

# Biologische beheersing van



We weten nog maar weinig over de effectiviteit van biologische middelen om schadelijke houtschimmels die wonden van stadsbomen koloniseren onder de duim te houden. In stedelijke gebieden is de luchttemperatuur meestal hoger dan in bossen. Bovendien is de doordringbaarheid van de grond vaak laag doordat verdichting extra stress toebrengt aan het wortelsysteem. Deze factoren kunnen bij herhaalde snoeiwerkzaamheden de gezondheid van de bomen geweld aandoen of, in aanwezigheid van pathogenen, ziekte opwekken.

FRANCIS W.M.R. SCHWARZE

VERTALING EN BEWERKING:

ELS COUENBERG EN CAROLIEN SCHAMHARDT

Dit artikel is het tweede deel van een bewerking van een publicatie van Francis W.M.R. Schwarze. Het eerste deel is verschenen in *Bomen* 20. Een uitgebreide versie van dit artikel, inclusief literatuurverwijzingen en literatuurlijst, is beschikbaar op [www.kpb-isa.nl](http://www.kpb-isa.nl).

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*.

Figuur 1 Toepassing van T-15603.1 op snoeiwonden in Straatsburg, Frankrijk.  
a) Sporensuspensies 1 en 2 worden op het wondoppervlak gespoten.  
b) Sporensuspensie 3 (drager natriumpolyacrylaat). aangebracht met een kwast.

## Antagonisten

De meeste schadelijke houtschimmels die stadsbomen koloniseren via snoeiwonden, komen nauwelijks in bossen voor. De unieke ecologische condities van stedelijke gebieden en de lage frequentie/verspreidingsgraad van antagonisten door het ontbreken van organisch materiaal in de boomspiegel, kunnen infectie door wondparasieten aanwakkeren.

Een mogelijk antagonist tegen schadelijke houtschimmels is de schimmel *Trichoderma*. In deel één van dit artikel werd in verschillende in-vitrotests tegen vier basidiomyceten (*Ganoderma adspersum*, *G. lipsiense*, *Inonotus hispidus*, *Polyporus squamosus*) en één ascomycete (*Kretzschmaria deusta*) een zeer concurrerende *Trichoderma*-stam geïdentificeerd (T-15603.1) (Schubert et al. 2008b). De resultaten van in-vitrostudies zijn nuttig om isolaten van *Trichoderma* die niet goed werken uit te schakelen, maar zijn niet overtuigend omdat de tests niet alle ecologische en endemische factoren kunnen nabootsen. Factoren als de vochtigheid van het hout en de concurrentie met inheemse microflora kunnen onmogelijk gesimuleerd worden in een laboratorium. Daarom zijn veldonderzoeken noodzakelijk die de doelmatigheid van T-15603.1 als biologische behandelingsmethode voor het beschermen van snoeiwonden tegen wondschimmels van bomen in stadsgebieden onder natuurlijke omstandigheden testen (Schubert et al. 2008c). Hierbij zijn twee aspecten van belang:

- Hoe effectief beschermt T-15603.1 tegen schadelijke houtschimmels?
- Hoe lang is een aangebrachte T-15603.1 effectief?

# schadelijke houtschimmels

## Methode

Er werden 1431 wonden bij 159 loofbomen van zes verschillende soorten behandeld met conidische suspensies (= sporenoplossingen) (Schubert et al. 2008c). De wonden hadden een gemiddelde diameter van 6,4 cm en werden onmiddellijk na het snoeien in juli en augustus 2003 behandeld met drie verschillende conidische suspensies van de antagonist T-15603.1:

- suspensie 1 (CFU: 105/ml);
- suspensie 2 (CFU: 105/ml + 0,2% D-glucose + 0,1% ureum);
- suspensie 3 (CFU: 105/ml + 0,2% D-glucose + 0,1% ureum + 0,4% natriumpolyacrylaat, een component van het product Luquasorb 1030) (BASF AG Ludwigshafen, Duitsland).

