

This article was published by PRO LIGNO Journal Vol. 7 N°1, in March 2011
ONLINE ISSN 2069-7430
ISSN-L 1841-4737
Publisher: Editura Universitatii TRANSILVANIA Brasov
The online version is available at www.proligno.ro and www.scipio.ro
PRO LIGNO is quoted in 2011 as a CNCSIS B+ journal and indexed by the international database *Academic Search Complete* hosted by EBSCO Publishing



PRO LIGNO

An International Journal in the Field of Wood Engineering

Volume 7 Number 1 March 2011

CONTENTS

Alba ZAREMSKI, Louis GASTONGUAY, Yves PRIN
[Natural Protection of Wood with Antagonism Fungi pp. 3-14](#)

Emilia-Adela SALCĂ, Ivan CISMARU
[Colour Changes Evaluation of Freshly Cut Alder Veneers Under the Influence of Indoor Sunlight pp. 15-24](#)

Maria-Cristina TIMAR, Ana-Adriana TUDUCE TRĂISTARU, Silvia PAȚACHIA, Cătălin CROITORU
[An Investigation of Consolidants Penetration in Wood. Part 2: FTIR Spectroscopy pp. 25-38](#)

Adriana FOTIN, Ivan CISMARU
[Design and Calculation of the Resistance Circles for Wooden Barrels pp. 39-50](#)

Wilhelm LAURENZI
[Experimental Data Processing. Part 2pp. 51-59](#)

PLEASE SCROLL DOWN FOR FULL TEXT ARTICLE

PROTECȚIA NATURALĂ A LEMNULUI
CU CIUPERCI ANTAGONICE

NATURAL PROTECTION OF WOOD
WITH ANTAGONISM FUNGI

Alba ZAREMSKI

Dr.eng. - UR 39 «génétique forestière», CIRAD BIOS TA A-39/C Campus International de Baillarguet
Adresa/Address: F-34398 Montpellier Cedex 5, France
E-mail: alba.zaremski@cirad.fr

Louis GASTONGUAY

Researcher - Institut de Recherche d'Hydro-Québec, Sciences des matériaux
Adresa/Address: 1800 Lionel-Boulet, Varennes, Québec, Canada, J3X 1S1

Yves PRIN

Researcher - Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes
Adresa/Address: UMR 113 (CIRAD/INRA/IRD/Agro-M/UM2) TA 10/J, F-34398 Montpellier Cedex 5, France

Rezumat:

Mediile biologice conțin o serie de populații microbiene care, într-o categorie ecologică de nișă, indică diferite relații variind de la simbioză la parazitism. Cercetătorii au fost interesați de acest tip de relații de circa cincizeci de ani, în special de un anumit tip de legătură: antagonismul exercitat între indivizi ai aceleiași populații microbiene.

Astăzi, rolul pe care îl joacă agenții microbieni, aducând în prim plan substanțele antibiotice inhibitive sau distructive, dezvăluie un anumit potențial pentru utilizarea lor în controlul microorganismelor asociate cu un astfel de proces de degradare.

Studiul desfășurat de HydroQuébec și CIRAD a constatat în două tipuri de experimente: 1) în vase Petri pentru a evalua și caracteriza capacitatea antagonică a *Trichoderma* asupra ciupercilor de putregai alb și brun; 2) pe piese prelevate din stâlpi netratați, pentru a studia confruntarea între basidiomycete și specii antagoniste în lemn.

Acest studiu a investigat antagonismul a trei ascomycete din genul *Trichoderma* împotriva a două basidiomycete ce provoacă putregaiul alb *Pycnoporus sanguineus* și *Coriolus versicolor* și două basidiomycete ce provoacă putregaiul brun *Antrodia* sp. și *Coniophora puteana*, prin confruntarea directă în vase Petri și în lemn provenit de la stâlpii din HydroQuébec.

Rezultatele obținute pare că se completează reciproc în mod coerent. Acestea au evidențiat că grupa de ciuperci *Trichoderma* nu a fost agresivă la lemn iar rezultatele obținute după confruntarea directă în vase Petri a fost confirmată și în lemn.

Prin expunerea directă a unor ciuperci diferite din grupa basidiomycete și a celor antagoniste în vase Petri, două câte două, am evidențiat un efect antagonic pentru cea mai mare parte a perechilor de ciuperci utilizate. Totuși a existat o variabilitate substanțială în reacții de la o pereche la alta.

Cuvinte cheie: antagonism, *Trichoderma*, biocontrol, basidiomycete, putregai alb, putregai brun, stâlpi din lemn.

