Landbouwhogeschool-Wageningen
CENTRUM VOOR LANDBOUWKUNDIG ONDERZOEK IN SURINAME

WORTELROT VAN PINUS CARIBAEA MORELET
(onderzoekprojekt no. 69/1)

VOORTGEZET ONDERZOEK NAAR DE ETIOLOGIE, EPIDEMIOLOGIE EN ECOLOGIE VAN DE ZIEKTE

A. de Jager

Verslag van een onderzoek verricht onder leiding
van Dr. Th. Limonard

februari 1971

I N H O U D

	Blz.
1. Samenvatting.	5
2. Voorwoord	5
3. Inleiding	6
4. Etiologie	7
4.1. Inleiding.	7
4.2. Nieuwe isolaties	8
4.3. Beschrijving van de geïsoleerde schimmel	10
4.3.1. Makroskopisch	10
4.3.2. Mikroskopisch	11
4.4. Beschrijving van het ziektebeeld	11
4.4.1. Makroskopisch	11
4.4.2. Mikroskopisch	11
4.5. Zoeken naar de generatieve fase.	15
4.5.1. Fruktifikatieproef.	16
4.5.2. Isolaties uit vruchtlichamen. . .	16
4.6. Inokulaties.	16
4.6.1. Kontrole vroegere inokulaties . .	16
4.6.1.1. Jonge Pinusplanten . . .	16
4.6.1.2. Oudere bomen te Troeli .	17
4.6.2. Nieuwe inokulaties.	17
4.6.2.1. Inokulaties van oudere bomen.	17
4.6.2.2. Inokulatie van jonge Pinusplanten	19
5. Epidemiologie	19
5.1. Inleiding.	19
5.2. Opname der proefperken	20
5.3. Verwerking van de gegevens	20
6. Ecologie	28
6.1. Inleiding.	28
6.2. Abiotische faktoren.	28

Blz.

6.2.1. Temperatuur 30
6.2.2. Vocht 32
6.2.3. Benlate 32
6.3. Biotische faktoren. 33
6.3.1. Antagonisme 33
6.3.2. Mycorrhiza 34
7. Bespreking 35
8. Literatuur 36

1. SAMENVATTING

Door VAN DER HOEVEN (1969) werd een oriënterend onderzoek verricht naar de etiologie, epidemiologie en ecologie van een wortelrot van Pinus caribaea in Suriname. De schrijver zette dit onderzoek voort gedurende de periode april- oktober 1970. Hierbij werden de resultaten van VAN DER HOEVEN (1969) nader bevestigd en aangevuld met een aantal nieuwe gegevens.

Bij het maken van nieuwe isolaties van de reeds eerder geïsoleerde Pinuswortelrotschimmel, die als het vermoedelijke pathogeen wordt beschouwd, kon ditmaal gebruik worden gemaakt van een goed selektief medium (moutagar 50 ppm benlate). De Pinuswortelrotschimmel bleek namelijk hoge koncentraties vanndit fungicide goed te kunnen verdragen in tegenstelling tot Trichoderma spp., die voordien veel moeilijkheden veroorzaakten. Isolaties uit in het bos gevonden vruchtlichamen leverden opnieuw geen identieke schimmelkolonies. Daar ook de pogingen om de schimmel in reinkultuur tot fruktifikatie te brengen tot nu toe faalden kan de schimmel nog steeds niet nader worden geïdentificeerd.

Van ziek wortelmateriaal werden coupes gemaakt die aantoonden dat het mycelium vooral in de bast groeit. De schimmel kan de celwand doorboren en zo in de cel groeien.

Beschreven werden verder enkele nieuwgeziene strukturen, zoals hyfezwellingen, en knop en kluwenvormingen. Van de geïnokuleerde bomen vertoonde nog geen enkele de typische symptomen. Nieuwe inokulaties werden uitgevoerd.

In de epidemiologische proefperken werden de zesde, zevende en achtste opname verricht. Het bleek dat de uitbreidingssnelheid van de ziekte in de periode tussen de vierde en de achtste opname beduidend minder was geweest dan die tussen de eerste en vierde opname. De bomen die waren gestorven tussen de eerste en de achtste opname van de proefperken en die ten tijde van de eerste opname nog volledig gezond waren, bleken gemiddeld binnen acht maanden gestorven te zijn.

De optimumtemperatuur voor de groei van de schimmel op moutagar ligt dicht bij de 30°C, de minimumtemperatuur waarbij nog groei optreedt ligt bij 10°C. Bij 35°C vindt nog enige, bij 40°C nauwelijks meer groei plaats.

De resultaten van de eerdere proeven, waaruit een grote gevoeligheid voor antagonisme bleek, werden bevestigd. Uit proeven waarin de nadruk gelegd werd op groei door niet steriele grond, bleek wel enige uitgroei, doch alleen in grond arm aan mikroörganismen. De Pinuswortelrotschimmel bleek goed tegen uitdroging te kunnen.

2. VOORWOORD

Dit rapport betreft een onderzoek naar Pinuswortelrot in Suriname. Het werd voor een deel uitgevoerd aan het Centrum voor Landbouwkundig Onderzoek in Suriname en voor een deel in de Pinuskultures van 's Lands Bosbeheer door A. de Jager, student in de bosbouw aan de Landbouwhogeschool.

Wageningen, ter vervulling van zijn praktijktijd van april-oktober 1970. Het onderzoek stond onder leiding van Dr. Th. Limonard vanuit het Laboratorium voor Fytopathologie te Wageningen.

3. INLEIDING

Onderzoek dat ten doel heeft een organisme aan te tonen dat verantwoordelijk is voor een bepaalde ziekte, blijkt soms zeer langdurig te zijn. Zo wordt al tientallen jaren gezocht naar de oorzaak van floëemnekrose van koffie, doch men kan nog niet meer dan een vermoeden uitspreken dat men te doen heeft met een flagellaat (VERMEULEN, 1968). Het kan daarom nodig zijn bepaalde proeven steeds weer opnieuw te doen in de hoop op een uiteindelijk resultaat. Om deze reden zullen in het nu volgende verslag enkele proeven vermeld worden die al eerder uitgevoerd en beschreven zijn. Ook het feit dat in eerder onderzoek een aantal proeven afgebroken werden, is oorzaak dat deze opnieuw aangezet moesten worden.

In het nu volgende worden duidelijkheidshalve kort enkele feiten aangestipt, die ook van der HOEVEN in zijn inleiding geeft.

Een vijftiental jaren geleden werd in Suriname een begin gemaakt met de aanplant van een tropische houtsoort die hier niet van nature voorkomt, nl. Pinus caribaea Morelet. Hiervan worden drie variëteiten onderscheiden, hondurensis, bahamensis, en caribaea, waarvan vooral de eerste aangeplant wordt. Het natuurlijke verspreidingsgebied ligt tussen de 12e en de 26e breedtegraad. Tot op heden werd ± 7000 ha aangeplant met momenteel als belangrijkste produktiedoel zaaghout. De pulpindustrie Weyerhaeuser overweegt de aanplant van ongeveer 100.000 ha in samenwerking met de Surinaamse regering. Deze enorme schaalvergroting maakt uiteraard ook een goede verpleging veel belangrijker.

Naast een naaldziekte en een ziekte waarbij gehele takken en boomtoppen afsterven komt in deze Pinusopstanden vooral een ziekte voor gekenmerkt door rot van het wortelstelsel. Dit laatste wordt sinds 1961 waargenomen onder verschillende omstandigheden en op verschillende plaatsen, zoals Powakka, Coesewijne, Blakawatra en vooral Zanderij.

Deze wortelrotziekte is voor zover bekend tot nu toe nog niet waargenomen binnen het natuurlijke verspreidingsgebied van Pinus caribaea (ETHERIDGE, 1968). Voor het optreden ervan kunnen twee mogelijke faktoren aangewezen worden die wellicht samen de predispositie van de bomen bepalen. In de eerste plaats kan Pinus caribaea als exoot gekonfronteerd worden met een nieuw pathogeen waar de soort geen duidelijke resistentie tegen bezit, en in de tweede plaats is het mogelijk dat de omstandigheden buiten het natuurlijke verspreidingsgebied niet optimaal zijn en de konditie van de boom zo verzwakken dat een zwakteparasiet die wellicht ook in het natuurlijke verspreidingsgebied voorkomt nu de kans krijgt tot aantasting.

Tijdens eerder onderzoek werd uit bomen met de typische ziektesymptomen vaak een basidiomyceet geïsoleerd, die in zijn beschrijving veel gelijkenis vertoont met een isolaat afkomstig uit Trinidad (PAWSEY, 1970) en een isolaat uit Brazilië (CARDOZO MAY in PAWSEY, 1970). Verder werd de ziekte waargenomen in Frans Guyana (VAN DER HOEVEN) en Jamaica (PAWSEY, 1970). Het isolaat van PAWSEY behoorde volgens Nobles waarschijnlijk tot het rigidoporus complex van de familie van de Polyporaceae. Daar het vruchtlichaam nog onbekend is, is verdere determinatie onmogelijk. Het vermoeden bestaat dat de Pwr-schimmel (=Pinuswortelrot-schimmel) aanwezig is in de oorspronkelijke vegetatie doch hij is hier nog niet aangetroffen.

Het onderzoek is gesplitst in een etiologisch, een epidemiologisch en een ecologisch deel. Etiologie is de leer van de ziekteoorzaken, de epidemiologie bestudeert het verloop van de ziekte, terwijl de ecologie de milieu-faktoren bestudeert die van invloed zijn op de ontwikkeling van het pathogeen.

4. ETIOLOGIE

4.1. INLEIDING

Als we aannemen dat de ziekteverwekker met redelijke zekerheid aangewezen is, wordt het belangrijk om de verdeling ervan na te gaan zowel binnen een aangetaste boom, als in de gehele aangetaste opstand. Verder is de eventuele aanwezigheid van deze schimmel in dode dan wel levende bomen uit de oorspronkelijke begroeiing van belang. Voor het optreden van het pathogeen zijn namelijk twee verklaringen mogelijk:

1. De schimmel komt van nature in de inheemse vegetatie voor.
2. De schimmel is ingevoerd mét materiaal van Pinus caribaea.

