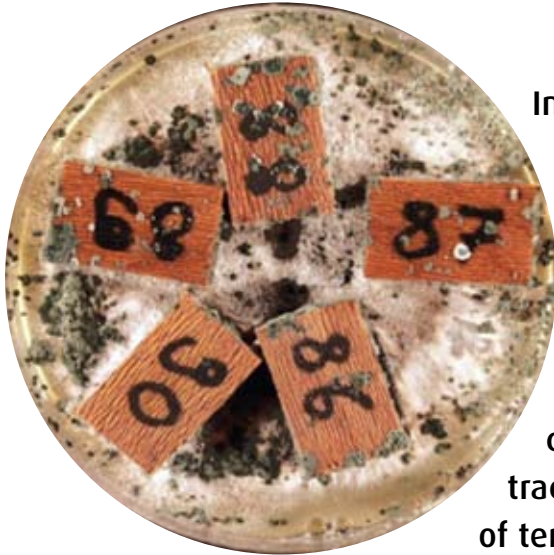


# Biologische beheersing van



In de bebouwde kom, langs snelwegen en rond kabels en leidingen worden bomen veelal gesnoeid om veiligheidsredenen en komt stamrot door inrotten van snoeiwonden vaak voor. Zware stamrot kan bomen gevaarlijk maken en risico opleveren voor mens en bezit. Daarom wordt geprobeerd middels (chemische) wondbehandeling het risico op inrotten van snoeiwonden te verkleinen. Door de druk van wetgeving en consumenten om het gebruik van traditionele, giftige houtbeschermingsmiddelen stop te zetten of terug te dringen, wordt het idee van biologische wondbehandeling steeds belangrijker. Dit is niet nieuw: al in 1882 formuleerde Hartig doelstellingen van effectieve behandeling van snoeiwonden ter bescherming tegen infectie en rot na snoeien. Hij vond dat de behandeling geen negatief gevolg mocht hebben op de natuurlijke afweer van de boom, maar de bescherming tegen infectie door wondparasieten moest bevorderen.

FRANCIS W.M.R. SCHWARZE

VERTALING EN BEWERKING:

ELS COUENBERG EN CAROLIEN SCHAMHARDT

Dit artikel is het eerste deel van een bewerking van een publicatie van Francis W.M.R. Schwarze. In *Bomen* 21 verschijnt het tweede deel. Een uitgebreide versie van dit artikel, inclusief literatuurverwijzingen en literatuurlijst, is binnenkort beschikbaar op de website van KPBI-SA.

Francis W.M.R. Schwarze is senior wetenschapper bij Empa: Swiss Federal Laboratories for Materials Science and Technology - Wood Laboratory. Hij heeft belangrijke bijdragen geleverd aan de fundamentele kennis omtrent schadelijke houtschimmels. Zijn onderzoek is gepubliceerd in internationale tijdschriften, zoals *New Phytologist* en *Nature Biotechnology*.

## Soorten en stammen

In de natuur komen schimmels voor die de groei van andere schimmels tegengaan of beperken. Deze schimmels worden antagonisten genoemd. Weindling ontdekte in 1932 dat het schimmelgeslacht *Trichoderma* antagonistisch werkt op ziekteverwekkers (=pathogenen) in planten. Soorten *Trichoderma* zijn overal in de omgeving aanwezig, vooral in de grond. Sindsdien zijn verschillende soorten *Trichoderma* diepgaand bestudeerd als mogelijke biologische middelen om pathogenen onder de duim te houden. Het baanbrekende werk van Risbeth leidde tot belangstelling voor *Trichoderma* als mogelijke antagonist van belangrijke pathogenen van bomen, waaronder *Heterobasidion annosum* (dennenmoorder) en *Armillaria* spp (honingzwam). Grosclaude en Corke behandelden snoeiwonden van fruitbomen (appels en perziken) met succes met *T. viride* tegen infectie door *Chondrostereum purpureum* (paarse korstzwam of loodglansziekte). Sinds die tijd is het onderzoek naar antagonistische *Trichoderma*'s gestaag toegenomen. Vandaag de dag bestaat er een aantal commerciële producten die gebaseerd zijn op *Trichoderma*-soorten, zoals Binap TF WP (Bio-Innovation, Zweden), voor de biologische controle van pathogenen, waaronder schimmels die de wortels en de stam aantasten.