Abstract:

Biological environments contain a certain number of microbial populations which, within a given ecological niche, display various relations ranging from symbiosis to parasitism. Researchers have been interested in these types of relations for around fifty years, especially in one very particular type of relationship: the antagonism exerted between individuals of the same microbial population.

Today, the role played by biological agents, bringing into play inhibitive or destructive antibiotic substances, reveals a certain potential for their use in controlling microorganisms associated with such degradation processes.

The work undertaken by HydroQuébec and CIRAD involved two types of experiment: 1) in Petri dishes to assess and characterize the antagonistic capacity of *Trichoderma* against white rot and brown rot fungi; 2) on pieces taken from untreated poles in order to study confrontation between the basidiomycete and the antagonistic strain in wood.

This study investigated the antagonism of three ascomycetes of the genus *Trichoderma* against two white rot basidiomycetes, *Pycnoporus sanguineus* and *Coriolus versicolor*, and two brown rot basidiomycetes, *Antrodia* sp. and *Coniophora puteana*, through direct confrontation in Petri dishes and in the wood of HydroQuébec poles.

The results obtained seemed to complete each other coherently. They revealed that the *Trichoderma* group of fungi was not aggressive to wood and the results obtained after direct confrontation in Petri dishes were confirmed in wood.

By directly exposing the different basidiomycetes and antagonists to each other in Petri dishes, two by two, we effectively revealed an antagonism effect for a large majority of the pairs. However, there was substantial variability in reactions from one pair to the next.

Key words: antagonism, *Trichoderma*, biocontrol, white rot basidiomycetes, brown rot basidiomycetes, wood poles.

INTRODUCERE

Mediile biologice conțin o serie de populații microbiene care, într-o categorie ecologică de nișă, indică diferite relații variind de la simbioză la parazitism (Alabouvette ș.a. 1983, Clubbe 1980, Davet 1996).

Cercetătorii au fost interesați de acest tip de relații de circa cincizeci de ani, în special de un anumit tip de legătură: antagonismul exercitat între indivizi ai aceleiași populații microbiene.

O particularitate în domeniul patologiei plantei este că aceste relații își găsesc aplicația în controlul microorganismelor asociate cu procese de degradare (paraziți ai solului, fructe, frunze, semințe, araci etc.). O amplă bibliografie ilustrează interesul arătat acestui subiect și evidențiază faptul că unele genuri de ciuperci exercită un efect de antagonism asupra unui larg număr de alte specii de ciuperci, lignicole, care determină putrezirea lemnului sau nu. Este vorba în primul rând despre genul *Trichoderma*, care are un spectru larg de acțiune (Baker 1991, Besselat 1985, Butt ș.a. 2001, Cavalcante ș.a. 1981, Corbaz 1990, Dubos 1985, Dik și Elad 1999, Hjeljord ș.a. 2000, Jin ș.a. 1992, Morris ș.a. 1986, Smith ș.a. 1990, Van der Steen ș.a. 2003, Wilson 1997).

Prin urmare, aceste fenomene de antagonism sunt de interes clar definit în controlul biologic și în mod particular în protecția lemnului față de agenții biologici de degradare precum basidiomycete, care provoacă putregaiul lemnului și *Fungi Imperfecti* și ascomycete, care provoacă albăstreala și putregaiul moale (Clausen ș.a. 2007, Idwan Sudirman ș.a. 1992, Vanneste ș.a. 2002).

Cercetarea efectuată pe microorganisme lignicole antagonice arată că există probabil posibilitatea de a utiliza aceste fenomene în protecția lemnului (Bruce ș.a. 1983, 1991, Freeman ș.a. 2003; Freitag ș.a. 1991, Harman and Stasz 1989, Hiratsuka ș.a. 1994, Morris ș.a., 1986, Yang ș.a., 1993, 1999, 2007a, 2007b, 2007c, 2009), unul din avantajele majore fiind că acestea evită utilizarea unor pesticide care au restricții privind sănătatea și mediul. La ora actuală protecția lemnului se face în contextul unor reguli stricte (legi naționale, directive europene precum Directiva asupra produselor biocide 98/8/EC, ISO, EN și standarde NF etc.) care garantează că produsele chimice utilizate prezintă siguranță față de om și mediu.