Als (1) waar is, dan moet het mogelijk zijn uit andere plantesoorten isolaten te verkrijgen van het vermoedelijke pathogeen.

Om het isoleren te vergemakkelijken werd gebruik gemaakt van een nieuw selectief medium met het fungicide benlate.

Een makroskopische beschrijving van de schimmel in reinkultuur en van het aantastingsbeeld vond reeds plaats. Nu een mikrotoom beschikbaar was, werd het ook mogelijk coupes te maken van aangetast materiaal.

Omdat men voor de identifikatie van basidiomyceten noodzakelijkerwijs over vruchtlichamen moet beschikken, werden in vroeger onderzoek pogingen ondernomen om de Pwr-schimmel tot fruktifikatie te brengen. Deze pogingen werden voortgezet.

4.2. NIEUWE ISOLATIES

Isolaten werden verkregen uit de wortelschros, diep uit het wortelhout, uit levende wortels die nog harsten, uit recent afgestorven wortels en uit half vergane wortels.

Bij het maken van isolaties van de Pwr-schimmel kon gebruik worden gemaakt van een nieuw selektief medium. Dit bestond uit moutagar met 50 ppm benlate. De Pwr-schimmel bleek namelijk zeer hoge koncentraties van dit fungicide te tolereren, terwijl Trichoderma spp. reeds bij 5 ppm niet meer uitgroeien (BOLLEN & FUCHS, 1970). Het waren juist deze Trichoderma spp. die bij het isoleren de grootste moeilijkheden veroorzaakten en uitgroeien van de Pwr-schimmel op andere media verhinderden (zie 6.2.3.).

Per schaal werden ongeveer vijf stukjes hout uitgelegd, indien mogelijk in de vorm van dunne houtsplinters (GRANT, 1964). Per isolatieplaats werden vijf tot tien schalen gebruikt. Het verzamelde materiaal werd altijd eerst afgespoeld en vervolgens na drogen afgenomen met alkohol 96%. Met geflambeerd mes en pincet werd de bovenste laag weggesneden, waarna uit het blootgelegde hout vezels werden losgeprepareerd en uitgelegd. Soms werden ook deze nog behandeld hetzij met alkohol hetzij met Na-hypochloriet. Alle bomen op één na waaruit geïsoleerd werd, bevonden zich in of rond een haard in vak 12 van de houtvesterij Zanderij. De ene uitzondering betrof een afgestorven exemplaar in vak 24 te Blakawatra. De konklusie dat de Pwr-schimmel aanwezig was, werd pas getrokken, nadat de meest typische kultuurkenmerken verschenen waren, n.l. de crème-bruine korstvorming, en de bruine verkleuringszone op moutagar met tannine (VAN DER HOEVEN, 1969).

De Pwr-schimmel kon uitsluitend uit zieke Pinuswortels worden geïsoleerd. Hierop was één uitzondering; dit betrof een isolatie uit de wortel van een bospapaja; welke wortel tegen een Pinuswortel was aangegroeid die aangetast was. Weliswaar werd geïsoleerd uit levend weefsel (callus), doch vanwege de zeer dichte nabijheid van de aangetaste Pinuswortel verliest dit gegeven aan betekenis.

Uit bijna alle onderzochte Pinusbomen werd de Pwr-schimmel verkregen. Hierbij waren naast dode en zieke ook nabij ziektehaarden groeiende, uiterlijk nog gezonde bomen. Slechts isolaties uit wortels die er gezond uitzagen leverden geen sukses op.

Behalve uit Pinusbomen werd ook geprobeerd isolaties te maken uit wortels en stamdelen van dode en levende bomen uit de oorspronkelijke vegetatie. Tevens werd schimmelmateriaal uit de omgevind van aangetaste wortels van P. caribaea uitgelegd. Het betrof hier vooral rhizomorfen, welk soms in grote massa voorkwamen, en rottende resten van de vroegere vegetatie. In geen enkel geval werd de Pwr-schimmel geïsoleerd.

Kontakt van Pinuswortels met dode wortels van de vroegere vegetatie werd een enkele maal waargenomen.

Tabel 1. Lijst van Pinusbomen waaruit getracht werd de Pwr-schimmel te isoleren (no. 1 te Blakawatra, nos. 2-9 te Zanderij)

No.	Lokatie v.d. boom	Toestand v.d. boom (symptomen)	Resultaat v. isolatie
1.	haard in vak 24	bovengronds: dood ondergronds: dood	+
2.	aan de rand v.e. haard in vak 12	bovengronds: top lichtgeel, stambasis harst ondergronds: wortelhals harsend mycelium over wortels, uiteinden der wortels dood	+
3.	als 2	bovengronds: onderin de kroon verbruinend ondergronds: myceliumgroei over wortels	+
4.	naast 3	bovengronds: geen symptomen ondergronds: " "	-
5.	in haard in vak 12 tussen twee dode bomen	bovengronds: kroon geelbruin ondergronds: wortelhals verrot, wortels harsend en overdekt met mycelium	+
6.	als 2	bovengronds: dood ondergronds: vermolmd	+
7.	naast 6	bovengronds: geelbruine kroon ondergronds: veel mycelium op de wortels	+
8.	naast 7	bovengronds: geen symptomen ondergronds: " "	-
9.	als 2	bovengronds: geen symptomen ondergronds: wortels sterk harsend, enige myceliumgroei op wortels	+

Tabel 2. Lijst van bomen van de oorspronkelijke vegetatie te Zanderij, waaruit isolaten verricht werden

No.	Lokatie v.d. boom	Toestand v.d. boom	Resultaat v.d. isolatie
1.	naast boom no. 9 in tabel 1	bospapaja, gezond	+
2.	naast boom no. 5 in tabel 1	dood	-
3.	in een haard in vak 12	dood, rottend	-
4.	in een haard in vak 12	vlinderbloemige boom, gezond	-

4.3. BESCHRIJVING VAN DE GEÏSOLEERDE SCHIMMEL

4.3.1. Makroskopisch

Voor een beschrijving van de geïsoleerde schimmel in reinkultuur, op moutagar, wordt verwezen naar VAN DER HOEVEN (1969). Toegepast werd toen ook de Bavendamm toets, waarbij de schimmel geënt wordt op een medium, dat tannine of galluszuur bevat. Een bruine diffusiezone duidt op de aanwezigheid van laccase, een extracellulair enzym. Dit is een belangrijke eigenschap, en wel zó belangrijk, dat dit al een van de eerste keuzemogelijkheden is in de determinatietabel van NOBLES (1965). Aanwezigheid van dit enzym is gekorreleerd met witrot, afwezigheid ervan met bruinrot. NOBLES (1965) vond dat men met behulp van een alcoholische oplossing van guaiac hars (0,5 gram in 30 ml 95% EtOH) de aanwezigheid ervan ook heel eenvoudig kan vaststellen. Hierbij wordt een druppel op het mycelium gelegd. Indien laccase aanwezig is treedt blauwkleuring op. Voor de Pwr-schimmel viel deze toets steeds positief uit. De tijd nodig voor een diepe blauwe verkleuring van de gehele plek die in kontakt was met de oplossing, bedroeg gemiddeld over 25 waarnemingen ± 40 sekonden.

4.3.2. Mikroskopisch

Zoals ook in NOBLES' beschrijving voorkomt (PAWSEY, 1970) vertoont het mycelium bijna geen gespen. Naast de andere, reeds bij eerder onderzoek beschreven strukturen, werden nog een drietal kenmerken gevonden:

1. hyfezwellingen of "hyphal swellings". Deze bevinden zich bijna altijd aan de top van een hyfe, in de groeizone. Soms echter wordt een dergelijke struktuur ook in ouder mycelium of midden in een hyfe gevonden. De inhoud kleurt duidelijk met katoenblauw. Zie figuur 1.
2. kluwens. Na enkele weken vormen zich kluwenachtige strukturen (begin van pseudoparenchymvorming?); zie figuur 2.
3. knopvorming. Eveneens in ouder mycelium kan men altijd aan hyfen uit de pseudoparenchymatische laag in grote hoeveelheden uitstulpingen waarnemen. Zie figuur 3.

4.4. BESCHRIJVING VAN HET ZIEKTEBEELD

4.4.1. Makroskopisch

Als samenvatting van wat al eerder hierover geschreven is, kan worden opgemerkt dat een aantal ondergrondse symptomen tenslotte hun uitdrukking vinden in een vrij egale verkleuring van de kroon, van groen via geel naar bruin, resulterend in de dood van de boom.

Deze ondergrondse symptomen zijn, vermoedelijk achtereenvolgens myceliumgroei over en in de wortel (vooral schors), harsen van de wortel, verkleuring van de bast tot rozerood, harsen van de stamvoet en afsterving van de wortel. De afsterving van de wortel begint meestal op vele meters van de wortelhals, dáár waar het wortelkontakt met buren mogelijk wordt. In één geval werd een dood exemplaar aangetroffen, waarvan de wortels doorgerot waren aan de wortelhals. Verder van de boom zagen sommige wortels er nog gezond uit (boom 5 in tabel 1).

4.4.2. Mikroskopisch

Ter bestudering van de schimmel, groeiend in het hout, werden stukjes uit Pinuswortels gesneden op plaatsen waar de Pwr-schimmel geïsoleerd werd. Met behulp van een mikrotoom werden van deze stukjes coupes gemaakt, zowel dwars, radiaal als tangentiaal. De dikte der coupes kon gevarieerd worden van 10 tot 25 mu.

Methode (volgens SASS, 1951)

De kubusvormige houtblokjes met ribben van drie tot vier mm, worden eerst een dag ter fixatie weggezet in een; FAPA-oplossing, in kleine flesjes met een inhoud van ongeveer 3 ml.

FAPA is een mengsel bestaande uit een viertal komponenten. Bij een volume van 100 ml is de samenstelling als volgt: 95% alkohol 50 ml, propionzuur 5 ml, formaline 10 ml, water 35 ml.

In dit mengsel worden de blokjes ontlucht in een exsiccator. Vervolgens worden de blokjes door een reeks oplossingen gevoerd, waarbij het water en tenslotte ook de alkohol geleidelijk vervangen wordt door tertiaire butylalkohol (TBA). De blokjes komen dus uiteindelijk terecht in zuivere TBA, een goed oplosmiddel voor paraffine.