De conidische suspensies 1 en 2 werden op de oppervlakte van de wond gespreid (Figuur 1a), terwijl suspensie 3 werd aangebracht met een conventionele kwast (Figuur 1b). Als controle werden wonden met water behandeld. Om het beschermende effect van de *Trichoderma*-stam T-15603.1 tegen kolonisatie door schadelijke houtschimmels te evalueren, werd bij 64 van deze bomen een extra inoculatietest toegepast (Schubert et al. 2008c). Drie weken na behandeling met T-15603.1 werden hun wonden geïnoculeerd met drie basidiomyceten: *I. hispidus*, *G. adspersum*, en *P. squamosus*.

## Herisolatie en analyse

Na 30 maanden werden delen van de behandelde wonden onttrokken aan de boom, en grondig geanalyseerd. Er werden ook radiale isolaties en herisolaties uitgevoerd volgens

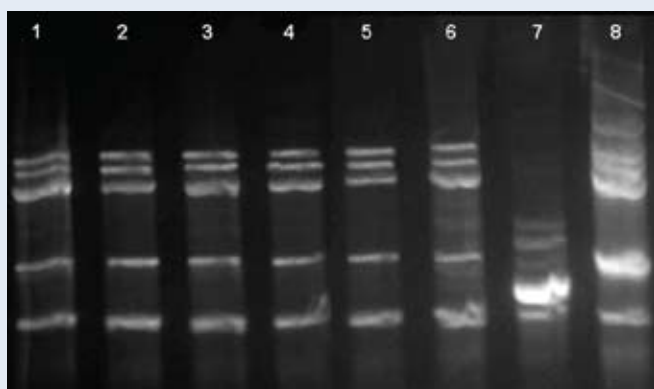
een dieptegradiënt (1 cm, 3 cm, 5 cm). Parameters zoals wondafsluiting en verkleuring dicht bij wonden werden geregistreerd en gemeten volgens de methode van Liese et al. (1988) en Metzler (1997). Aanvullende gegevens, zoals de locatie, oriëntatie, klimaatgegevens, de hoeveelheid spinthout en kernhout en het wondoppervlak, werden ook regelmatig geregistreerd (Schubert et al. 2008c).

Vestiging van de *Trichoderma*-stam in het houtsubstraat en de vasthoudendheid ervan werden gecontroleerd met herisolaties na 2, 8, 12, 18, 24 en 30 maanden. Houtmonsters (20 mm x 10 mm x 5 mm) werden met een steriele beitel uit het centrum en de periferie onttrokken. In het laboratorium werden de monsters aan de oppervlakte gesteriliseerd met waterstofperoxide, verdeeld in drie delen en geplaatst op het moutextract agar, een medium dat selectief is voor *Trichoderma*, en het moutextract agar met thiobendazol (d.w.z. media die selectief zijn voor het isoleren van houtrot-basidiomyceten).

De identificatie van de verkregen isolaten gebeurde met conventionele methodes met macro- en micromorfologische kenmerken en met RAPD-PCR zoals beschreven door Castle et al. (1998) (Figuur 2).

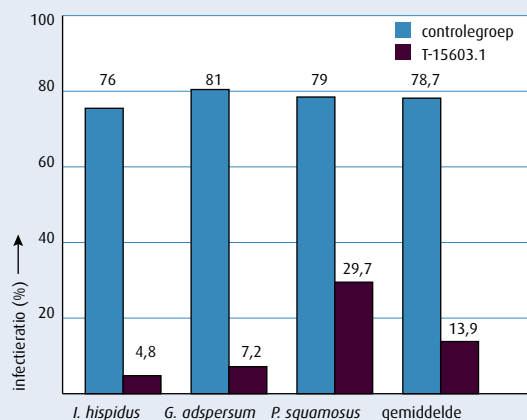
## Resultaten

Figuur 3 illustreert de invloed van T-15603.1 op infecties van behandelde en onbehandelde (controle)wonden. De evaluatie van de kunstmatige inoculatietests gaf een hoge biocontroledoelmatigheid te zien van T-15603.1 tegen *I. hispidus*, *G. adspersum* en *P. squamosus* op snoeiwonden. Controlewonden geïnoculeerd met schadelijke hout-