Efectul antagonic al genului *Trichoderma*

Genul *Trichoderma* cuprinde o serie de ciuperci saprofite care se găsesc în mod uzual în sol, pe lemnul doborât și în resturile de plante. *Trichoderma* este o ciupercă ce descompune natural celuloza și lignina, dar la un nivel mai redus. Este de asemenea binecunoscut la nivel mondial că aceasta este un agent de control biologic iar multe dintre cercetări sunt în curs de desfășurare pentru a permite accesul producătorilor la potențialul antagonistic (Bruce ș.a. 1983, 1991, Chet 1984, Comporata 1985, Davet 1983a, 1983b, Dennis și Webster 1971a, 1971b, 1971c, Highley și Ricard 1988, Lanusse ș.a. 1983, Shakeri și Foster 2007, Stasz

INTRODUCTION

Biological environments contain a certain number of microbial populations which, within a given ecological niche, display various relations ranging from symbiosis to parasitism (Alabouvette *et al.* 1983, Clubbe 1980, Davet 1996).

Researchers have been interested in these types of relations for around fifty years, especially in one very particular type of relationship: the antagonism exerted between individuals of the same microbial population.

It is particularly in the field of plant pathology that these relations find an application in controlling microorganisms associated with degradation processes (parasites of soil, fruits, leaves, seeds, vines etc.). An ample biography illustrates the interest shown in this subject and reveals that certain genera of fungus exert clear antagonism effect against a large number of other fungal species, lignicolous, wood-decaying or not. This is primarily the case for the genus *Trichoderma*, which has a very broad spectrum of action (Baker 1991, Besselat 1985, Butt *et al.* 2001, Cavalcante *et al.* 1981, Corbaz 1990, Dubos 1985, Dik and Elad 1999, Hjeljord *et al.* 2000, Jin *et al.* 1992, Morris *et al.* 1986, Smith *et al.* 1990, Van der Steen *et al.* 2003, Wilson 1997).

These antagonism phenomena are therefore of definite interest in biological control and particularly in protecting wood from destructive biological agents such as basidiomycetes, which cause wood decay, and *Fungi Imperfecti* and ascomycetes, which cause blue stain and soft rot (Clausen *et al.* 2007, Idwan Sudirman *et al.* 1992, Vanneste *et al.* 2002).

The research undertaken on lignicolous antagonistic microorganisms to date shows that there are probably some possibilities for using these phenomena in wood protection (Bruce *et al.* 1983, 1991, Freeman *et al.* 2003; Freitag *et al.* 1991, Harman and Stasz 1989, Hiratsuka *et al.* 1994, Morris *et al.*, 1986, Yang *et al.*, 1993, 1999, 2007a, 2007b, 2007c, 2009), one of the major advantages being that they avoid the need to use certain pesticides that have some health-related and environmental drawbacks. At the moment, wood preservation is carried out in a normative regulatory context using rules (national laws, EU directives such as the Biocidal Products Directive 98/8/EC, ISO, EN and NF standards, etc) that guarantee a high level of human and environmental protection from chemicals.

Antagonistic Effect of the Genus *Trichoderma*

The genus *Trichoderma* comprises a set of imperfect saprophytic fungi commonly found in soil, on dead wood and in plant debris. *Trichoderma* is a fungus that naturally decomposes cellulose and, to a lesser degree, lignin. It is also the world's best known biological control agent and a great deal of research work is under way to give producers access to its antagonistic potential (Bruce *et al.* 1983, 1991, Chet 1984, Comporata 1985, Davet 1983a, 1983b, Dennis and Webster 1971a, 1971b, 1971c, Highley and Ricard 1988, Lanusse *et al.* 1983, Shakeri and

ș.a. 1988).

Astăzi, rolul pe care îl au agenții biologici, aducând în discuție substanțele antibiotice inhibitive sau distructive, evidențiază un anumit potențial pentru utilizarea lor în controlul microorganismelor asociate cu astfel de procese de degradare (Evans 2003, Land ș.a. 1987, Stilwell ș.a.1973).

În scopul găsirii unei noi modalități de protecție a stâlpilor din lemn, mai ecologică, CIRAD și Hydro-Québec au realizat un studiu al fenomenelor implicate în interacțiunile antagonice.

Acest studiu a urmărit să ajute la dezvoltarea unui mod de a verifica eficacitatea unor ciuperci antagoniste din genul *Trichoderma* împotriva basidiomycetelor care atacă lemnul stâlpilor din HydroQuébec.

Studiul desfășurat de HydroQuébec și CIRAD a constatat în două tipuri de experimente: 1) în vase Petri pentru a evalua și caracteriza capacitatea antagonică a *Trichoderma* asupra ciupercilor de putregai alb și brun ; 2) pe piese prelevate din stâlpi netratați, pentru a studia confruntarea între basidiomycete și specii antagoniste în lemn.

METODĂ ȘI MATERIALE

Materiale

Epruvete din stâlpi netratați

S-au luat probe cu diametrul de 5mm și lungimea de 5cm din miezul stâlpilor din alburn de pin roșu, netratați.