De blokjes in TBA worden nu overgebracht in tablet-buizen, afgesloten door een kurk. Nu wordt voldoende paraffine toegevoegd om in gesmolten toestand de houtblokjes geheel te omgeven. Deze lost op in de TBA en penetreert zo de cellen van het hout. Nadat dit proces zich voltrokken heeft, wordt in de stoof bij 65°C, de kurk van het buisje verwijderd zodat alle TBA vrij kan verdampen, waarna de paraffine overblijft met het hout. De blokjes worden daarna overgebracht in een stollingsbakje met vloeibare paraffine, met de te snijden zijde boven, en na vorming van een stollingsvliesje ondergedompeld in water. De paraffine stolt nu snel, krimpt, en komt boven drijven.

Hierna worden trapeziumvormige blokjes uit de paraffine gesneden. Het grote benedenvlak wordt vastgesmolten aan een snijtafeltje dat in de juiste snijpositie t.o.v. het mes gebracht wordt. Na het snijden worden de coupes in twee rijen uitgelegd op objektglazen, welke tevoren ingesmeerd zijn met een weinig eiwitglycerine. Vervolgens worden deze objektglazen op een strekplaat gelegd met een temperatuur van 45°C. Aan de coupes wordt druppelsgewijs water toegevoegd waarna deze zich strekken. De coupes worden daarna twee dagen te drogen gelegd in een stoof bij 45°C.

Kleuring

Voorafgaande aan de kleuring werden de objektglazen in kleuringsbakjes met xyleen geplaatst, zodat de paraffine oplost. In totaal werden vier kleuringen geprobeerd. Deze zijn alle gericht op een tegenkleuring van mycelium t.o.v. lignine en cellulose. De kleuringen zijn (zie GURR, 1965):

1. safranine-fast green
2. safranine-anilineblauw
3. safranine-katoenblauw
4. picro-anilineblauw.

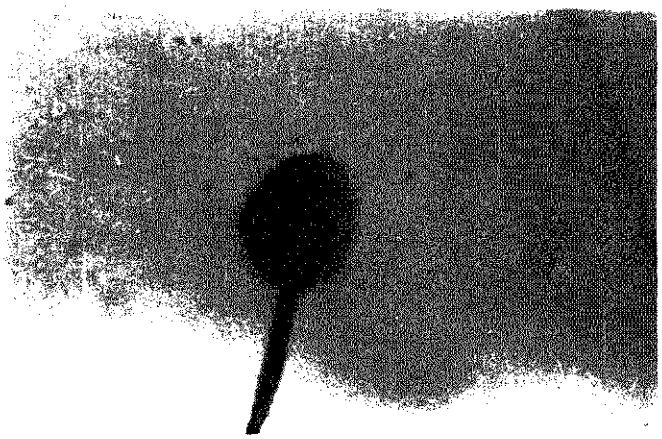


Fig. 1. Hyfezwellingen ("hyphal swellings")

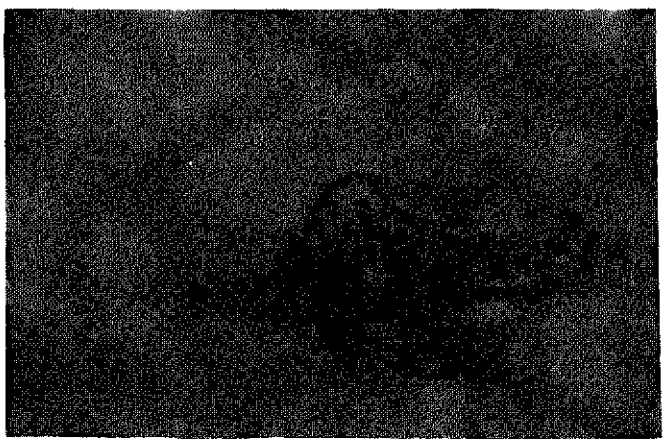


Fig. 2. Kluwenachtige structuren der hyfen

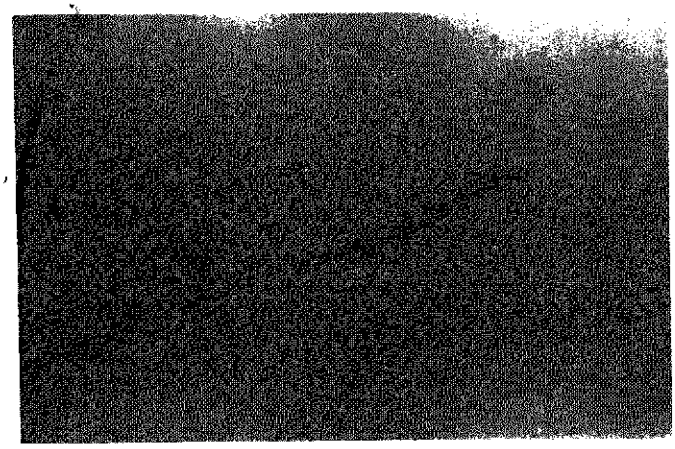


Fig. 3. Uitstulpingen aan hyfen uit de pseudoparenchymatische laag



Fig. 4. Intracellulair groeiende hyfen van de Pwr-schimmel in Pinushout

Ook werd gepoogd het mycelium met enkelvoudige kleuringen zichtbaar te maken, namelijk met katoenblauw en anilineblauw. Bij het kleuren deden zich met de tangentiale en radiale coupes grote moeilijkheden voor, doordat vele coupes afspoelden. Na veel proberen werd gevonden, dat overvloedig water toedienen tijdens de strekking en zeer voorzichtig spoelen ("doorvoeren") het afspoelen gedeeltelijk kunnen tegengaan. Behalve dwarscoupes spoelen dunnere radiale en tangentiale coupes minder snel af daar ze beter strekken en minder krimpverschijnselen (kromtrekken) vertonen; 10 of 15 mu is hier de aanbevolen dikte.

Resultaten

In geen enkel geval werd een duidelijke tegenkleuring van het mycelium bereikt. In alle gevallen werden de hyfen óók rood gekleurd door de safranine, onverschillig de duur van de tegenkleuring. Wel was dit rood iets lichter dan van het cellulose, maar er was geen blauwkleuring. Bij de enkelvoudige kleuringen met katoenblauw en anilineblauw werd naast het mycelium ook het houtmateriaal blauwgekleurd zodat ook hier geen duidelijk onderscheid optrad. Opvallend was dat hoofdzakelijk de tangentiale coupes mycelium vertoonden. Evenals bij de radiale en soms bij de dwarscoupes bevond dit mycelium zich hoofdzakelijk in de bast. Dwarscoupes gaven zelden mycelium te zien; het beste voldeed hier een dikte van 25 mu. Ook in de tracheïden van het hout werden hyfen aangetroffen, doch meestal dicht bij de bast. De hyfen zijn meer gedrongen dan in reinkultuur. Ze groeien duidelijk intracellulair (fig. 4.) en versmallen daar waar de celwand doorboord wordt. De dikte van het mycelium bedraagt gemiddeld 3,9 mu; daar waar een hyfe de celwand penetreert is zijn dikte gemiddeld de helft hiervan.

4.5. ZOEKEN NAAR DE GENERATIEVE FASE

Voor determinatie is bijna steeds de generatieve fase nodig. Twee wegen kunnen leiden tot identifikatie van het vruchtlichaam:

1. induceren van de vorming van vruchtlichamen in reinkultuur
2. isolaties uit vruchtlichamen bij voorkeur op terreinen waar de Pwr-schimmel voorkomt.

4.5.1. Fruktifikatie proef

Deze proef werd opgezet volgens de methode van TAMBLYN & DA COSTA (1958) als beschreven door VAN DER HOEVEN (1969). Ondanks algemene verontreiniging van de kolven met verrijkt zaagsel door Trichoderma, waardoor veel tijd verloren ging, kon de proef toch nog vrij volledig uitgevoerd worden. Ten tijde van mijn vertrek uit Suriname (7 weken nadat de houtblokken doorgroeid waren met de Pwr-schimmel) hadden zich nog geen vruchtlichamen gevormd.

4.5.2. Isolaties uit vruchtlichamen

Uitgaande van de veronderstelling, dat we hier te maken hebben met een soort behorend tot de familie der Polyporaceae, werden uitsluitend isolaties verricht uit soorten behorend tot die familie. Van een dertigtal schimmels werden isolaten verkregen, waarvan slechts één (Polyporus cinnabarina) een mycelium bezat, dat veel op dat van de Pwr-schimmel leek. Het onderscheidde zich daarvan echter door de snellere groei, door de regelmatige aanwezigheid van gespen en door pigmentering. Sommige vruchtlichamen waaruit geïsoleerd werd kwamen ook op dode Pinus bomen voor. Dit was o.a. het geval met P. cinnabarina.

4.6. INOKULATIES

4.6.1. Kontrole vroegere inokulaties

Inokulaties waren reeds verricht zowel aan kiemplanten als aan oudere bomen. De geïnoculeerde jonge boompjes bevonden zich op het CELOS-terrein. De bomen welke behandeld waren bevinden zich te Troeli, een verlaten kwekerij van 's Lands Bosbeheer.

4.6.1.1. Jonge Pinus planten

Bij schoonspoelen van het wortelstelsel van door VAN DER HOEVEN (1969) met ziek wortelmateriaal geïnokuleerde planten, bleek zich vooral op de hoofdwortels een wit mycelium te bevinden, in sommige gevallen over de kleinere vertakkingen spreidend. Op sommige plaatsen harsten de wortels. Deze schimmel werd geïsoleerd en bleek een basidiomyceet te zijn, doch niet de Pwr-schimmel. Waarschijnlijk betreft het hier Telephora terrestris, waarvan vruchtlichamen gevonden waren op het inokulum. Het mycelium op de wortels sloot ook aan bij de inokula. Zie verder 6.3.2.

4.6.1.2. Oudere bomen te Troeli

Inokulaties waren verricht met drie soorten inokulum, nl. verrijkt zaagsel, schaafkrullen en houtblokken. Het zaagsel werd gebracht in boorgaten; de beide andere typen werden tegen de wortel gelegd en overdekt met plastiek onder zo steriel mogelijke omstandigheden.