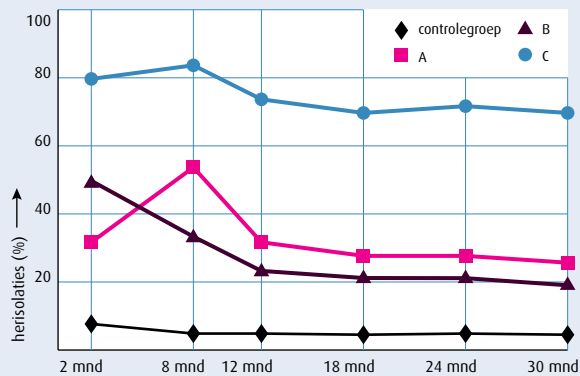
Figuur 2 RAPD-PCR.

Strook 1 = toegepaste stam T-15603.1; Stroken 2-6 = *Trichoderma*-stammen die na 30 maanden werden geïsoleerd uit de behandelde snoeiwonden; Strook 7 = *Trichoderma virens*; Strook 8 = *Trichoderma fasciculatum*.



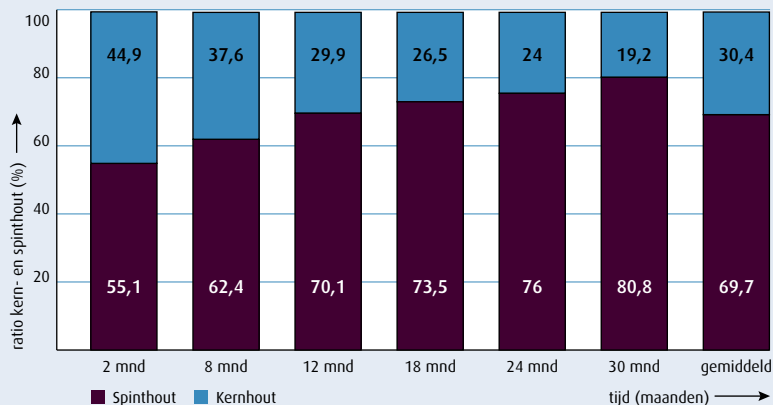
Figuur 3

Afname van de mate van infectie van houtrotschimmels op snoeiwonden na behandeling met T-15603.1. Significante verschillen tussen controles (control) en behandelde wonden \*P < 0,05; \*\*P < 0,001.



Figuur 4 Mate van herisolatie van T-15603.1 uit snoeiwonden die niet behandeld waren met houtrotschimmels.

A = suspensie 1, B = suspensie 2, C = suspensie 3.



Figuur 5 Herisolatie van T-15603.1 in % uit het spinhout (sapwood) en het kernhout (heartwood) van kunstmatig geïnoculeerde snoeiwonden. \*significant ( $P < 0,05$ ); \*\* sterk significant ( $P < 0,001$ ).

schimmels, maar niet behandeld met *Trichoderma*, vertoonden een gemiddelde infectiegraad van 78,8%. *Ganoderma adspersum* veroorzaakte de hoogste infectiegraad (81%), gevolgd door *P. squamosus* (79%) en *I. hispidus* (76%). Statistisch lieten alle schimmels een gelijk testresultaat zien. Analyse van afwijkingen gaf aan dat de behandeling van snoeiwonden met conidische suspensies van T-15603.1-kolonisatie door houtrotschimmels significant verminderde van 78,7% tot 13,9%, wat overeenkomt met een gemiddelde doelmatigheid van wondbehandeling van 82,3%. T-15603.1 had het hoogste effect (93,7%) op *I. hispidus*. Een overeenkomstige afname van infectie (91,1%) werd ook vastgesteld voor *G. adspersum*, maar de doelmatigheid tegen *P. squamosus* (62,4%) was beperkt.