Alegerea ciupercilor

Ciupercile de putregai alese la CIRAD dintr-o colecție de specii pure au fost ciupercile de putregai alb *Pycnoporus sanguineus*, o ciupercă din clasa basidiomycete din zona tropicală și *Coriolus versicolor*, din zona temperată și două ciuperci de putregai brun, *Antrodia* sp., o ciupercă basidiomycete din zona tropicală și *Coniophora puteana* din zona temperată.

Aceste patru ciuperci, toate basidiomycete, au fost alese pentru potențialul lor recunoscut de degradare și modul de acțiune.

Organismele saprofite antagoniste au fost trei tipuri din genul *Trichoderma*: *Trichoderma konigii*, *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride* provenite de la Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), Utrecht, Olanda. Acțiunea antagonică a acestor ascomycete a fost deja demonstrată.

Metoda

Confruntarea directă "Basidiomycete/Antagoniste" în vase Petri

Coloniile de organisme antagonice din cele trei tipuri au fost expuse la atacul miceliului fiecăruia dintre tipurile de ciupercile de putregai, fiind studiate următoarele variante:

- într-un vas Petri cu diamterul de 10 cm conținând 20 ml de mediu steril de agar și malț (20/40), la un pH de circa 6, au fost inoculate două micelii separat, la 60 mm unul față de altul și simetric față de centrul vasului. Acestea au fost cât mai mici posibile și au provenit din culturi pure de câteva zile. Confruntarea s-a produs în etuve la 27°C;

Foster 2007, Stasz *et al.* 1988).

Today, the role played by biological agents, bringing into play inhibitive or destructive antibiotic substances, reveals a certain potential for their use in controlling microorganisms associated with such degradation processes (Evans 2003, Land *et al.* 1987, Stilwell *et al.*1973).

In order to find a new, more environment-friendly way of protecting wood poles, CIRAD and Hydro-Québec carried out a study of the biological phenomena involved in antagonistic interactions.

This work was intended to help develop a way to verify the effectiveness of antagonistic fungi of the genus *Trichoderma* against basidiomycetes attacking the wood of HydroQuébec poles.

The work undertaken by HydroQuébec and CIRAD involved two types of experiment: 1) in Petri dishes to assess and characterize the antagonistic capacity of *Trichoderma* against white rot and brown rot fungi; 2) on pieces of wood taken from untreated poles in order to study confrontation between the basidiomycete and the antagonistic strain directly in wood.

METHOD AND MATERIALS

Materials

Samples From Untreated Poles

Core samples measuring 5 mm in diameter and around 5 cm in length were taken from the sapwood of untreated red pine poles.

Choice of Fungi

The wood-decay fungi chosen from a collection of pure strains at CIRAD were two white rot fungi, *Pycnoporus sanguineus*, a basidiomycete from the Tropics and *Coriolus versicolor*, from a temperate zone, and two brown rot fungi, *Antrodia* sp., a basidiomycete from the Tropics and *Coniophora puteana* from a temperate zone.

These four fungi, all basidiomycetes, were chosen for their known wood decaying abilities and mode of action.

The antagonistic saprophytic organisms were the three strains of the genus *Trichoderma*: *Trichoderma konigii*, *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride* from the Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), Utrecht, The Netherlands. The antagonistic action of these ascomycetes had already been demonstrated.

Method

Direct "basidiomycete/antagonist" confrontation in Petri dishes

Colonies of each of the three antagonists were exposed to the growing mycelium of each of the four strains of wood-decay fungi and studied using the following protocol:

- in a 10-cm diameter Petri dish containing 20 ml of sterile Malt-Agar medium (20/40), at a pH of around 6, two inoculates were deposited 60 mm apart, symmetrically in relation to the centre of the dish. The inoculates had to be as small as possible and came from pure cultures only a few days old.

- în zilele următoare inoculării a fost măsurată creșterea radială a fiecărei ciuperci și a fost comparată cu proba martor dezvoltată individual în vas Petri. Măsurarea s-a făcut zilnic, la o oră fixă, timp de 7 zile;

- fiecare dintre datele înregistrate s-au obținut din valoarea medie a măsurătorilor efectuate în 60 de vase Petri (5 probe de același fel sau vase x 4 basidiomycete x 3 antagoniste = 60 vase).

Studiu asupra capacității de atac a Trichoderma asupra basidiomycetelor la lemnul provenit din stâlpi din HydroQuébec

Acest studiu a constatat în principal din determinarea capacității de putrezire a lemnului la două fungi asociate (basidiomycete și cea antagonistă), fiecare fiind inoculată într-o anumită ordine. Tratamentul preventiv a fost simulat în acest studiu prin adoptarea unei succesiuni antagonistă-basidiomycete.

