction de lien de parenté considéré (Falconer et al. 1996)

Parentés	Covariances	Coefficients de régression b ou de corrélation t
Un enfant et un parent	$\frac{1}{2} V_a$	$b = \frac{1}{2} h^2$
Un enfant et parent moyen	$\frac{1}{2} V_a$	$b = h^2$
Demi-frères	$\frac{1}{4} V_a$	$t = \frac{1}{4} h^2$
Pleins frères	$\frac{1}{2} V_a + \frac{1}{4} V_d + V_{ec}$	$t \geq \frac{1}{2} h^2$

V_a : variance additive

V_d : variance non additive

V_{ec} : variance due au milieu

Dans le cadre de cette étude, la méthode d'estimation par le coefficient de régression a été employée. Étant donné que les paramètres biologiques ont été notés pour chacun des insectes de l'expérience, ces informations permettent d'utiliser le type d'apparenté d'un enfant et un parent. Donc l'héritabilité (h^2) correspond à 2 fois la pente de la droite trouvée. Selon Carles (2005), la corrélation est faible si la valeur de h^2 est comprise entre 0 et 0,2. Une valeur entre 0,2 et 0,4 montre une corrélation moyenne. Enfin, une forte corrélation est trouvée lorsque la valeur de h^2 est plus grande que 0,4. Puisque le nombre de descendants n'est pas constant pour chacun des couples, il y a eu répétition du parent autant de fois qu'il y a de rejetons (Ollivier, 1974).

Analyses statistiques

Les analyses de corrélations ont été effectuées à l'aide de la commande PROC CORR de SAS. Afin de s'assurer de la validité des résultats, les familles dont la progéniture compte moins de trois mâles et trois femelles n'ont pas été considérées. Donc, un total de 20 familles provenant d'épinettes susceptibles et 26 familles issues d'arbres résistants ont été examinées.

Résultats

Un effet d'héritabilité a été observé sur la variable poids entre la mère et les descendants, mais seulement chez deux des quatre groupes de TBE étudiés. Il s'agit des larves

provenant d'épinettes susceptibles et dont les descendants ont été élevés sur une nourriture avec fort stress, de même que chez les larves issues d'épinettes résistantes et dont les rejetons ont subi un fort stress alimentaire (tableaux 4 et 5) où $N= 20$ et 68 respectivement. Par exemple, la valeur de R carré équivaut à $0,44634$, à une probabilité de $0,0485$ et pour un total de vingt observations. L'équation de la droite qui permet de trouver cet effet d'héritabilité est la suivante :

$$\text{Poids de l'enfant} = 0.140928 * \text{poids de l'adulte} + 0.035273$$

Puisque $h^2 = 2 * \text{pente de la droite}$, la valeur d'héritabilité équivaut à $0,281856$. Étant donné que cette valeur est comprise dans l'intervalle entre $0,2$ et $0,4$, l'effet d'héritabilité ici est moyen.

Tableau 4 Corrélation de Pearson du poids des chrysalides entre les parents et leurs rejetons pour les tordeuses provenant d'arbres défoliés et dont les rejetons ont été soumis à un fort stress alimentaire

Corrélation du poids des chrysalides	Valeur R carré	Probabilité	Nombre d'observations
Père et fils	0.37946	0.0816	22
Père et fille	0.16803	0.4548	22
Mère et fils	0.44634	0.0485*	20
Mère et fille	0.04466	0.8517	20

* Effet significatif ($P < 0.05$)

Tableau 5 Corrélation de Pearson du poids des chrysalides entre les parents et leurs rejetons pour les tordeuses provenant d'arbres résistants et dont les rejetons ont été soumis à aucun stress alimentaire

Corrélation du poids des chrysalides	Valeur R carré	Probabilité	Nombre d'observations
Père et fils	0.08105	0.5112	68
Père et fille	0.15904	0.1952	68
Mère et fils	0.16231	0.1860	68
Mère et fille	-0.24528	0.0438*	68

* Effet significatif ($P < 0.05$)

Discussion

Une corrélation moyenne entre le poids des chrysalides de la mère et son rejeton a été significative ($P=0.0485$) pour les tordeuses provenant d'épinettes susceptibles et dont la progéniture a été élevée sur une diète avec fort stress. Cette corrélation a aussi été observée chez les tordeuses provenant d'épinettes résistantes et dont les descendants ont été soumis à une diète sans aucun stress ($P=0.0438$). Donc, des études ultérieures devront être entreprises afin de valider les résultats obtenus. En fait, pour que cette corrélation soit concluante, il aurait fallu la retrouver à travers toutes les populations examinées et à l'intérieur d'un même traitement, par exemple pour les tordeuses provenant d'un arbre susceptible et dont la progéniture a subi un faible stress. Un nombre plus élevé de famille

par traitement aurait été requis. Par ailleurs, une recherche effectuée sur l'arctiide décoré *Utetheisa ornatrix* Linnaeus a indiqué qu'il y a présence de corrélation entre le poids des parents et celui des rejetons (Iyengar et al. 1999).