Tijdens drie kontroles in de loop van zes maanden, mei t/m oktober, werd geen enkele geïnokuleerde boom aangetroffen, welke voor wortelrot typische symptomen vertoonde. Wel was er tijdens de laatste kontrole (medio oktober) een drietal bomen dat er verdacht uitzag. Twee maakten een iets vergelende indruk, één vertoonde onderin de kroon enkele afgestorven takken.

Bij bomen welke geïnokuleerd waren met houtblokken was duidelijk myceliumgroei vanuit de blokken over de wortels waar te nemen, al ging deze groei nog niet verder dan enkele centimeters. Vanwege allerlei onvoorziene omstandigheden is het niet tot isolatiepogingen uit wortels van geïnokuleerde bomen gekomen.

4.6.2. Nieuwe inokulaties

Nieuwe inokulaties werden verricht zowel aan oudere bomen als aan jonge planten van Pinus caribaea, ook weer resp. te Troeli en op het CELOS-terrein.

4.6.2.1. Inokulaties aan oudere bomen

Te Troeli werden in totaal nog 16 bomen geïnokuleerd, nl. 6 bomen door middel van doorgroeide houtblokken op 26 augustus, en 10 bomen met doorgroeid verrijkt zaagsel in boorgaten op 15 oktober.

Inokulatie 26 augustus, d.m.v. houtblokken

De gebruikte houtblokken waren 18 mei geënt met de Pwr-schimmel, en ten tijde van gebruik goed doorgroeid.

De houtblokken waren verkregen door van levende Pinustakken met een diameter van 4-6 cm ongeveer 6 cm lange segmenten te zagen. Overlangs werd een strook afgesneden, om met het aldus ontstane - min of meer platte - vlak een betere aansluiting te verkrijgen op de te inokuleren wortel. De houtblokken werden gesteriliseerd met epoxypropaan, in plastiek zakken. Na een dag afgesloten te hebben gestaan werden de zakken in een steriele kast ontlucht. Vervolgens werden de blokken overgebracht in steriele jampotjes, welke 20 minuten bij 120°C geautoclaveerd waren. In de deksels ervan was een gat geboord, waarin vóór autoclaveren een watteprop gedaan werd. Bij potten zonder deksel werd aluminiumfolie gebruikt om de potten steriel af te sluiten, eveneens met een gat erin, afgesloten door een watteprop. Aan de potten met houtblokken werd 10 ml steriel water toegevoegd.

De blokken werden geïnokuleerd met enkele ponsjes van een kultuur van de Pwr-schimmel op moutagar en vervolgens weggezet in een donkere kast. De temperatuur varieerde van 35°C overdag tot 27°C 's nachts.

Na twee weken waren alle blokken overgroeid met de schimmel, behoudens enkele gevallen waarin verontreiniging optrad met o.a. Mucorales. Later werden deze bijna steeds verdrongen door de Pwr-schimmel. Een Trichoderma verontreiniging werd verdrongen door toevoegen van benlate. Steeds als het water verdampt was werd weer nieuw steriel water toegevoegd.

De inokulatie zelf geschiedde als volgt. Van de te inokuleren bomen werden de wortels, vooral de basis, geheel rondom blootgelegd. Vervolgens werden deze wortels schoongeborsteld en bespoten met een oplossing van benlate, 50 ppm. De houtblokken werden tegen de wortel aangebonden en afgedekt met plastiek waarna het geheel weer omgeven werd met zand dat doordrenkt werd met benlate oplossing. Kontrôles werden niet gemaakt.

Inokulatie 15 oktober d.m.v. zaagsel

Het verrijkte zaagsel (zie VAN DER HOEVEN, 1969) waarmee geïnokuleerd werd was 25 augustus geënt met de Pwr-schimmel en uitstekend daarmee doorgroeid. In feite was het reeds 18 mei geënt, doch het bleek later geheel verdroogd, zodat opnieuw bevochtigen en autoclaveren nodig was.

Van de te inokuleren bomen werden worteldelen blootgelegd, schoongeborsteld en afgenomen met alkohol. Met een houtboor werden gaten ter diepte van 3-4 cm en met een doorsnede van ongeveer 2 cm in de wortelhals geboord. Met een geflambeerd lepeltje werd vervolgens het zaagsel overgebracht in het boorgat, dat tenslotte afgedekt werd. Van vier bomen werden de boorgaten afgedekt met parafilm en vaseline. Bij zes bomen werden de boorgaten afgesloten met de boorkrullen afkomstig uit dat gat, doordrenkt met een 500 ppm benlate oplossing in water. Bij alle tien bomen werd de blootgelegde wortel afgedekt met zand, dat eveneens werd doordrenkt met benlate oplossing. Van elke boom werden drie wortels geïnokuleerd en indien minder wortels aanwezig waren werd ook de stambasis geïnokuleerd. Kontrôles werden niet gemaakt.

4.6.2.2. Inokulaties aan kiemplanten

Van het LBB werden 200 jonge Pinus plantjes ontvangen met een lengte van 5 cm. Als inokulum werden houtblokjes ter grootte van 3 x 1 x 1 cm gebruikt. Deze blokjes werden op de zelfde wijze als beschreven in 4.6.2.1. geïnokuleerd (24 augustus). Het inokulum verkeerde ten tijde van de inokulatie in uitstekende staat.

Vóór de inokulatie werden de planten mét kluit overgebracht in multipotplaten, 24 potten per plaat, waarvan de potten verlengd werden met geplastificeerde kartonnen bekers, waar de bodem uit verwijderd was. Hierdoor werd een betere wortelontwikkeling gedurende de proef gewaarborgd. Er werd op twee plaatsen geïnokuleerd, namelijk:

1. de wortelhals, met de blokjes 3 x 1 x 1 cm;
2. de stengel, met en zonder verwonding. Het inokulum werd hier tegen de stengel gebonden, omgeven door een natte watteprop, en omwikkeld met plastiek om uitdroging te voorkomen.

De inokulaties werden uitgevoerd op 25 september volgens het onderstaande schema:

ad 1.: a) inokulatie - 48 potten
b) kontrole - 24 potten
c) inokulatie + benlate - 48 potten
d) kontrole + benlate - 24 potten

ad 2.: a) inokulatie zonder verwonding - 12 potten
b) kontrole - 12 potten
c) inokulatie met verwonding - 12 potten
d) kontrole met verwonding - 12 potten

De benlate oplossing werd bij de eerste serie tweemaal toegediend, nl. ten tijde van de inokulatie en een week later, per plaat steeds 50 ml van een suspensie van 20 ppm.

Vijf weken na de inokulatie waren slechts twee kontrole plantjes (1b) doodgegaan, alle andere plantjes zagen er nog gezond uit.

5. EPIDEMIOLOGIE

5.1. INLEIDING

Teneinde een inzicht te krijgen in de snelheid en wijze van uitbreiding van het Pinus wortelrot, werden door LEMCKERT (1969) een vijftiental proefperken aangelegd. VAN DER HOEVEN (1969) geeft hiervan een duidelijke beschrijving. Uit zijn gegevens blijkt reeds dat de ziekte zich haardvormig uitbreidt en dat kontakt van Pinuswortels onderling en met resten van de oorspronkelijke begroeiing voorkomt. Dit laatste ondersteunt de gedachte dat de wortelrotschimmel afkomstig is uit de oorspronkelijke vegetatie en dus ter plaatse thuis hoort.

Verder zij nog ongemerkt, dat omvangrijke haarden vooral gesitueerd zijn in oudere, d.w.z. 10-15 jarige opstanden, doch dat sterke aantasting en uitbreiding van de ziekte ook plaats kan vinden in jongere, zelfs tweejarige opstanden (zie figuur 5 en 6).

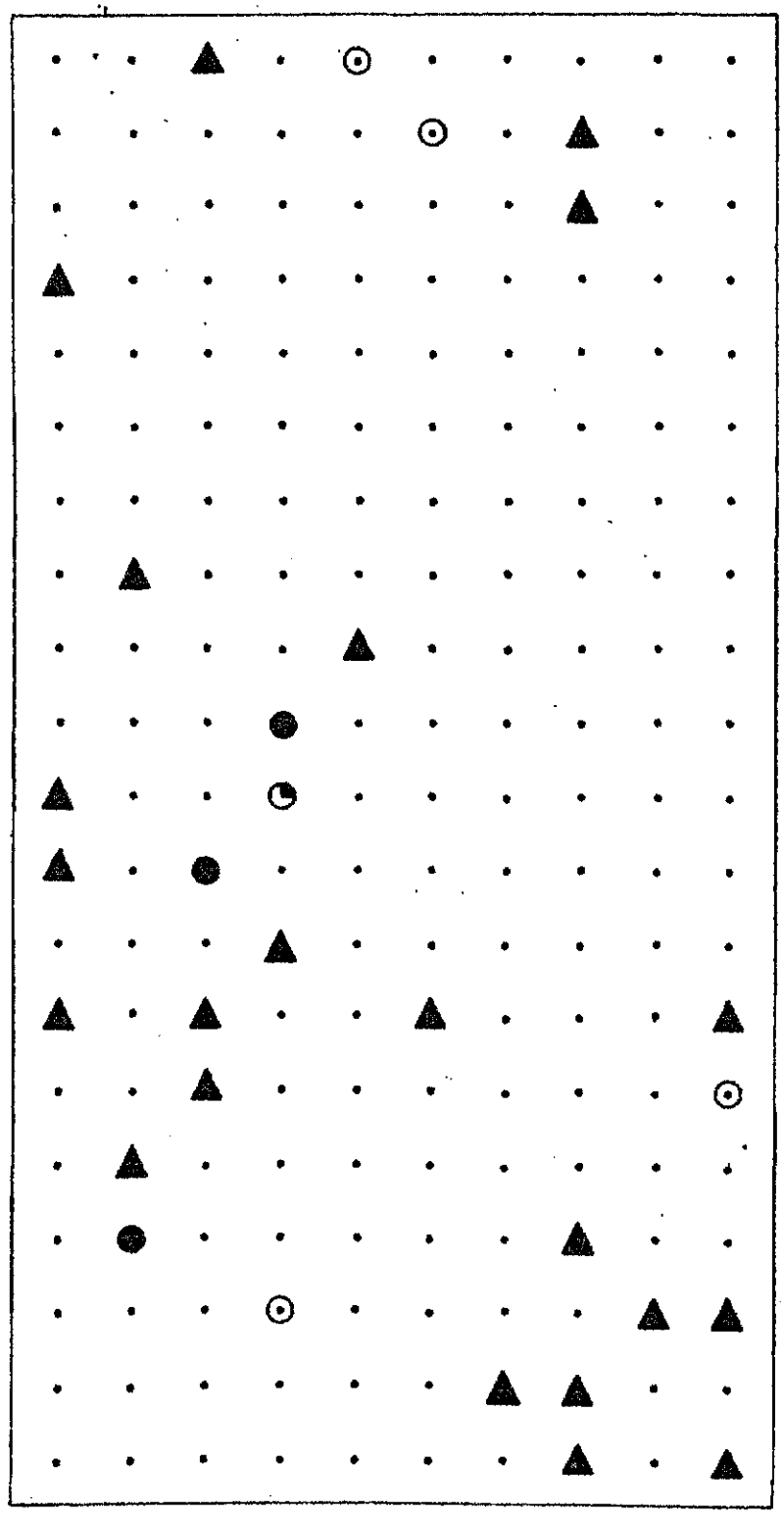
In een vak te Zanderij, waar zich thanseen grote haard bevindt, is destijds een ontginningswijze toegepast, waarbij grote bomen niet omgedozerd werden, doch slechts vergiftigd. Als gevolg hiervan bleef een aanzienlijke hoeveelheid organisch materiaal achter in de bodem. Het is mogelijk dat de wortels gekoloniseerd werden door de Pwr-schimmel waarna deze over kon gaan op "eraan voorbij" groeiende Pinuswortels. Wortelvergroeiingen van Pinusbomen onderling bieden dan mogelijkheden tot verder uitbreiding van de schimmel.