Motivul pentru care s-a făcut tratamentul preventiv a fost acela de a verifica dacă unul sau mai multe ciuperci antagoniste utilizate indică vreun efect inhibitiv asupra basidiomycetelor atunci când sunt aplicate pe lemn. Deși testele efectuate în timpul acestui experiment au fost mult simplificate, ele rămân esențiale și valabile, întrucât reproduc condiții foarte apropiate de cele naturale.

Determinarea capacității de degradare asupra lemnului

Capacitatea unei ciuperci de degradare a lemnului este definită în mod uzual prin pierderea de masă a probelor din lemn expuse după o anumită perioadă de timp.

Metoda constă în inocularea ciupercii sau ciupercilor de testare pe probe de lemn cu masă inițială uscată cunoscută, apoi incubarea acestora în condiții controlate de temperatură și umiditate.

După incubare se determină masa finală a probelor uscate și se calculează fiecare pierdere de masă.

Metoda utilizată este cea descrisă în standardul european EN 113.

Metodologie

Probele din lemn pentru testare prelevate din stâlpii de electricitate, cu masă anhidră inițială cunoscută, au fost sterilizate în autoclave.

Fiecare probă sterilizată a fost așezată pe un mediu de cultură de ciuperci antagoniste, apoi după 6 săptămâni au fost imediat așezate pe un mediu de cultură de basidiomycete.

Acest lucru a fost realizat în vase Petri: o probă/vas cu cinci probe de același tip/specie antagonică, în total 60 de vase (5 probe de același fel sau vase x 4 basidiomycete x 3 antagoniste = 60 vase). Cele 60 de vase Petri au fost așezate într-o cameră închisă la 23°C și 75% umiditate relativă.

După 6 săptămâni de expunere probele testate au fost așezate pe un mediu de cultură de basidiomycete și apoi incubate timp de 6 săptămâni. Acest lucru a fost realizat în vase Petri: o probă/vas

The confrontations were carried out in ovens at a temperature of 27°C;

- in the days following inoculation, the radial growths of each fungus were measured and compared to controls developing alone in a Petri dish. Measurements were taken each day at a fixed time for 7 days;

- each of the values recorded was a mean value from measurements taken in the 60 Petri dishes (5 replicates or dishes x 4 basidiomycetes x 3 antagonists = 60 dishes).

Study on the Antagonistic Capacity of Trichoderma Against Basidiomycetes in the Wood of HydroQuébec Poles

This study mainly consisted in determining the wood decaying capacity of an association of two fungi (a basidiomycete and an antagonist), each being successively implanted in a given order. Preventive treatment was simulated in the study by adopting an antagonist-basidiomycete sequence.

The reason for preventive treatment was to be able to verify whether one or more of the antagonists used displayed any inhibitive effect on basidiomycetes when working on wood.

Although the tests performed during this experiment were highly simplified, they remained essential and unavoidable as they were close to natural conditions.

Determination of wood decaying capacity

The wood decaying capacity of a fungus is usually defined by the weight loss it causes in wood test-pieces over a given exposure time.

The method consists in inoculating the fungus or fungi to be tested in wood test-pieces of known dry weight, then incubating them under controlled temperature and moisture conditions.

The new final dry weight of the test-pieces is determined after incubation and any weight loss is calculated.

The method we used largely came from that described in European standard EN 113.

Methodology

Test-pieces of known initial anhydrous weight, taken from electricity poles, were sterilized in an autoclave.

Each sterilized test-piece was first placed on a culture of a given antagonistic fungus, then removed after 6 weeks to be immediately placed on a basidiomycete culture.

All this took place in Petri dishes: 1 wood test-piece per dish, with five replicates per antagonistic species, i.e. 60 dishes (5 replicates x 4 basidiomycetes x 3 antagonists = 60 dishes). The 60 Petri dishes were placed in a dark chamber at 23°C and 75% relative humidity.

After the 6 weeks of "test-piece/antagonist" exposure, the test-pieces were placed on a basidiomycete culture and further incubated for 6 weeks. All this took place in Petri dishes: 1 wood test-piece infested by the antagonist per dish, with five replicates per antagonistic species, i.e. 60 dishes

cu cinci probe de același tip/specie antagonică, de exemplu 60 de vase (5 tipuri de fungi sau vase x 4 basidiomycete x 3 antagoniste = 60 vase). Cele 60 de vase Petri au fost așezate într-o cameră închisă, la întuneric, la 23°C și 75% umiditate relativă.