Wonden werden in mindere mate gekoloniseerd na behandeling met suspensie 1 (32,5%) en suspensie 2 (29,1%), die hetzelfde gedrag vertoonden (Figuur 4). Tijdens de metingen was de mate van herisolatie van suspensie 3 altijd significant hoger dan die van controlewonden. Na 12 maanden konden geen verschillen worden vastgesteld tussen de behandeling van wonden met suspensie 2 en de controlewonden. Na 30 maanden werden er geen verschillen geconstateerd tussen de mate van isolatie met suspensie 1 en de controlewonden (Figuur 4).

De *Trichoderma*-stam T-15603.1 werd na 30 maanden geherisoleerd uit de behandelde wonden, na behandeling. De succesvolle kolonisatie van het wondoppervlak door T-15603.1 was in hoge mate afhankelijk van de gebruikte conidische suspensie. De mate van herisolatie van 74,8% die significant het hoogste was, werd verkregen na gebruik van conidische suspensie 3 (glucose + ureum + natriumpolyacrylaat) (Figuur 4).

T-15603.1 werd vaker geherisoleerd uit het spinhout

(69,7%) dan uit het kernhout (30,4%) (Figuur 5). Na twee maanden was de mate van herisolatie van T-15603.1 uit spinhout en kernhout even hoog, maar na acht maanden werd een significant verschil tussen beide waargenomen. Deze trend zette door, en na 18 maanden waren de verschillen zeer significant (Schubert et al. 2008c).

### Conclusies

De ontwikkeling van verkleurd hout kwam vaker voor bij wonden die geïnoculeerd waren met schadelijke houtschimmels en geen behandeling hadden ondergaan, dan bij wonden die behandeld waren met T-15603.1 (Schubert et al. 2008c). Zodoende verminderde de behandeling met T-15603.1 de ontwikkeling van dysfunctioneel hout aanzienlijk (Schubert et al. 2008c). Er werden geen verschillen in houtverkleuring geregistreerd voor de verschillende schadelijke houtschimmels. De resultaten die behaald werden met het afsluiten van wonden tonen aan dat schadelijke houtschimmels wondafsluiting negatief beïnvloeden. Er werd geen positief of negatief effect geregistreerd wat betreft houtvorming op wonden als gevolg van T-15603.1 (Figuur 6a en 6b). Behalve de boomsoort en de wondbehandeling, was ook de omvang van de wond van invloed op wondafsluiting.

De studies tonen aan dat de *Trichoderma*-stam T-15603.1 met succes gebruikt kan worden als biologische wondbehandeling tegen *I. hispidus* en *G. adspersum* in stadsgebieden. Behandeling vooraf van de wonden met T-15603.1 resulteerde in krachtige bescherming tegen schadelijke houtschimmels. Een significant doelmatigheidseffect van T-15603.1 werd gemeten voor de basidiomyceten *I. hispidus* en *G. adspersum* (90%), wat goed overeenkomt met de resultaten van de laboratoriumtests die een hoge sensitiviteit

## De vochtigheid van het hout en concurrentie met inheemse microflora kunnen niet gesimuleerd worden in een laboratorium



Figuur 6a) Volledig gesloten wond van *Populus nigra*, twee jaar na behandeling met *Trichoderma*.



Figuur 6b) Onbehandelde wond van *Tilia* die zichtbare houtafbraak vertoont na inoculatie met *Ganoderma adspersum*.

toonden voor T-15603.1 bij beide basidiomyceten. Een lager effect (62,4%) werd gemeten voor *P. squamosus*, wat goed aansluit bij de resultaten met de in-vitrostudies.