5.2. OPNAME DER PROEFPERKEN

De opname der proefperken geschieden ongeveer driemaandelijks. Gelet wordt hierbij slechts op de typische symptomen van de wortelrotziekte, te weten een vrij egale verkleuring der naalden, beginnend met lichtgroen en via geel lopend naar bruin. Er worden vijf fasen onderscheiden n.l. lichtgroen, geelgroen, geel, geelbruin en bruin (= dood). De afkortingen zijn achtereenvolgens LG, GG, G, GB en B. Verdwenen bomen worden aangegeven door een x. Een moeilijkheid vormt de subjektiviteit van de beoordeling, vooral ook omdat geen enkele boom helemaal egaal verkleurt. Terwijl het bovenste deel van de kroon al duidelijk geel is kan het onderste deel nog frisgroen zijn. De subjektiviteit wordt nog vergroot door het feit dat de opnamen steeds door een ander geschieden.

5.3. VERWERKING VAN DE GEGEVENS

In een drietal tabellen zijn de gegevens uitgewerkt. In tabel 3 worden de resultaten per proefperk weergegeven voor alle acht tot op heden verrichte opnamen. Het beste beeld van de uitbreiding van de ziekte geeft de kolom waarin het aantal dode bomen is vermeld. Het aantal zieke bomen (d.w.z. de som der geelgroene, gele en geelbruine bomen) blijkt helaas sterk te variëren. Dit vindt zijn oorzaak in beoordelingsmoeilijkheden en wel vooral bij de categorie geelgroen. Toch valt er een duidelijke uitbreiding van de ziekte te konstateren als we de totaalcijfers bezien (tabel 4). In tabel 5 is weergegeven het aantal dode en zieke bomen als percentage van het tijdens de eerste opname aanwezige aantal. Het aantal gestorven bomen over 1 3/4 jaar bedraagt 56 of wel 2,94 % van het totaal.

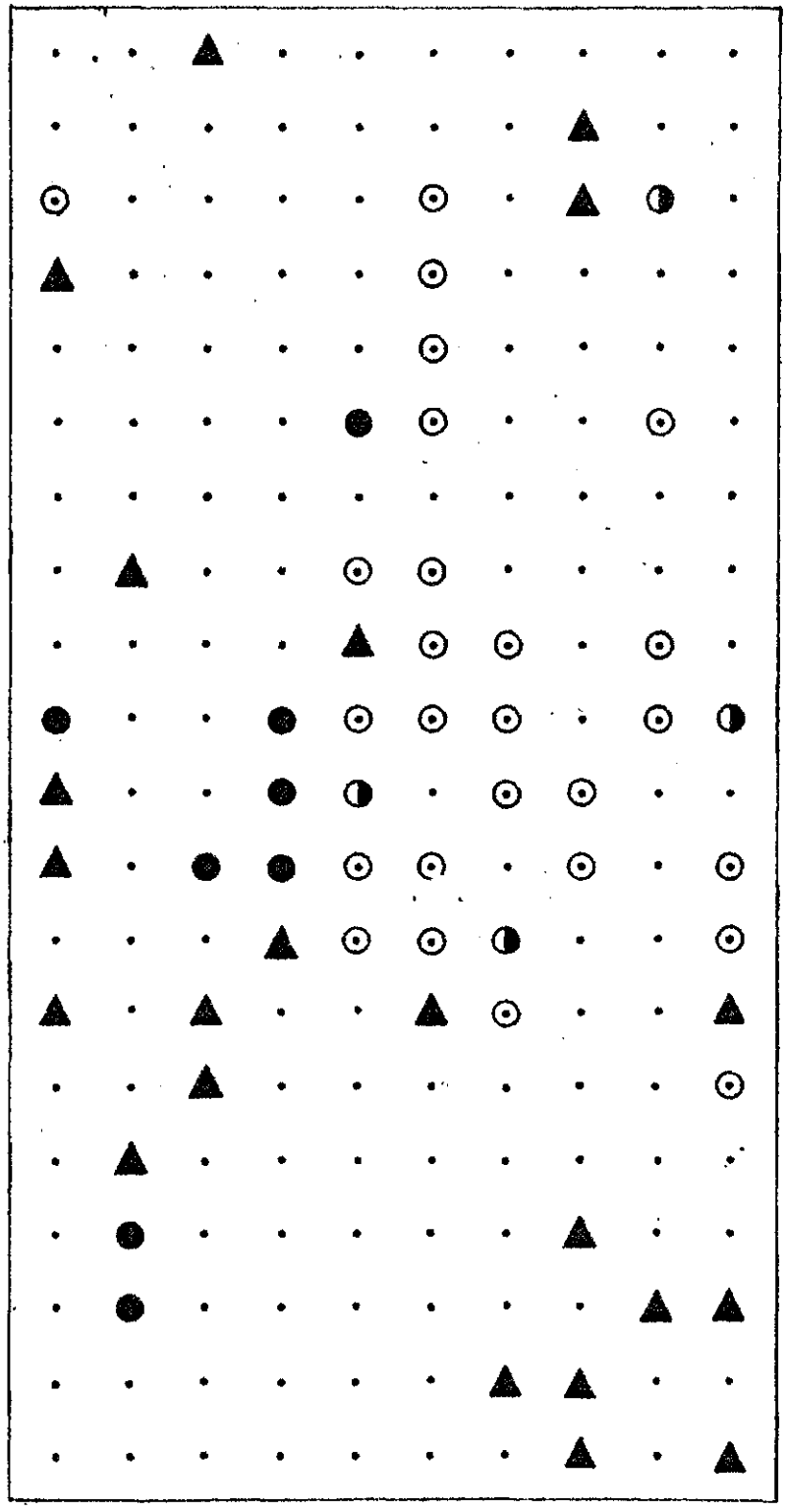


FIGUUR 5 : proefperk 1. situatie in dec. 1968

verklaring der tekens in figuur 1 en 2 :

⊙ geelgroen ◑ geelbruin ▲ dood door onbekende oorzaak

◔ geel ● dood



FIGUUR 6 : proefperk 1. situatie in sept. 1970

(Legende : zie figuur 5)

Tabel 3. Resultaten van de eerste 8 opnamen van de proefperken

proefperk nummer en het aantal staande bomen	opname	aantallen per stadium *)					ziek	ziek + dood	aantal bomen die bij de eerste opname reeds dood waren en waarvan de doodsoorzaak niet meer vastgesteld kon worden
		LG	GG	G	GB	Dood	GG + G + GB		
1 (178)	1	19	4	1	-	3	5	8	(22)
	2	26	4	-	-	4	4	8	
	3	29	12	1	-	4	13	17	
	4	28	12	2	1	5	15	20	
	5	57	13	1	0	7	14	21	
	6	49	13	0	2	7	15	22	
	7	36	20	0	3	8	23	31	
	8	33	26	0	4	9	30	39	
2 (241)	1	2	-	-	-	1	-	1	(15)
	2	3	-	1	1	1	2	3	
	3	5	1	-	-	3	1	4	
	4	5	1	-	-	3	1	4	
	5	7	-	-	-	3	-	3	
	6	16	2	-	1	3	3	6	
	7	-	-	-	-	5	-	5	
	8	1	1	-	-	5	1	6	
3 (250)	1	14	1	-	-	1	1	2	(6)
	2	11	4	1	-	1	5	6	
	3	13	2	1	2	1	5	6	
	4	17	3	1	-	3	4	7	
	5	17	3	-	-	3	3	6	
	6	26	5	-	1	4	6	10	
	7	-	-	-	-	4	-	4	
	8	-	-	-	-	4	-	4	
4 (138)	1	3	1	-	-	2	1	3	(5)
	2	4	-	1	-	3	1	4	
	3	7	2	-	-	4	2	6	
	4	12	2	-	-	4	2	6	
	5	16	2	-	-	4	2	6	
	6	22	1	-	-	5	1	6	
	7	-	-	-	-	5	-	5	
	8	4	3	-	-	5	3	8	