Maar schimmels kennen niet alleen soorten, maar binnen

# schadelijke houtschimmels

die soorten ook nog verschillende stammen, die op het oog niet te onderscheiden zijn maar wel verschillend reageren. Daarom is het niet mogelijk om ‘even’ een *Trichoderma* uit de bodem te isoleren en toe te passen.

Onderzoek naar antagonistische *Trichoderma*-stammen gebeurt daarom in twee fasen:

1. isoleren van verschillende *Trichoderma*-stammen (‘isolaten’) en testen op antagonistische effecten in het lab;
2. testen van de gevonden antagonisten in de praktijk.

## Antagonistische werking

In deze studie werd in het lab de antagonistische werking van een aantal isolaten van *Trichoderma*-soorten op vijf bekende houtrotschimmels (Tabel 1) geëvalueerd.

Vier aspecten van de antagonistische werking zijn getest:

1. de remming van houtrotschimmels door vluchtige componenten;
2. competitie in groei tussen *Trichoderma* en de houtrotschimmels;
3. mycoparasitisme en excretie van celoplossende (lytische) enzymen;
4. het vermogen om groei van planten te promoten en resistentie te induceren.

Het doel van de studies was het potentieel van verschillende *Trichoderma*-soorten als biocontrolemiddelen te evalueren en om een concurrerende stam te identificeren die gebruikt kon worden voor de behandeling van snoeiwonden van stadsbomen tegen kolonisatie door schadelijke houtschimmels (Schubert 2008b; Schubert 2008c). De oorsprong van de *Trichoderma*-isolaten en schadelijke houtschimmels die in deze studies gebruikt zijn, staan in Tabel 1, en de materialen en methodes die gebruikt zijn worden beschreven in Schubert et al. (2008a).

## 1. Remming door vluchtige componenten

Dit is getest, maar valt buiten het bestek van dit verhaal (Schubert et al. (2008a)).

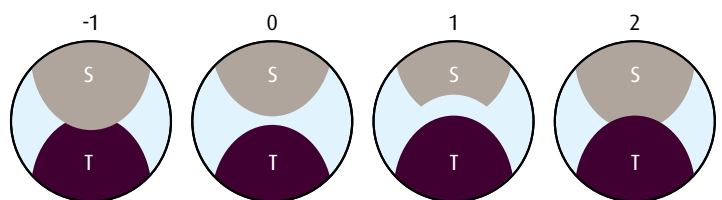
## 2. Competitie in groei

Om de competentie in groei tussen *Trichoderma*-isolaten en de houtrotschimmels te testen, worden duo-cultuurtesten gebruikt. In duo-cultuurtesten laat men op een petrischaal met een voedingsmedium (moutextract agar) zowel het *Trichoderma*-isolaat als de houtrotschimmel groeien om te zien of de *Trichoderma*-isolaat de houtrotschimmel remt. Beide schimmels groeien en de hyfen komen elkaar op een gegeven moment tegen. Wat er dan gebeurt, is afhankelijk van de mate van antagonisme van het bewuste *Trichoderma*-isolaat en de weerstand van de houtrotschimmel tegen antagonisme. Er zijn vier mogelijkheden (zie Figuur 1):

1. er gebeurt niets;
2. *Trichoderma* remt de houtrotschimmel;
3. *Trichoderma* overgroeit (parasiteert) de houtrotschimmel;
4. de houtrotschimmel overgroeit (parasiteert) *Trichoderma*.

In de praktijk kan de ene keer *Trichoderma* winnen, de andere keer de houtrotschimmel. Daarom is iedere combinatie in zesvoud getest. De groei van alle schadelijke houtschimmels, behalve *P. squamosus*, werd door de *Trichoderma*-isolaten teruggedrongen. Er vond contact plaats tussen de schadelijke houtschimmels en *Trichoderma*-isolaten, maar het vermogen om over de schimmels heen te groeien en de mycelia van deze schimmels te parasiteren, was zeer afhankelijk van het antagonistische vermogen van elk *Trichoderma*-isolaat (Figuur 1) en van de weerstand van de schadelijke houtschimmel tegen antagonisme (Tabel 2).