După cele 6 săptămâni s-a determinat masa anhidră și s-a calculat pierderea de masă ca procent din masa anhidră inițială.

Pentru a determina pierderea de masă un set de probe cu ciupercile antagoniste martor au fost supuse doar la acțiunea ciupercilor, iar alt set de probe martor basidiomycete au fost supuse doar la acțiunea ciupercilor basidiomycete. Aceste probe martor au fost utilizate, prin comparare, pentru a evalua efectul antagonic al *Trichoderma*.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

a. Confruntarea directă „Basidiomycete / Antagoniste” în vase Petri

În 50% dintre cazurile studiate *Trichoderma* s-a dezvoltat în toate vasele Petri indiferent de ciuperca basidiomycetă implicată. Basidiomycetele nu au avut timp să se dezvolte iar probele au fost relativ netede. Perechile atacate au fost cele cu *Trichoderma konigii* (Fig. 1, 2, 3 și 4), *T. harzianum*/*C. versicolor* și *T. harzianum*/*P. sanguineus* (Fig. 5 și 6).

În 25% din cazuri, creșterea ciupercilor rivale pare să fi fost încetinită atunci când acestea au fost la circa 1 cm una de cealaltă. Creșterea a continuat în toate cazurile până la contactul între cele două colonii (basidiomycete și rivalele), înregistrându-se o întrepătrundere a celor două fungii, urmată în mod uzual de oprirea creșterii celor două tipuri de fungii. Acest lucru a fost observat pentru perechile: *Trichoderma viride*/*Coniophora puteana* (Fig. 7), *Trichoderma viride*/*Coriolus versicolor* (Fig. 8) și *Trichoderma harzianum*/*Coniophora puteana* (Fig. 9).

În 17% din cazuri, scurta perioadă de întrepătrundere a ciupercilor a fost urmată de oprirea creșterii ambelor fungii. În acest caz întreaga suprafață a vasului a fost ocupată, iar ambele ciuperci, antagoniste și basidiomycete au fost blocate. Acest fenomen a afectat perechile *Antrodia* sp./*Trichoderma viride* (Fig. 10) și *Trichoderma harzianum*/*Antrodia* sp. (Fig. 11).

În 8% din cazuri, basidiomycetele au dominat situația. Pentru perechea *Pycnoporus sanguineus* / *Trichoderma viride*, mai întâi a fost înregistrat un contact între cele două colonii, urmat de întrepătrunderea și regresia *Trichoderma* (Fig. 12).

(5 replicates x 4 basidiomycetes x 3 antagonists = 60 dishes). The 60 Petri dishes were placed in a dark chamber at 23°C and 75% relative humidity.

After these 6 weeks, the final dry weight was determined: all weight losses were expressed as a percentage of the initial anhydrous weight.

In order to assess weight loss, a series of test-pieces called "antagonist controls" was subjected to antagonist action only, and another series, called "basidiomycete controls", was subjected to basidiomycete action only. These test-pieces were used, by comparison, to assess the antagonistic effect of *Trichoderma*.

RESULTS AND DISCUSSION

a. Direct "Basidiomycete / Antagonist" Confrontation in Petri Dishes

In 50% of the cases studied, *Trichoderma* developed in all the Petri dishes irrespective of the basidiomycete involved. It developed and covered the entire Petri dish. The basidiomycetes did not have time to develop and were literally smothered. The pairs concerned were all the pairs with *Trichoderma konigii* (Fig. 1 to 4), the *T. harzianum*/*C. versicolor* pairs and the *T. harzianum*/*P. sanguineus* pairs (Fig. 5 and 6).

In 25% of cases, the growth of the competing fungi seemed to slow down when they were about 1 cm from each other. Growth continued in all cases up to contact between the two colonies (basidiomycetes and antagonists) and there was interpenetration of the 2 fungi, usually followed by a halt in basidiomycete and antagonist growth. This was observed for the *Trichoderma viride*/*Coniophora puteana* (Fig. 7), *Trichoderma viride*/*Coriolus versicolor* (Fig. 8) and *Trichoderma harzianum*/*Coniophora puteana* (Fig. 9) pairs.

In 17% of cases, the short period of interpenetration was followed by a halt in the growth of both fungi. In this case, the entire available area of the dish was occupied and both fungi, the antagonist and the basidiomycete, were blocked. This phenomenon affected the *Antrodia* sp./*Trichoderma viride* (Fig. 10) and *Trichoderma harzianum*/*Antrodia* sp. (Fig. 11) pairs.

In 8% of cases, it was the basidiomycetes that dominated the situation. For the *Pycnoporus sanguineus*/*Trichoderma viride* pair, first there was a contact between the two colonies, followed by interpenetration and the regression of *Trichoderma* (Fig. 12).