Tabel 3. vervolg

proefperk nummer en het aantal staande bomen	opname	aantallen per stadium ')					ziek GG + G + GB	ziek + dood	aantal bomen die bij de eerste opname reeds dood waren en waarvan de doodsoorzaak niet meer vastgesteld kon worden
		LG	GG	G	GB	Dood			
5 (287)	1	38	4	1	-	5	5	10	
	2	45	3	1	-	6	4	10	
	3	43	15	2	-	6	17	23	
	4	40	16	3	-	8	19	27	
	5	10	2	2	-	8	4	12	
	6	16	3	-	-	9	3	12	
	7	27	4	-	-	9	4	13	
	8	5	5	-	1	9	6	15	
6 (201)	1	6	3	1	-	1	4	5	(9)
	2	8	2	2	-	1	4	7	
	3	13	4	1	-	2	5	7	
	4	16	9	1	-	3	10	13	
	5	6	6	1	-	5	7	12	
	6	12	3	-	1	6	4	10	
	7	17	11	-	3	6	14	20	
	8	21	2	1	1	8	4	12	
7 (287)	1	9	3	1	-	3	4	7	(1)
	2	18	4	-	1	3	5	8	
	3	20	7	1	2	3	10	13	
	4	29	8	2	-	5	10	15	
	5	22	8	1	-	3	9	12	
	6	23	4	-	-	3	4	7	
	7	24	4	-	3	3	7	10	
	8	7	4	-	-	4	4	8	
8 (16)	1	-	-	-	-	2	-	2	(16)
	2	-	-	-	-	2	-	2	
	3	-	-	-	1	2	1	3	
	4	2	-	-	-	3	-	3	
	5	-	-	-	-	3	-	3	
	6	5	1	-	1	3	2	5	
	7	4	1	-	-	3	1	4	

Tabel 3. vervolg

proefperk nummer en het aantal staande bomen	opname	aantallen per stadium *)					ziek GG + G + GB	ziek + dood	aantal bomen die bij de eerste opname reeds waren en waarvan de doodsoorzaak niet meer vastgesteld kon worden
		LG	GG	G	GB	Dood			
9 (21)	1	1	-	-	1	2	1	3	(9)
	2	1	-	-	-	3	-	3	
	3	3	-	-	-	3	-	3	
	4	3	-	-	-	3	-	3	
	5	2	-	-	-	4	-	4	
	6	2	1	-	-	5	1	6	
	7	-	1	-	-	5	1	6	
	8	1	-	-	-	5	-	5	
10 (25)	1	1	-	2	-	3	2	5	(3)
	2	-	1	1	1	3	3	6	
	3	1	-	-	2	4	2	6	
	4	2	-	-	-	6	-	6	
	5	1	-	-	-	6	-	6	
	6	2	-	-	-	6	-	6	
	7	-	-	-	-	6	-	6	
	8	1	-	-	-	6	-	6	
11 (29)	1	3	1	-	-	4	1	5	(9)
	2	2	2	-	-	4	2	6	
	3	3	3	-	-	4	3	7	
	4	3	1	2	-	5	3	8	
	5	-	-	-	-	7	-	7	
	6	-	-	-	-	7	-	7	
	7	4	1	-	-	7	1	8	
	8	-	1	-	1	7	2	9	
12 (35)	1	2	1	-	1	2	2	4	(6)
	2	1	3	-	-	3	3	6	
	3	3	3	-	-	3	3	6	
	4	7	5	-	-	3	5	6	
	5	5	-	-	-	3	-	8	
	6	6	-	-	-	3	-	3	
	7	12	-	-	-	3	-	3	
	8	6	-	-	-	4	-	4	

Tabel 3. vervolg

proefperk nummer en het aantal staande bomen	opname	aantallen per stadium ')					ziek GG + G + GB	ziek + dood	aantal bomen die bij de eerste opname reeds dood waren en waarvan de doodsoorzaak niet meer vastgesteld kon worden
		LG	GG	G	GB	Dood			
13 (29)	1	1	-	1	-	1	1	2	(10)
	2	1	1	-	-	2	1	3	
	3	3	2	-	-	2	2	4	
	4	6	3	-	-	2	3	5	
	5	3	2	-	-	3	2	5	
	6	-	1	-	-	3	1	4	
	7	6	6	-	-	3	6	9	
	8	1	-	-	-	3	-	3	
14 (79)	1	7	2	-	-	1	2	3	(45)
	2	5	2	-	-	3	2	5	
	3	7	2	1	-	3	3	6	
	4	10	2	-	1	3	3	6	
	5	12	1	-	-	4	1	5	
	6	11	4	-	1	4	5	9	
	7	7	5	-	-	6	5	11	
	8	4	7	-	-	6	7	13	
15 (106)	1	2	2	-	-	9	2	11	(53)
	2	1	2	1	-	9	3	12	
	3	1	1	-	2	9	3	12	
	4	2	1	-	2	10	3	13	
	5	4	2	-	1	14	3	17	
	6	3	-	3	1	15	4	19	
	7	6	-	5	2	16	7	23	
	8	-	-	1	1	17	2	19	

LG = lichtgroen
GG = geelgroen
G = geel
GB = geelbruin

Tabel 4. Resultaten van de eerste acht opnamen voor alle proefperken samen

opname	aantallen per stadium				dood	ziek	dood + ziek
	LG	GG	G	GB			
1	108	22	7	2	40	31	71
2	126	28	8	3	48	39	87
3	151	54	7	9	53	70	123
4	191	61	11	4	65	76	141
5	162	44	5	1	77	50	127
6	193	38	3	8	83	49	132
7	144	53	5	11	89	69	158
8	104	55	2	10	96	67	163

. LG = lichtgroen
. GG = geelgroen
. G = geel
. GB = geelbruin

Ziek = GG + G + GB

Tabel 5. Aantal per proefperk, tussen de eerste en achtste opname gestorven bomen, ook als percentage van het bij de eerste opname aanwezige aantal

proefperknummer	gestorven bomen	percentage van het totaal
1	6	3,7
2	4	1,7
3	3	1,2
4	3	2,2
5	4	1,4
6	7	3,5
7	1	0,3
8	2	12,5
9	3	14,3
10	3	12,0
11	3	10,3
12	2	5,7
13	2	6,9
14	5	6,3
15	8	7,5
totaal:	56	2,94%

De snelheid van de uitbreiding van de ziekte schijnt na acht maanden veel lager te liggen dan de eerste vier opnamen deden vermoeden. Na vier opnamen waren er t.o.v. de eerste opname 70 zieke en dode bomen bijgekomen. Na acht opnamen bedroeg dit aantal niet meer dan 86. In tabel 6 is weergegeven het aantal ziekte- en sterfgevallen, waarbij de kategorie GG de ene keer wél en de andere keer niet als ziek beschouwd wordt. In het laatste geval krijgen we een duidelijker beeld van het verloop van de ziekte. De teruggang in de kategorie GG maskeert in het eerste geval de toename van het aantal sterftegevallen. De variatie in de kategorie geelgroen kan te wijten zijn aan beoordelingsmoeilijkheden. Dat zieke bomen zich herstellen is moeilijk aan te nemen. Als er tijdens de eerste vier opnamen sprake was van een foutieve beoordeling, dan is dat mogelijk nu gekorrigeerd. Als in de latere opnamen ziektegevallen over het hoofd zijn gezien dan zal zich dat later moeten uiten in een sterke toename van het sterftecijfer.

Als we nu aan de gestorven bomen nagaan binnen welke tijd ze afgestorven zijn dan krijgen we misschien wel het duidelijkste beeld van de voortgang van de ziekte. In tabel 7 is dit uitgewerkt. Het blijkt dat de bomen gemiddeld binnen acht maanden nadat de eerste symptomen optraden afgestorven waren.

Samenvattend kunnen we zeggen dat jaarlijks 1,5% sterft na een gemiddelde ziekteduur van 8 maanden.

6. ECOLOGIE

6.1. INLEIDING

Een deel van de werkzaamheden bestond uit proeven over de groei van de Pwr-schimmel door steriele en niet-steriele grond. Dit geschiedde ter bevestiging van eerder verkregen gegevens, waarbij nu echter het fungicide benlate ter beschikking stond.

Nieuw zijn de temperatuurproef en de proef over het antagonisme van Trichoderma t.o.v. de wortelrotschimmel. De temperatuurproef werd uitgevoerd op het Laboratorium voor Fytopathologie te Wageningen.

De faktoren die van invloed zijn op het pathogeen zijn te verdelen in biotische en abiotische.

6.2. ABIOTISCHE FAKTOREN

Onder abiotische faktoren worden verstaan die faktoren, die het milieu samenstellen en die niet van "levende" aard zijn. Licht, vocht, temperatuur, bodemstruktuur, bodemtextuur en bodemvruchtbaarheid zijn zulke faktoren.

Tabel 6. Aantal aangetaste bomen voor de eerste acht opnamen benevens het verschil tussen de achtste en de eerste en de achtste en de vierde opname met
a) de kategorie GG beschouwd als ziek b) kategorie GG niet beschouwd als ziek

ummer roefperk	Aantal bomen		(Ziek + dood)[1] opname no.										(Ziek + dood)[2]									
	aanplant	1e opname	1	2	3	4	5	6	7	8	8-1	8-4	1	2	3	4	5	6	7	8	8-1	8-4
1	200	178	8	8	17	20	21	22	31	39	31	19	4	4	5	8	8	9	11	13	9	5
2	256	241	1	3	4	4	3	6	5	6	5	2	1	3	3	3	3	4	5	5	4	2
3	256	250	2	6	6	7	6	10	4	4	2	-3	1	2	4	4	3	5	4	4	3	0
4	144	138	3	4	6	6	6	6	5	8	5	2	2	4	4	4	4	5	5	5	3	1
5	300	267	10	10	23	27	12	12	13	15	5	-12	6	7	8	11	10	9	9	10	4	-1
6	254	201	7	8	13	15	12	10	20	12	5	-3	4	6	9	6	6	7	9	10	6	4
7	300	287	7	8	13	15	12	7	10	8	1	-7	4	4	12	7	4	3	6	4	0	-3
8	17	16	2	2	3	3	3	5	4	4	2	1	2	2	3	3	3	4	3	4	2	1
9	38	21	3	3	3	3	4	6	6	5	2	2	3	3	3	3	4	5	5	5	2	2
10	27	25	5	6	6	6	6	6	6	6	1	0	5	5	6	6	6	6	6	6	1	0
11	38	29	5	6	7	7	7	7	8	9	4	2	4	4	4	6	7	7	7	8	4	2
12	40	35	4	6	6	6	8	3	3	4	0	-2	3	3	3	3	3	3	3	4	1	1
13	39	29	2	3	4	5	5	4	9	3	1	-2	2	2	2	2	3	3	3	3	1	1
14	127	79	3	5	6	6	5	9	11	13	10	7	1	3	4	4	4	5	6	6	5	2
15	158	106	11	12	12	13	17	19	23	19	8	6	9	10	11	12	15	19	23	19	10	7
	2194	1902	71	87	123	141	127	132	158	157	82	12	51	62	81	82	82	94	105	106	55	24