Chapitre 3

L'utilisation de la nourriture

Les paramètres biologiques des insectes renseignent sur leur performance sur un type de nourriture donné mais ne permet pas de connaître pourquoi une diète est meilleure comparativement à une autre. À titre d'exemple, un poids de chrysalide faible peut être le résultat d'une consommation limitée de la nourriture, s'expliquant par une absence de phagostimulant ou encore par la présence d'une toxicité chimique. Les indices gravimétriques de Waldbauer (1972) permettent de trouver réponses à ces questions (Montgomery 1983). Le comportement nutritionnel des insectes et l'efficacité de conversion de la nourriture sont observés par le calcul des indices gravimétriques de Waldbauer (1972). Ils permettent de comprendre la manière dont les insectes utilisent la nourriture durant le processus alimentaire tels que l'ingestion, la digestion ou l'assimilation et la conversion en biomasse. En présence d'un stress alimentaire, il a été observé que les larves de TBE consomment davantage ou de façon plus efficace la nourriture afin de compenser ces conditions d'alimentation défavorables (Bidon, 1993; Carisey et Bauce, 1997). Ces indices sont au nombre de cinq, le premier renseigne sur le taux relatif d'ingestion (TRI), le deuxième concerne la digestibilité approximative ou l'efficacité d'assimilation (DA). Il existe aussi l'efficacité de conversion en biomasse de la nourriture ingérée (ECI) et l'efficacité de conversion en biomasse de la nourriture digérée ou l'efficacité métabolique (ECD). Finalement il s'agit du taux relatif de croissance (TRC). Le calcul des indices se présente comme suit :

$$TRI = NI/(P \times T)$$

$$DA = ((NI-FP)/NI) \times 100$$

$$ECI = (GP/(P \times T)) \times 100$$

$$ECD = ((GP/(NI-FP)) \times 100$$

$$TRC = (GP/(P \times T)) \times 100$$

où :

NI = nourriture ingérée (mg)

GP = PF-PI (mg)

PI = poids initial de la larve (mg)

PF = poids final de la larve (mg)

P = poids moyen de la larve = $(PF-PI) / \log(PF-PI)$

T = temps écoulé (heure)

FP = fecès produites (mg)

Méthodologie

Indices gravimétriques

Afin d'étudier le comportement nutritionnel des TBE, les données nécessaires au calcul des indices gravimétriques ont été prises sur les larves au stade 6 car 80% de son alimentation a lieu à ce stade (Ministère des Ressources naturelles et de la Faune, 2003). Lorsque les larves atteignent le sixième stade larvaire, elles sont mises en période de jeûne pour 24 heures. Par la suite, une nouvelle diète préalablement pesée sera offerte aux larves jusqu'à la formation de la chrysalide.

Étant donné que les calculs des indices gravimétriques s'effectuent par des rapports, il a fallu trouver un dénominateur commun afin de permettre la comparaison de chacun des indices entre eux. Donc, une équation linéaire ou non linéaire ont été trouvées en posant le numérateur y comme une fonction du dénominateur x . De même, la moyenne du dénominateur X a été calculée. Pour chacun des ratios et chacun des traitements, la valeur de y_i a été ajustée avec l'équation suivante (Bauce et al. 1994) :

$$\text{Rapport ajusté} = \frac{y_i + \frac{f(X) - f(x_i)}{X}}{X}$$

Analyses statistiques

L'analyse des indices gravimétriques a été réalisée à l'aide de la procédure GLM du logiciel SAS. Les postulats d'homogénéité de la variance et la normalité des résidus ont été vérifiés.

Résultats

L'analyse des indices gravimétriques révèle que les insectes mâles et femelles, issus des deux populations sources et élevés, sur les diètes de bonne et mauvaise qualité ont une efficacité d'assimilation, des taux relatifs d'ingestion et de croissance une efficacité de conversion en biomasse de la nourriture ingérée et de la nourriture digérée équivalents. En somme, les cinq indices gravimétriques étudiés n'ont démontré aucune différence significative entre les populations à l'étude (tableau 6).