Figuur 1 Classificatie van de interacties tussen mycelia in de duo-cultuurtesten



- 1 Houtrotschimmel overgroeit mycelium van *Trichoderma* (mycoparasitisme)
- 0 Geen interactie
- 1 Antagonisme
- 2 *Trichoderma* overgroeit mycelium van houtrotschimmel (mycoparasitisme)

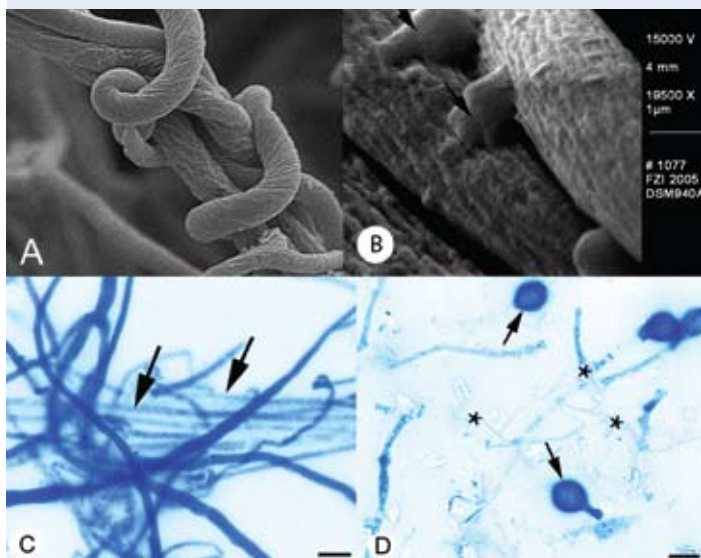
Tabel 1 Bestudeerde *Trichoderma*-isolaten en houtrotzwammen

<i>Trichoderma</i>	Isolaat nr.	Houtrotschimmel	Isolaat nr.
<i>Trichoderma atroviride</i>	15603.1 <sup>z</sup>	<i>Polyporus squamosus</i>	291101.2 <sup>z</sup>
<i>Trichoderma atroviride</i>	CBS 351.93 <sup>y</sup>	<i>Ganoderma adspersum</i>	086699.2 <sup>z</sup>
<i>Trichoderma atroviride</i>	CBS 396.92 <sup>y</sup>	<i>Ganoderma lipiense</i>	250593.1 <sup>z</sup>
<i>Trichoderma fasciculatum</i>	CBS 338.93 <sup>y</sup>	<i>Inonotus hispidus</i>	200792.1 <sup>z</sup>
<i>Trichoderma virens</i>	CBS 126.65 <sup>y</sup>	<i>Kretzchmaria deusta</i>	271098.1 <sup>z</sup>
BINAB TF WP (T.)	IMI	<i>harzianum</i> / <i>T. polysporum</i>	206039/40 <sup>x</sup>

z Isolaten van het Institute of Forest Botany, Universiteit van Freiburg

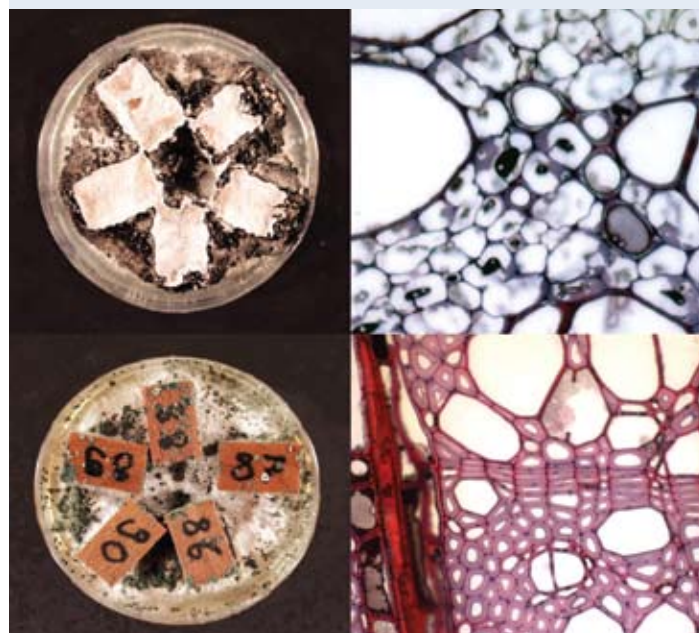
y Isolaten van het Centraal Bureau voor Schimmelculturen, Nederland