1: Ziek = GG + G + GB

2: Ziek = G + GB

Tabel 7. Ziekteduur van bomen die gezond waren bij de eerste en dood bij de achtste opname

aantal maanden waarbinnen sterfte optreedt	3	6	9	12	15	18
aantal gestorven bomen	13	13	7	4	6	2

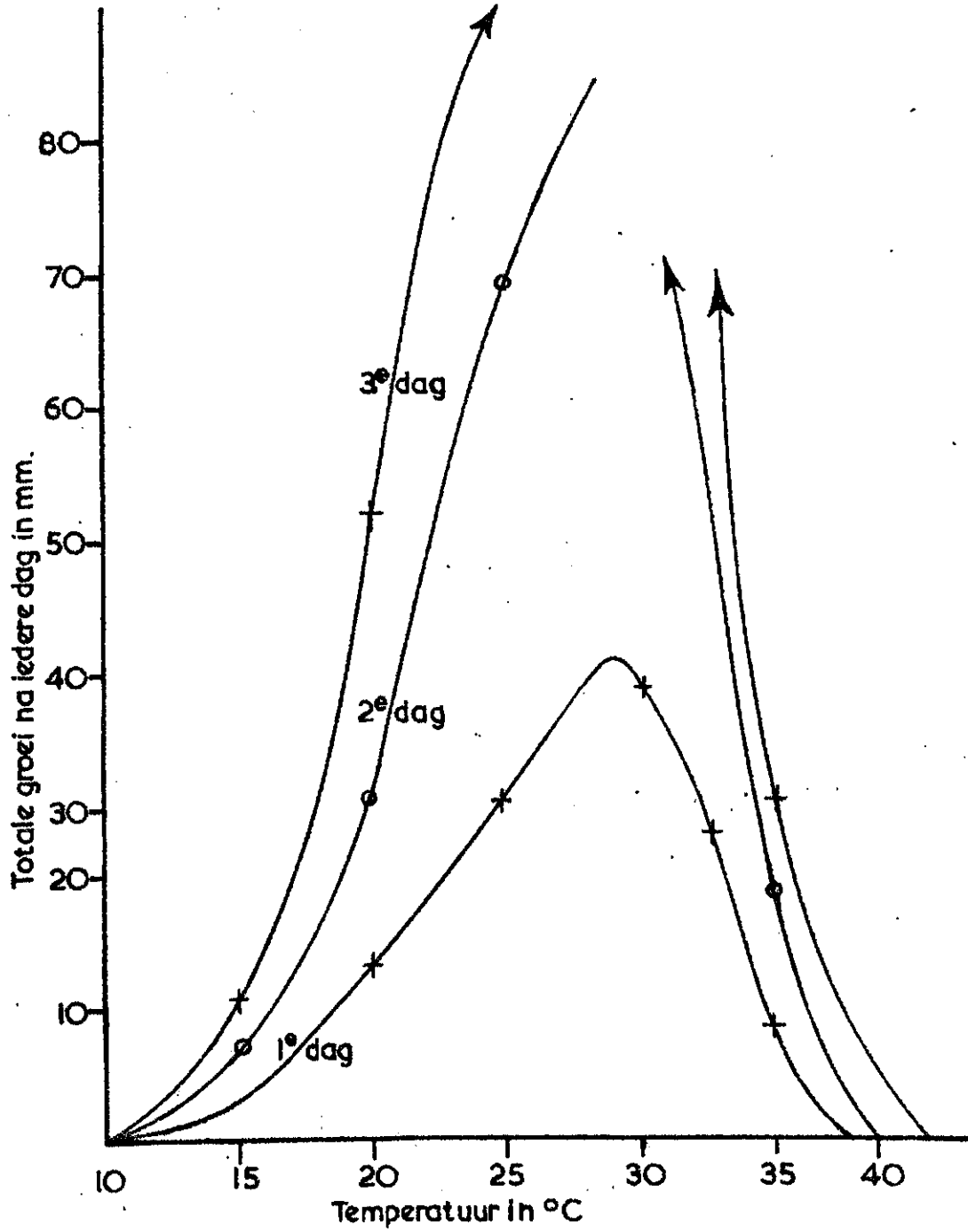
6.2.1. Temperatuur

Teneinde de invloed van de temperatuur op de myceliumgroei na te gaan, werden de groeisnelheden gemeten bij de volgende temperaturen: 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 en 45°C. Per temperatuur werden vijf schalen ingezet, waarop aan de onderzijde assenkruizen waren aangebracht. De schalen met moutagar werden in het midden geënt met een ponsje van een kultuur van de Pwr-schimmel op moutagar, en een etmaal geïnkubeerd bij 30°C. Vervolgens werd drie dagen lang een markering verricht op dezelfde tijd van de dag als waarop de eerste markering geschiedde. De resultaten zijn te vinden in tabel 8 en fig. 7.

Tabel 8. Gemiddelde koloniediameter (5 schalen per objekt) in mm, als funktie van de tijd en de temperatuur

temperatuur in °C	na 24 uur	na 48 uur	na 72 uur
0	-	-	-
5	-	-	-
10	-	-	-
15	3	6	11
20	13	31	52
25	30	69	> 90
30	38	> 90	> 90
35	8	18	31
40	-	> 0	1

FIG. 7 Groeicurven voor de p. w. r. - schimmel op moutagar bij een aantal verschillende temperaturen



Uit de tabel blijkt dat de Pwr-schimmel een hoge optimumtemperatuur heeft. In de schalen die 5 dagen bij 0°C en bij 5°C gestaan hadden bleek na overbrengen naar kamertemperatuur alsnog groei op te treden. Na langere tijd aan deze lage temperaturen te zijn blootgesteld, groeide de schimmel echter niet meer uit. Bij een temperatuur van 25°C doorgroeit de Pwr-schimmel binnen een week een petrischaal met een middellijn van 9 cm gevuld met moutagar. In de tabel van NOBLES (1964) vormt dit een determinatie kenmerk.

6.2.2. Vocht

Al eerder werd gevonden, dat de Pwr-schimmel niet door zeer natte grond groeit (VAN DER HOEVEN, 1969). Wel bleek de schimmel in staat om over een wateroppervlak te groeien. Dit laatste werd herhaalde malen waargenomen in de potten waarin inokula geïnkubeerd waren en waarin zich een laag steriel water bevond.

6.2.3. Benlate

Uit recent onderzoek (BOLLEN & FUCHS, 1970) is gebleken, dat de weinige onderzochte basidiomyceten vrij ongevoelig zijn voor dit fungicide. Vele ascomyceten daarentegen blijken evenals de meeste Fungi Imperfecti zeer gevoelig. In dit beeld past ook de Pwr-schimmel, hetgeen blijkt uit tabel 9.

Tabel 9. Invloed van verschillende koncentraties van benlate in moutagar op de groei van de Pwr-schimmel (de kolonie diameters zijn gemiddelden van 5 schalen)

ppm Benlate	0	5	10	25	50	100	200
Koloniediameter na 2 dagen in mm	77	81	85	67	76	46	50

Ook hier werd gebruik gemaakt van plastiek schalen met assenkruizen op de achterzijde. De schalen werden geïnkubeerd bij een temperatuur van 30°C. Meting vond plaats na twee dagen. Na drie dagen bleken alle schalen volgegroeid te zijn (Ø = 9 cm). Er valt in de buurt van 100 ppm een lichte daling in de groei te konstateren. Trichoderma spp. werden reeds bij 1 ppm grotendeels en bij 5 ppm geheel geremd. Dit resultaat was aanleiding om benlate te gebruiken bij de isolatiepogingen van de wortelrotschimmel, juist omdat deze in zijn uitgroei meestal geremd wordt door Trichoderma spp.

6.3. BIOTISCHE FAKTOREN

6.3.1. Antagonisme

Bij het uitleggen van delen van zieke wortels bleek de Pwr-schimmel bijna nooit uit te groeien tenzij gebruik gemaakt werd van het fungicide benlate, welk middel veel antagonisten uitschakelt. Deze gevoeligheid voor antagonisme doet vermoeden dat we te maken hebben met een schimmel met een klein vermogen tot kompetatief saprofytisme. Omdat het gedrag van de Pwr-schimmel in de nabijheid van andere mikroörganismen een aanwijzing vormt omtrent zijn mogelijke ecologische positie, werden enkele proeven uitgevoerd betreffende de groei door grond vanuit een "foodbase".

In een eerste proef werd over een laagje grond wateragar gegoten. Vier verschillende grondbehandelingen werden toegepast, te weten steriliseren, alsmede toevoegen van benlate, terramycine of een mengsel van beide. Daarnaast werd één serie onbehandeld gelaten. Alleen bij de steriele grond groeide de schimmel over de agar. In de andere gevallen vond wel uitgroei plaats vanuit het ponsje moutagar begroeid met de Pwr-schimmel waarmee de wateragar geënt was, maar in kontakt gekomen met de agar vond lysis van de hyfen plaats.

Omdat in een aantal oriënterende proeven in enkele gevallen ook groei in niet-steriele grond plaats vond werd een proef opgezet, waarin alleen met niet-steriele grond gewerkt werd. In deze tweede proef werden twee grondsoorten gebruikt, nl. grond van de CELOS-kwekerij en grof zuiver zand, en vond slechts één grondbehandeling plaats, nl. toevoegen van benlate. Ditmaal werd gebruik gemaakt van grote petrischalen (Ø = 20 cm) waarin grotere stukken hout als "foodbase" pasten. Deze stukken van ± 6 x 2 x 2 cm^3 waren weelderig met de Pwr-schimmel begroeid. Ze waren een maand lang geïnkubeerd geweest in geautoklaveerde jampotten. Vóór het enten met de Pwr-schimmel waren de houtstukken eerst geweekt in een benlate suspensie en daarna gesteriliseerd met epoxypropaan. In elke schaal werden twee stukken geplaatst, tegenover elkaar. De grond werd bevochtigd, hetzij met een benlate suspensie (50 ppm), hetzij met steriel water. Dit geschiedde na de hoeveelheid water gemeten te hebben welke nodig was om een bepaalde hoeveelheid grond op de gewenste vochtigheid te brengen. Voor het zand werd dit op 14%, voor de kwekerijaarde op 20% van het oorspronkelijke gewicht bepaald. Elk van de vier series werd in zes herhalingen ingezet.