Tableau 6 Analyse de variance (ANOVA) du TRI, DA, ECI, ECD et TRC en fonction de l'origine, du traitement, du sexe et de leurs interactions

Paramètres	d.l.	Valeur de F	P
TRI			
origine	1	2.44	0.1211
traitement	1	0	0.9851
origine*traitement	1	1.30	0.2565
sexe	1	0.04	0.8428
origine*sexe	1	0.04	0.8337
traitement*sexe	1	1.24	0.2679
origine*traitement*sexe	1	0.13	0.7180
DA			
origine	1	3.10	0.0806
traitement	1	0.30	0.5836
origine*traitement	1	0.11	0.7377
sexe	1	67.88	<0.0001**
origine*sexe	1	0.32	0.5719
traitement*sexe	1	0.05	0.8160
origine*traitement*sexe	1	0	0.9862
ECI			
origine	1	0.77	0.3806
traitement	1	3.45	0.0655
origine*traitement	1	0.33	0.5678
sexe	1	18.41	<0.0001**
origine*sexe	1	0.21	0.6454
traitement*sexe	1	0.03	0.8626
origine*traitement*sexe	1	0.13	0.7206
ECD			
origine	1	0.82	0.3666
traitement	1	3.27	0.0730
origine*traitement	1	0.32	0.5724
sexe	1	20.03	<0.0001**
origine*sexe	1	0.25	0.6196
traitement*sexe	1	0.01	0.9028
origine*traitement*sexe	1	0.07	0.7890
TRC			
origine	1	0.04	0.8512
traitement	1	0.33	0.5686
origine*traitement	1	0.37	0.5444
sexe	1	119.92	<0.0001**
origine*sexe	1	0.36	0.5523
traitement*sexe	1	0	0.9500
origine*traitement*sexe	1	3.00	0.0857

** effet hautement significatif (P < 0.0001)

Discussion

Il a été possible de constater lors de cette étude, des taux d'ingestion similaires pour les tordeuses soumises aux deux différents types de diètes. Par contre, la littérature indique que la présence de TBE est élevée dans des conditions de stress alimentaire, cette dernière consomme plus pour compenser la mauvaise qualité de nourriture ou encore, assimile la nourriture de façon plus efficace (Bidon 1993, Carisey et al. 1997). Cette divergence entre les résultats obtenus et ceux escomptés pourraient s'expliquer par les taux de sucre et d'azote utilisés dans les diètes artificielles, soumises aux larves de stade 6 lors de la présente étude. Plus précisément, la diète sans aucun stress renfermait des taux de sucre de 12% et d'azote de 5%, comparativement à la diète avec fort stress où les taux de sucre et d'azote sont de 1,5% et 7% respectivement. Des quantités plus élevées d'azote dans la préparation de la diète de mauvaise qualité pourrait expliquer le taux d'ingestion obtenu pour les larves soumises à ce traitement. En effet, on observe une augmentation du taux d'ingestion lorsque la concentration en azote diminue. Ainsi, le taux de croissance de l'insecte est plus ou moins indépendant des plantes et leur contenu azoté (Crawley 1983). Cependant, on retrouve dans la littérature une corrélation positive entre le nutriment azoté et le taux de développement de la TBE (Bidon 1993, Harvey 1974). Cette corrélation positive est aussi observée entre le contenu azoté des plantes et le taux de consommation de la larve (Albert et al. 1994). De plus, les taux d'efficacité de conversion en biomasse de la nourriture ingérée et digérée étaient semblables pour les larves soumises à une diète avec aucun stress et fort stress. Toutefois, il faut noter que la nourriture ingérée et digérée n'est pas convertie nécessairement en biomasse. Or, une fois la nourriture convertie en énergie, cette dernière peut être utilisée autrement qu'en augmentation de la biomasse. Par exemple, elle peut servir à la respiration de l'organisme et à combattre les toxines des plantes (Lindroth 1993). Ainsi, Nicole (2002) rapporte que seulement 2 à 38% de la matière végétale consommée par un insecte est efficacement transformée.

CONCLUSION

En somme, les populations de TBE où les parents proviennent d'arbres résistants et dont la progéniture est élevée sur une diète de mauvaise qualité ont démontré des critères de performance plus élevés que celles provenant d'arbres susceptibles et dont les descendants

ont été soumis à une bonne qualité de nourriture. Par conséquent, une pression de sélection s'est manifestée au sein des populations par de meilleures fécondité réalisée et fertilité.