Fig. 1.
Trichoderma konigii-*Coniophora puteana*.



Fig. 2.
Trichoderma konigii-*Antrodia* sp.



Fig. 3.
Trichoderma konigii-*Coriolus versicolor*.



Fig. 4.
Trichoderma konigii-*Pycnoporus sanguineus*.



Fig. 5.
Trichoderma harzianum-*Coriolus versicolor*.



Fig. 6.
Trichoderma harzianum-*Pycnoporus sanguineus*.



Fig. 7.
Trichoderma viride/Coniophora puteana.



Fig. 8.
Trichoderma viride/Coriolus versicolor.

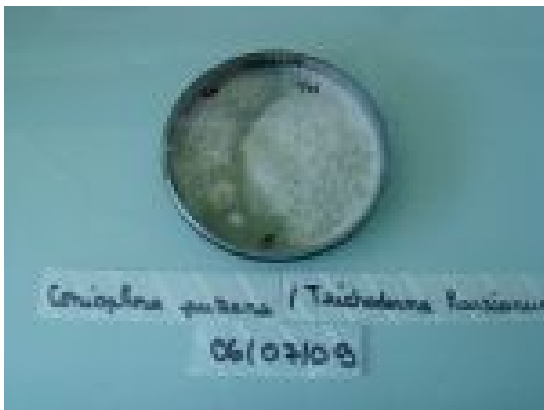


Fig. 9.
Trichoderma harzianum/Coniophora puteana.



Fig. 10.
Antrodia sp./Trichoderma viride.



Fig. 11.
Trichoderma harzianum/Antrodia sp.



Fig. 12.
Trichoderma viride/Pycnoporus sanguineus.

b. Studiu asupra capacității antagonice a *Trichoderma* asupra Basidiomycetelor la lemnul provenit de la stâlpii din HydroQuébec

Tabelul 1 indică media pierderilor de masă obținute la probele martor cu ciuperci antagoniste, martor cu basidiomycete și probele testate la basidiomycete (combinația antagoniste/basidiomycete) (Fig. 13).

b. Study on the Antagonistic Capacity of *Trichoderma* Against Basidiomycetes in the Wood Poles of HydroQuébec

Table 1 shows the average wood weight losses obtained with the antagonistic fungi alone (antagonistic controls), basidiomycetes alone (basidiomycete controls) and the test-pieces exposed to basidiomycetes (antagonists basidiomycetes) (Fig. 13).

Tabelul 1 / Table 1

Media procentuală a pierderilor de masă la probele testate după 6 săptămâni de expunere / Average weight losses as a % of all the test-pieces observed after 6 weeks' exposure

	<i>Coniophora puteana</i>	<i>Antrodia sp.</i>	<i>Coriolus versicolor</i>	<i>Pycnoporus sanguineus</i>	Epruvete martor antagoniste / Antagonist controls
<i>Trichoderma konigii</i>	3.18	0.75	1.56	1.83	1.4
<i>Trichoderma harzianum</i>	3.21	6.5	2.37	2.18	1.0
<i>Trichoderma viride</i>	3.67	0.51	1.67	2.56	0.7
Basidiomycete martor /controls	5.8	64.42	19.61	9.07	



Fig. 13.

Probă infestată cu *Trichoderma viride* și expusă la *Antrodia sp.* / Test-piece infested with *Trichoderma viride* and exposed to *Antrodia sp.*

După 6 săptămâni, probele martor pentru basidiomycete au înregistrat pierderi de masă semnificative. Aceasta a arătat că speciile de ciuperci

After 6 weeks, the basidiomycete controls globally displayed clearly significant losses. This showed that our strains were virulent on red pine.

alese au fost agresive pe pin roșu.

S-a obținut că *Antrodia* sp., o ciupercă de putregai brun de la tropice, a atacat puternic lemnul, pierderea de masă fiind de 64,42%. S-a observat că specia *Coniophora puteana*, tot o ciupercă de putregai brun dar din zona temperată, a atacat puțin lemnul de pin roșu, pierderea de masă fiind de doar 5,8%.

Ambele ciuperci de putregai alb *Coriolus versicolor* și *Pycnoporus sanguineus* au produs pierderi de masă semnificative, iar *Coriolus versicolor* a atacat lemnul mai rapid decât *Pycnoporus sanguineus*.

După 6 săptămâni ciupercile antagoniste maror au cauzat pierderi de masă neglijabile de la 0,7 la 1,4% la toate combinațiile de specii. Aceste rezultate pot fi ușor explicate prin faptul că aceste fungii din genul *Trichoderma* nu sunt fungii de degradare a lemnului.