Bij de laatste kontrole op 29 oktober, 40 dagen na het begin van de proef, bleek dat in de serie met kwekerijaarde bijna al het mycelium van de inokula verdwenen was, kennelijk vanwege de antagonistische mikroflora van deze grond. In de serie met grof zand daarentegen vond tenslotte in de meeste schalen na enkele weken enige uitgroei plaats vanuit de inokula, zowel in de onbehandelde serie als in die met benlate. We mogen wel aannemen dat zich in deze grond weinig mikroörganismen bevinden, hetgeen de reden kan zijn van de uitgroei.

Teneinde het gedrag van de Pwr-schimmel na te gaan in een substraat na besmetting met Trichoderma sp., werd deze schimmel toegevoegd aan erlemeyers van 100 ml gevuld met verrijkt zaagsel (TAMBLYN & DA COSTA, 1958) die twee weken tevoren waren geënt met de Pwr-schimmel. De helft van deze erlemeyers bevatte benlate (als suspensie van 50 ppm toegevoegd). Trichoderma werd toegevoegd in de vorm van een ponsje uit een kultuur en als konidiënsuspensie. Aldus ontstonden de volgende kombinaties:

1. verrijkt zaagsel + + agar ponsje met Trichoderma
2. " " + benlate + idem idem idem idem
3. " " + konidiënsuspensie van Trichoderma
4. " " + benlate + idem idem idem

Na verloop van tijd vormde zich in alle gevallen een soort van grens welke langs de glasrand zichtbaar was als een witte lijn. In gevallen waarin Trichoderma als konidiënsuspensie was toegediend werd de Pwr-schimmel het meest teruggedrongen. Vooral daar waar het zaagsel benlate bevatte en Trichoderma als ponsje was toegediend, leek de Pwr-schimmel nauwelijks terrein te verliezen.

Na vier maanden, op 16 oktober, werd van het totaal uitgedroogde zaagsel beneden de grens tussen de Pwr-schimmel en Trichoderma zaagsel genomen en uitgespreid over een medium van moutagar met 50 ppm benlate. In eerste instantie ontwikkelde zich overal Trichoderma op het zaagsel. Dit groeide echter niet uit op het medium. Na verloop van tijd echter groeide in alle gevallen, volkomen onverwacht, de Pwr-schimmel in het medium en doorgroeide de schaal. Misschien is het aan de uitdroging te danken, dat Trichoderma de Pwr-schimmel niet geheel heeft kunnen verdringen. In ieder geval is wel duidelijk dat de Pwr-schimmel zeer droogteresistent is.

6.3.2. Mycorrhiza

Zoals vermeld onder het hoofd inokulaties, werden in de bakken met door VAN DER HOEVEN geïnokuleerde jonge Pinusplanten (op het CELOS-terrein) paddestoelen aangetroffen van Telephora terrestris. Het is bekend dat deze schimmel mycorrhiza vormt met wortels van bepaalde Pinussoorten, waaronder ook Pinus caribaea. Isolaties uit mycorrhizae hadden geen sukses. Met de mikrotoom werden enkele coupes gemaakt. Het mycelium vertoonde duidelijk gespen.
Uit proeven van MARX (1969) is duidelijk gebleken, dat o.a. Telephora terrestris als mycorrhizavormer de gastheer bescherming kan bieden tegen pathogenen. Hij gebruikte als pathogeen Phytophtora cinnamomi.

7. BESPREKING

De Pwr-schimmel behoort zeer waarschijnlijk tot de familie van de Polyporaceae. Dit is allereerst gebaseerd op de gelijkenis van de in Suriname geïsoleerde schimmel met een isolaat van Dr. PAWSEY dat tot de Polyporaceae leek te behoren. Determinatie van de Pwr-schimmel op grond van kultuurkenmerken (NOBLES,1964) bleek onmogelijk, maar vele kenmerken wijzen samen duidelijk in de richting van de Polyporaceae. Slechts de vondst van het vruchtlichaam kan de oplossing brengen.

Het feit dat de Pwr-schimmel bijna alleen door steriele grond groeit wijst er op dat deze gevoelig is voor antagonisme (in arme grond vindt nog enige groei plaats). Ook het achterwege blijven van groei uit stukjes ziek hout uitgelegd op moutagar, in aanwezigheid van andere schimmels, is hiervoor een aanwijzing. In de bodem zal de aanwezigheid van de Pwr-schimmel waarschijnlijk beperkt zijn tot de wortel; het vermogen tot kompetatief saprofytisme is klein hoewel de groei redelijk snel is. Mogelijk ontbreekt er op plaatsen waar de ziekte optreedt voldoende antagonisme.

Hoewel de Pwr-schimmel uitsluitend uit Pinusmateriaal geïsoleerd werd, wijst de sterke verspreiding van de ziekte er toch wel duidelijk op dat de ziekteverwekker afkomstig moet zijn uit de oorspronkelijke vegetatie. Het verdient aanbeveling in de toekomst meer aandacht te besteden aan isolaties uit bomen behorend tot de oorspronkelijke vegetatie.

Voor het opruimen van de oorspronkelijke vegetatie zijn of worden drie methoden gebruikt:

1. dozeren, d.w.z. omduwen van de boom, zodat deze met zijn wortels verdwijnt;
2. vergiftigen (dit gebeurt met de grootste exemplaren);
3. afsnijden, met K.G. blad ter hoogte van de grond.

Bij de laatste twee methoden blijft het wortelstelsel achter in de bodem. In beide gevallen is het wortelstelsel niet meteen dood, doch sterft geleidelijk af. Tijdens dit proces krijgt mogelijk de Pwr-schimmel de kans het wortelmateriaal te koloniseren. Aldus ontstaat wellicht een "foodbase" die het inokulumpotentiaal verschaft, nodig voor een geslaagde infektie van de Pinusaanplant. Als nl. na verloop van tijd de wortels van de aangeplante Pinus caribaea hiermee in kontakt komen kan de Pwr-schimmel hierover uitgroeien en de boom doden. Via onderlinge wortelvergroeiingen kan dan de schimmel zich verder uitbreiden, de gedode exemplaren weer als "foodbase" gebruikend. Op deze wijze ontstaat een haardvormige uitbreiding die ook inderdaad waargenomen wordt.

De snelheid waarmee de ziekte zich uitbreidt, schijnt na acht opnamen van de proefperken beduidend kleiner te zijn dan na vier opnamen gekonstateerd werd. Naast een lagere sterfte bleek vooral de toename van het aantal zieke bomen kleiner te zijn. Naast de kategorie LG is waarschijnlijk ook de kategorie GG niet met zekerheid als ziek te beschouwen. Het aantal bomen in deze categorieën varieert nl. per opname dusdanig, dat hier andere verschijnselen doorheen spelen. Mochten bomen met de kleur GG toch allen ziek zijn, dan betekent dit dat er in deze fase nog een beduidend aantal ontsnapt aan de dood en weer gezond wordt. Gele en geelbruine bomen gaan echter altijd dood (G resp. GB).

Ondanks deze teruggang in het ziekteverloop kan de uitbreiding plaatselijk zeer sterk zijn en het is dan ook duidelijk dat juist i.v.m. de toekomstige schaalvergroting van de Pinusaanplant dit wortelrotprobleem nader en meer gekoncentreerd onderzoek behoeft.

8. LITERATUUR

BASHAM, J.T., 1957. A technique for the sterilisation and inoculation of wood cut from living trees. Can. J. Bot. 35 : 31-34.

BOLLEN, G.J. & A. FUCHS, 1970. On the specificity of the in vitro and in vivo antifungal activity of benomyl. Neth. J. Pl. Path. 76 : 299-312.

ETHERIDGE, D.E., 1968. Preliminary observations on the pathology of Pinus caribaea Morelet in British Honduras. Comm. For. Rev. 47(1): 72-80.

GARRET, S.D., 1960. Biology of root-infecting fungi. Cambridge university press, Cambridge.

GRANT, C.& J.G. SAVORY, 1964. Methods for isolation and identification of fungi on wood. Int. Biodetn. Bull. 5(2): 77-94.

GURR, E., 1965. The rational use of dyes in biology and general staining methods. Gurr, London.

HOEVEN, E.P. van der, 1969. Wortelrot van Pinus caribaea Morelet. CELOS Rapporten no 27.

LEMCKERT, J.D., 1969. Wortelrot Pinus caribaea Morelet. CELOS Rapporten no 21(4).

MARX, D.H., 1970. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infection, 5. Phytopathology 60: 1472-1473.

NOBLES, M.K., 1958. A rapid test for extracellular oxidase in cultures of wood inhabiting Hymenomycetes. Can. J. Bot. 36 : 883-926.

NOBLES, M.K., 1958. Cultural characters as a guide to the taxonomy and phylogeny of the Polyporaceae. Can. J. Bot. 36: 91-99.

NOBLES, M.K., 1964. Identification of wood inhabiting Hymenomycetes. Can. J. Bot. 43: 1097-1139.

PAWSEY, R.G., 1970. Forest diseases in Trinidad and Tobago with some observations in Jamaica. Comm. For. Rev. 49(1): 64-77.

SASS, J.E., 1951. Botanical microtechnique. The Iowa state college press, Iowa, second edition.

TAMBLYN, M. & E.W.B. DA COSTA, 1958. A simple technique for producing fruit bodies of wood destroying Basidiomycetes. Nature, 181: 578-579.

TUITE, J., 1969. Plant pathological methods, fungi and bacteria. Minneapolis Burgess Publ. Comp.

VERMEULEN, H., 1968. Investigations into the cause of the phloeem necrosis disease of Coffea liberica in Surinam, South America. Neth. J. Pl. Path. 74: 202-218.

ZAK, B. 1964. Role of mycorrhizae in root disease. Ann. Rev. Phytopathology 2 : 377-392.