De plus, la présente étude a révélé que le caractère génétique pourrait contribuer à l'adaptation de la TBE aux épinettes blanches résistantes. En fait, un effet d'héritabilité a été constaté entre le poids de la chrysalide de la mère et sa progéniture en ce qui concerne les populations dont les parents proviennent d'arbres susceptibles et dont les enfants ont connu des conditions de stress alimentaire. Cependant, ce résultat mérite d'être vérifié lors d'études ultérieures puisque la corrélation obtenue n'était pas homogène à l'ensemble des populations à l'étude.

En ce qui a trait aux indices gravimétriques l'ensemble des paramètres testés se sont avérés équivalents pour les quatre groupes étudiés. De même, les larves soumises au 2 types de diètes ont obtenu des performances équivalentes en ce qui a trait à l'efficacité de conversion en biomasse de la nourriture ingérée et de la nourriture digérée. Ainsi, l'étude montre que les TBE ne développent pas de comportements nutritionnels afin de s'adapter à la résistance des épinettes blanches. Toutefois, ces résultats doivent être interprétés en considérant des taux d'azote plus élevé dans la diète de mauvaise qualité.

En bref, les tordeuses des bourgeons de l'épinette s'adaptent à la résistance naturelle de l'épinette blanche par une pression de sélection au sein de la population. Cette adaptation pourrait aussi se manifester par le caractère génétique du poids de la chrysalide entre la mère et sa progéniture.

Ainsi, dans l'éventualité où du reboisement devait être fait avec de l'épinette blanche, il faudra tenir compte de la capacité d'adaptation des tordeuses des bourgeons de l'épinette. Par conséquent, une stratégie à exploiter consisterait à combiner des épinettes blanches résistantes mais aussi des épinettes susceptibles à la tordeuse des bourgeons de l'épinette à l'intérieur d'un même secteur de reboisement. Cette stratégie engendrerait des temps de développement similaires pour les différentes populations de TBE, qu'elles soient issues d'épinettes résistantes ou susceptibles. De cette manière, les échanges de bagage génétique

entre les TBE des 2 phénotypes lors de l'accouplement limiteront les possibilités d'adaptation à la résistance naturelle de l'épinette blanche.

RÉFÉRENCES

- Albert et al., 1994. Feeding preferences of fourth- and sixth-instar spruce budworm (Lepidoptera: Tortricidae) larvae for foliage extracts from young and old balsam fir hosts. *Environmental Entomology*. 23(3): 645-653.
- Bauce et al., 1994. Spruce budworm growth, development and food utilization on young and old balsam fir trees. *Oecological*. 97: 499-507.
- Bauce et al., 2001. Implications des relations alimentaires plante-insecte dans la lutte contre la tordeuse des bourgeons de l'épinette, Acte de colloque sur la tordeuse des bourgeons de l'épinette, Québec, Canada.
- Bauce et al., 2007. Natural resistance of fast growing white spruce, (*Picea glauca* Moench), trees against spruce budworm, (*Choristoneura fumiferana* Clem.). Acte de colloque International symposium: Bottlenecks, solutions, and priorities in the context of functions of forest resources. Istanbul, Turquie. 687-695.
- Bidon, 1993. Influence des sucres solubles et de l'azote sur la croissance, le développement et l'utilisation de la nourriture par la tordeuse des bourgeons de l'épinette (*Choristoneura fumiferana* Clem.). MSc thèse, Université Laval, Sainte-Foy, Canada. 60p.
- Bidon, 1999. Interactions entre la qualité du substrat nutritif et le *Bacillus thuringiensis* (Bt) sur le comportement, les performances et l'utilisation de la nourriture par les larves de tordeuses des bourgeons de l'épinette (*Choristoneura fumiferana* Clem.). PhD thèse, Université Laval, Sainte-Foy, Canada.
- Carisey et al., 1997. Impact of balsam fir foliage age on sixth-instar spruce budworm growth, development, and food utilization. *Canadian Journal of Forest Research*. 27: 257-264.
- Carisey et al., 2002. Does nutrition-related stress carry over to spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* (Lepidoptera: Tortricidae) progeny? *Bulletin of Entomological Research*. 92: 101-108.
- Carles, 2005. Notions de génétique quantitative : Génétique de l'épinette blanche en Amérique du Nord et au Québec, sujet spécial du département des sciences du bois et de la forêt, Université Laval. 89p.
- Cody et al., 2006. Applied Statistics and the SAS programming language. Pearson Prentice Hall. 574p.
- Crawley, 1983. Herbivory: The dynamics of animal- plant interactions. University of California press. *Studies in ecology* 10:111-210.
- Harvey, 1974. Nutritional studies of eastern spruce budworm (Lepidoptera: Tortricidae) I. Soluble sugars. *The Canadian Entomologist*. 106:353-365.
- Falconer et al., 1996. 4eme édition. Introduction to quantitative genetics. Longman group Ltd, England. 464p.
- Gallais, 1990. Théorie de la sélection en amélioration des plantes. Masson Paris. 588p.