x BINAB Bio-Innovation AB, Zweden



Figuur 2

- A SEM-foto (SEM = Scanning ElektronenMicroscop), met de hyfen van *Trichoderma* T-15603.1 die om de hyfen van *Kretzschmaria deusta* groeien om het gebied waar ze contact maken te vergroten.  
 B Zuigmondjesachtige structuren vertakken over de hyfen van de gastheer.  
 C *Trichoderma* T-15603.1 die in de duo-cultuurtests de hyfen van *Ganoderma resinaceum* aanvallen (pijl-tjes).  
 D Uitscheiding van celoplossende enzymen leidt tot complete afbraak van de hyfen van *G. resinaceum*. Alleen de (chlamydo)sporen van *G. resinaceum* zijn tegen de afbraak bestand (\*). Grootte van de streepjes: 10 µm.



Figuur 3

- Linksboven: houtblokjes zonder *Trichoderma* werden door *Kretzschmaria deusta* volledig gekoloniseerd en de tracheiden waren na 18 weken sterk afgebroken (rechtsboven).  
 Beneden: houtblokjes met T-15603.1 verhinderden kolonisatie door *Kretzschmaria deusta* en de tracheiden vertoonden na 18 weken geen teken van afbraak.

### 3. Mycoparasitisme en excretie van enzymen

Door de interactiezone tussen *Trichoderma*-isolaat en houtrotschimmel te bekijken, is te zien of er mycoparasitisme en uitscheiding van celoplossende enzymen door *Trichoderma* voorkomen. *Trichoderma*-isolaten bleken de houtrotschimmels te kunnen parasiteren (Figuur 2 en 4), behalve bij *Polyporus squamosus* (zadelzwam). Deze bleek in 57% van de gevallen niet geparasiteerd te kunnen worden. *Trichoderma* bleek gericht naar de mycelia van houtrotschimmels toe te groeien en deze met zuignapjesachtige structuren vast te kunnen houden. Daarna werden fijne hyfen gevormd die de cellen van het mycelium van de houtrotschimmels binnendrongen en daar enzymen afscheidde die de cellen van dit mycelium lek maakten. Het binnendringen van dit mycelium gebeurde met dunne hyfen. Vervolgens scheidt *Trichoderma* speciale celoplossende enzymen (lysozymen) en schimmeldodende stoffen uit die leiden tot de complete afbraak van de celwanden van de gastheer. Alleen de sporen (chlamydo-sporen) van de gastheer zijn hiertegen bestand (Figuur 2c en 2d).

### 4. Promotie groei van planten en inductie van resistentie

Voor het testen van het vermogen om groei van planten te promoten en resistentie te induceren werden stukjes hout van *Platanus x hispanica* geïnoculeerd met sporen van *Trichoderma*. Deze stukjes werden vervolgens geplaatst op petrischalen waarin houtrotschimmels groeiden. De mate van aantasting van de houtrotschimmels werd daarna bepaald door het verlies aan drooggewicht van de blokjes (= houtafbraak) te analyseren en de houtcellen onder de microscoop te bestuderen. De geselecteerde schadelijke houtschimmels koloniseerden de controle-houtmonsters totaal, maar lieten opvallende verschillen zien in de mate waarin ze het hout deden rotten (Figuur 3). In onbehandelde monsters veroorzaakte *Kretzschmaria deusta* het hoogste gemiddelde droog-gewichtsverlies (11,7%), gevolgd door de *Ganoderma*-soort (8,2%), terwijl *P. squamosus* (5%) en *I. hispidus* (3,6%) het laagste gemiddelde gewichtsverlies veroorzaakten. Houtmonsters die alleen behandeld waren met *Trichoderma* spp. lieten alleen een verwaarloosbaar gewichtsverlies zien (1,6%). Schubert et al. (2008a) toonden aan dat houtmon-

Tabel 2 Classificatie van de mate van mycoparasitisme door verschillende *Trichoderma*-stammen.