Optimale vestiging van *Trichoderma* in het houtsubstraat voordat kolonisatie door een wondparasiet heeft plaatsgevonden, is van groot belang voor een succesvolle wondbeschermingsbehandeling. De prestatie van *Trichoderma* kan worden verbeterd door de conidia in een inerte drager te suspenderen om adhesie en levensvatbaarheid te versterken. Conidia van T-15603.1, verrijkt met additieven in een gel die vochtigheid vasthoudt, verschaftte constante aanwezigheid van water en een grotere levensvatbaarheid van de conidia, zoals bleek uit de significant hogere herisolatiegraad in wonden die met deze suspensie waren behandeld (nr. 3). Zowel de toegenomen levensvatbaarheid als adhesie versterkten de vestiging van het biocontrole-middel, maar het houtsubstraat lijkt ook een beslissende factor te zijn. De mate van herisolatie was significant minder in kernhout. Shigo en Hillis (1973) onderzochten de specifieke eigenschappen van kernhout bij verschillende boomsoorten en beschreven het als een substraat met een lage vochtigheid en schimmelachtige eigenschappen, die kolonisatie door micro-organismen tegengaat. Zodoende is kolonisatie door T-15603.1 van grote wonden beperkt door de grotere proportie kernhout. Om de vestiging en biocontroledoelmatigheid te verbeteren, vooral bij snoeiwonden met een hoge kernhout-spinthoutverhouding, moet de formulering van conidiasuspensies dus nog wel worden geoptimaliseerd.

De mate van isolatie van natuurlijk optredende *Trichoderma* spp. op onbehandelde wonden in stadsgebieden is constant erg laag (4,5%). Hiervoor is nog geen verklaring, anders dan de veronderstelling dat de verspreidingsgraad

beperkt is door de afwezigheid van organisch materiaal in de boomspiegel, dat *Trichoderma* nodig heeft.

Wellicht bestaan er isolaten die nog effectiever en vasthoudender zijn dan T-15603.1. Daarom moet er gedegen onderzoek worden gedaan naar concurrerende stammen tegen gewone schadelijke houtschimmels. De toepassing van T-15603.1 op boomwonden maakt kolonisatie door schadelijke houtschimmels niet volstrekt onmogelijk. Bovendien kunnen het genotype en de virulentie van schadelijke houtschimmels afwijken van genotype en schimmels waarvan in deze studie verslag wordt gedaan. Misschien kan een mix van biocontrolestammen uitkomst bieden, die onder andere omgevingscondities meer bescherming zouden kunnen geven dan individuele biocontrolestammen (Meyer en Roberts 2002).

#### Beknopte bibliografie

- Gadgil, P.D. en A.D. Bawden, 1982. Infection wounds in Eucalyptus delegatensis. *New Zealand Journal of Forestry Science* 11:262-270.
- Metzler, B. 1997. Quantitative assessment of fungal colonization in Norway spruce after green pruning. *European Journal of forest Pathology* 27:1-11.
- Schubert, M., S. Fink en F.W.M.R. Schwarze, 2008a. Evaluation of *Trichoderma* spp. as a biocontrol agent against wood decay fungi in urban trees. *Biological Control* 45:11-123.
- Schubert, M., S. Fink en F.W.M.R. Schwarze, 2008b. In vitro screening of an antagonistic *Trichoderma* strain against wood decay fungi Part I. *Arboricultural Journal* (submitted).
- Schubert, M., S. Fink en F.W.M.R. Schwarze, 2008c. Field experiments to evaluate the application of *Trichoderma* strain (T-15603.1) for biological control of wood decay fungi in trees. Part II. *Arboricultural Journal* (submitted).
- Shigo, A.L. en W.E. Hillis, 1973. Heartwood, discolored wood, and microorganisms in living trees. *Annual Review of Phytopathology* 11:197-222.