- Iyengar et al., 1999. Heritability of body mass, a sexually selected trait, in an arctiid moth (*Utetheisa ornatrix*). *The Proceedings of the National Academy of Sciences*. 96: 9169-9171.
- Kerkut et al., 1985. *Comprehensive insect physiology biochemistry and pharmacology*. Pergamon Press. Oxford. 639p.
- Lindroth, 1993. Food conversion efficiencies of insect herbivores. *Food Insects Newsletter*. 6: 8-11.
- Mattson et al., 1997. Considering the nutritional ecology of the spruce budworm in its management. *Forest Ecology and Management*. 39: 183-210.
- McMorran, 1965. A synthetic diet for the spruce budworm *Choristoneura fumiferana* (Clem.) (Lepidoptera: Tortricidae). *The Canadian Entomologist*. 97: 58-62.
- Ministère des Ressources naturelles et Faune, 2003. La tordeuse des bourgeons de l'épinette. Québec. Consulté le 15 avril 2009 tiré de <http://www.mrn.gouv.qc.ca/forets/fimaq/insectes/fimaq-insectes-insectes-tordeuse.jsp>
- Minvielle, 1990. *Principes d'amélioration génétique des animaux domestiques*. La presse de l'université Laval, Québec. 211p.
- Montgomery 1983. *Proceedings, forest defoliator-host interactions: A comparaison between gypsy moth and spruce budworms*. 133-139
- Morin, 1998. Importance et évolution des épidémies de la tordeuse des bourgeons de l'épinette dans l'Est du Canada : L'apport de la dendrochronologie. *Géographie physique et Quaternaire*. 52 (2) : 1- 8.
- Mousseau et al. 1991. Maternal effects in insect life histories. *Annual Review of Entomology*. 36: 511-534.
- Muller-Harvey, 1999. *Secondary plant products antinutritional and beneficial actions in animal feeding*, Nottingham Uni. Press. 17-39
- Nanson A. 2004. *Génétique et amélioration des arbres forestiers*. Les presses agronomiques de Gembloux, Belgique. 712 p.
- Nicole, 2002. Les relations des insectes phytophages avec leurs plantes hôtes. *Antennae*. 9: 1.
- Ollivier, 1974. La régression parent-descendant dans le cas de descendances subdivisées en familles de taille inégale. *Biometrics*. 30 (1): 59-66.
- Pedigo et al., 2002. *Entomology and pest management*, Pearson Prentice Hall. 742p.
- Quiring et al., 1999. Why does early-season herbivory affect subsequent budburst? *Ecology* 80 (5): 1724-1735.
- Rossiter, 1991. Maternal effects generate variation in life history: consequences of egg weight plasticity in the gypsy moth. *Functional Ecology*. 5: 386-393.
- SAS Institute, 1988. *SAS/STAT User guide*. SAS Institute, Cary, NC.
- Schultz, 1988. Plant responses induced by herbivores. *Trends in Ecology and Evolution*. 3: 45-49.

- Tremblay, 2007. Pression de sélection de type alimentaire sur une population de tordeuses des bourgeons de l'épinette (*Choristoneura fumiferana* Clem.). MSc thèse, Université Laval, Sainte-Foy, Canada. 58p.
- Volney et al., 1991. The phenology of white spruce and the spruce budworm in northern Alberta. *Canadian Journal of Forest Research*. 22:198-205.
- Waldbauer, 1972. The consumption and utilization of food by insects. *Advances in Insect Physiology* 5: 229-288.
- Wagner et al., 1987. Predicting number of oocytes in adult western spruce budworm, *Choristoneura occidentalis* (Lepidoptera: Tortricidae). *Environmental Entomology*. 16: 551-555.
- Wiebes, 1982. L'adaptation évolutive. *Acta Biotheoretica* 31: 239-243.
- Zobel et al., 1984. *Applied forest tree improvement*. John Wiley and Sons, Inc. Waveland Press, Inc, New York, Toronto. 505p.