	T-15603.1	T-351.93	T-396.92	T-BINAB	T-126.65	T-338.93
<i>I. hispidus</i>	2,2 ± 0,14 [100]	2,9 ± 0,98 [100]	2,4 ± 0,65 [83]	2,3 ± 0,77 [100]	3,0 ± 0,98 [100]	2,1 ± 0,89 [67]
<i>G. adspersum</i>	3,0 ± 0,10 [100]	2,5 ± 0,18 [100]	2,9 ± 0,12 [100]	2,4 ± 0,67 [100]	2,9 ± 0,14 [100]	0,7 ± 0,09 [17]
<i>G. lipiense</i>	2,3 ± 0,11 [83]	2,4 ± 1,23 [100]	1,9 ± 0,21 [67]	1,9 ± 0,23 [83]	2,3 ± 0,54 [100]	0 ± 0,0 [0]
<i>K. deusta</i>	3,0 ± 0,36 [100]	2,8 ± 1,31 [100]	2,6 ± 0,33 [100]	2,8 ± 0,42 [100]	2,9 ± 0,56 [100]	1,8 ± 0,36 [67]
<i>P. squamosus</i>	2,2 ± 0,56 [83]	1,8 ± 1,05 [67]	2,4 ± 0,66 [83]	1,7 ± 0,11 [83]	2,9 ± 1,45 [100]	0 ± 0,0 [0]

2,2 ± 0,14: mate van mycoparasitisme, na 4 weken: 0 = geen overgroei, 1 = langzame overgroei, 2 = snelle overgroei, 3 = zeer snelle overgroei en impasse van de houtrotschimmel | [100]: % dodelijk effect = het vermogen van *Trichoderma* tot eliminatie van de houtrotschimmel na vier weken groei.

sters die van tevoren werden behandeld met een suspensie van conidiën van *Trichoderma* spp. het gemiddelde droog-gewichtsverlies van alle schadelijke houtschimmels aanzienlijk deden afnemen (Figuur 3). Histologische analyse bevestigde de uitkomsten van de macroscopische observaties en metingen van droog-gewichtsverlies (Figuur 3). Houtmonsters leden een hoog droog-gewichtsverlies door alle schadelijke houtschimmels, maar bij monsters die tevoren waren behandeld met *Trichoderma* spp. waren geen sporen te vinden van celwanddegradatie (Figuur 3).

## Houtrot

Hoewel houtmonsters werden behandeld met conidische suspensies van *Trichoderma* spp., toonde *P. squamosus* een hoge weerstand tegen antagonisme en veroorzaakte deze aanzienlijk gewichtsverlies. Alle andere schimmels vertoonden een vergelijkbare reactie ( $P < 0.05$ ) en gevoeligheid voor *Trichoderma* spp., *Ganoderma* spp., en *P. squamosus* veroorzaakte een typische witte houtrot (d.w.z. dat houtrot tegelijkertijd optreedt met selectieve houtafbraak. *Inonotus hispidus* had twee effecten tegelijkertijd, namelijk gewone houtrot en een zachte houtrot, terwijl *K. deusta* alleen een zachte houtrot veroorzaakte. Een ander afbraakpatroon werd gezien bij *P. squamosus* op hout dat tevoren was behandeld met *Trichoderma*. Hyfen groeiden overwegend in intercellulaire ruimten, en tastten vervolgens de celwand aan die dicht bij hen was. Houtmonsters die uitsluitend besmet waren met *Trichoderma* spp. toonden geen sporen van celwanddegradatie. De hyfen groeiden voornamelijk binnen in de parenchymcellen en groei naar andere cellen vond uitsluitend plaats via hofstippels.

## Conclusies

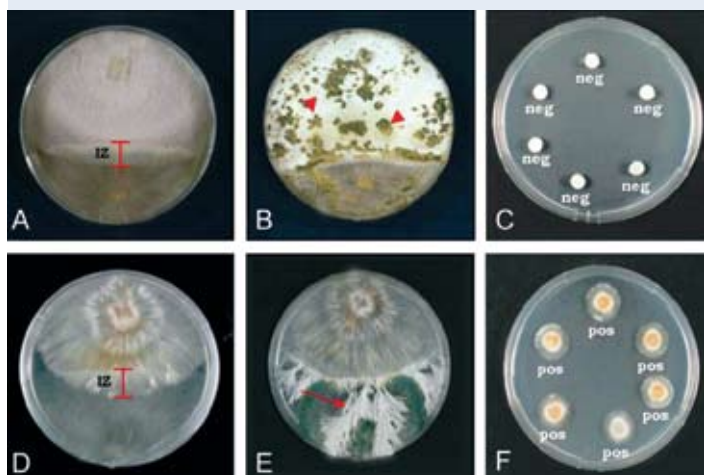
Zowel in duo-cultuurtests als in interactietests werden significante verschillen gevonden tussen de soorten en stammen van *Trichoderma* spp. Zo vertoonden T-15603.1, T-351.93 en T-126.65 een hoog antagonistisch vermogen, terwijl het antagonistisch vermogen van T-396.92, het commerciële product Binab, en vooral T-338.93 beperkt was. De resultaten die uit in-vitrostudies zijn verkregen zijn nuttig om niet-werkende isolaten uit te schakelen via screening-tests, maar ze zijn niet representatief omdat in-vitrotests niet alle ecologische en endemische factoren kunnen nabootsen. Factoren zoals het vochtgehalte in het hout en concurrentie met de inheemse microflora kunnen in een laboratorium onmogelijk nagebootst worden. Variabele grootheden in de omgeving en het effect van genotype x genotype-interacties kunnen op onvoorspelbare wijze van invloed zijn op de uitkomst, en zelfs de resultaten die verkregen zijn met de houttests zijn misschien niet volledig toepasbaar.

Zo toonde *P. squamosus* een hoge weerstand tegen antagonisme. Eerdere studies hebben aangetoond dat *Trichoderma* spp. een beperkt effect heeft op *Bjerkandera adusta* en *Gleophyllum trabeum*. Het mechanisme dat *P. squamosus* in staat stelde om parasitisme in de duo-cultuurtests te omzeilen, is nog niet eerder beschreven. Er werd waargenomen dat *P. squamosus* na het eerste contact met de hyfen van *Trichoderma* spp. zijn hyfenstructuur aanpaste (Figuur 4f). De individuele *P. squamosus*-hyfen smolten samen tot compacte draden, waarmee ze de omvang van de oppervlakte verkleinden en daarmee ook het hyfengebied dat blootgesteld was aan parasitisme. Hyfendraden bleken over meer weerstand te beschikken en stelden *P. squamosus* in staat om over het mycelium van *Trichoderma* spp. heen te groeien. In de houtinteractiestudies vertoonde *P. squamosus* een speciaal groeipatroon. De hyfen bevonden zich vooral in de intercellulaire ruimten, waarmee ze mycoparasitisme door *Trichoderma* spp. voorkwamen/omzeilden. Eenzelfde groeiproces is eerder beschreven voor *Meripilus giganteus*. De basidiomyceet was blijkbaar in staat om polyphenotische begrenzingen binnen beuken, *Fagus sylvatica*, uit de weg te gaan/te omzeilen, door te groeien in de intercellulaire ruimten. Om deze reden is veldwerk noodzakelijk om de doelmatigheid van geselecteerde biocontrolemiddelen onder natuurlijke condities te testen.

Figuur 4

*Ganoderma adpersum* (A en B) en *Polyporus squamosus* (D en E) na één en vier weken groei met *Trichoderma* T-15603.1 in de duocultuurtest. Stukjes mycelium van *Ganoderma adpersum* (neg) (C) groeiden niet op agar met *Trichoderma*, wat duidt op 100% dodelijk effect door *Trichoderma* T-15603.1. Stukjes mycelium van *Polyporus squamosus* (pos) (F) groeiden wel op agar met *Trichoderma*, wat duidt op een laag antagonistisch vermogen van *Trichoderma* T-15603.1 voor *P. squamosus*.

IZ = interactiezone.



## Literatuur

- Schubert, M., S. Fink & F.W.M.R. Schwarze, 2008a. Evaluation of *Trichoderma* ssp. as a biocontrol agent against wood decay fungi in urban trees. *Biological control* 45:11-123.
- Schubert, M., S. Fink & F.W.M.R. Schwarze, 2008b. In vitro screening of an antagonistic *Trichoderma* strain against wood decay fungi. Part 1. *Arboricultural Journal* 31: 227-248.