După 6 săptămâni probele cu ciuperci antagoniste/basidiomycete au avut pierderi de masă scăzute comparativ cu basidiomycetele maror.

Un efect antagonic puternic s-a înregistrat la speciile *Trichoderma konigii* și *viride* asupra *Antrodia* sp. și *Coriolus versicolor*, pierderile de masă fiind similare cu cele de la probele antagoniste maror. În ciuda pierderilor mari de masă cu *Trichoderma harzianum*, aceasta din urmă a evidențiat un efect antagonic nesubstanțial asupra acestor două fungii.

Capacitatea fungilor *Coniophora puteana* și *Pycnoporus sanguineus* de putrezire a lemnului pare să fi fost inhibată de orice antagonistă la care sunt expuse. În acest caz pierderile de masă au fost ușor mai ridicate decât cele obținute cu probele maror antagoniste.

CONCLUZII

Confruntarea directă în vase Petri a diferitelor ciuperci de tip basidiomycete și antagoniste, luate două câte două, au evidențiat un efect antagonic pentru majoritatea perechilor de fungii luate în studiu. Se pare că *Trichoderma konigii* și *Trichoderma harzianum* au fost rivalele pentru basidiomycete. Oricum, a existat o variabilitate substanțială în reacții de la o pereche la alta. De exemplu, mecanismul antagonic al aceleiași *Trichoderma* poate varia de la o basidiomycetă la alta și viceversa aceeași basidiomycetă poate răspunde diferit la fiecare rivală la care este expusă.

Fenomenul de antagonism a fost susținut de creșterea rapidă a diferitelor *Trichoderma* și abilitatea acestora de a se dezvolta pe basidiomycete.

Atunci când experimentul a fost lăsat să continue, în fiecare vas Petri s-a ajuns la o anumită inerție, care s-a datorat probabil unei epuizări a surselor nutriționale.

Pentru moment fenomenele observate au luat în considerare noțiunile de spațiu ocupat și spațiu disponibil. Experimentele vor fi utile probabil în producția de antibiotice și alte mecanisme antagonice (studiul substanțelor difuzibile și volatile).

Testele pe lemn sunt mai concludente decât cele cu ciuperci basidiomycete/antagonist confruntate în vase Petri. Acestea au evidențiat cazuri de

We found that *Antrodia* sp., a brown rot fungus from the Tropics, significantly attacked the wood: weight loss was 64.42%. We saw that *Coniophora puteana*, also a brown rot fungus but from a temperate zone, was characterized by slow growth in red pine: weight loss only amounted to 5.8%.

Coriolus versicolor and *Pycnoporus sanguineus*, white rot fungi, both gave significant weight losses, but *Coriolus versicolor* attacked the wood faster than *Pycnoporus sanguineus*.

After 6 weeks, the antagonist controls caused low and negligible weight losses: from 0.7 to 1.4 % all strains combined. These results could be easily explained, given that these fungi of the genus *Trichoderma* are not actual wood-decay fungi and only feed off any reserve substances contained in wood.

After 6 weeks the "antagonist-basidiomycete" test-pieces caused low weight losses compared to the basidiomycete controls.

A marked antagonistic effect was found for *Trichoderma konigii* and *viride* on *Antrodia* sp. and *Coriolus versicolor*: weight losses were similar to those obtained with antagonistic fungi alone (antagonist controls). Despite the higher weight losses with *Trichoderma harzianum*, the latter still displayed a not insubstantial antagonistic effect against these two fungi.

The wood decaying capacity of *Coniophora puteana* and *Pycnoporus sanguineus* seemed to be inhibited whatever the antagonist exposed to. In this case, weight losses were slightly higher than those obtained with antagonistic fungi alone (antagonist controls).

CONCLUSIONS

Direct confrontation in Petri dishes of the different basidiomycetes and antagonists, taken two by two, effectively revealed an antagonism effect for a large majority of pairs. It seemed that *Trichoderma konigii* and *Trichoderma harzianum* were effective antagonists against basidiomycetes. However, there was substantial variability in reactions from one pair to the other. For instance, the antagonism mechanism of the same *Trichoderma* could vary from one basidiomycete to another, and inversely the same basidiomycete could respond differently to each antagonist exposed to.

The antagonism phenomenon was found to be promoted by fast growth of the different *Trichoderma* and their ability to develop on wood-decay basidiomycetes.

When the experiment was allowed to continue, a certain inertia was reached in each Petri dish, which was probably due to the exhaustion of nutritional sources.

For the moment, the phenomena observed have only taken into account the notion of available space and occupied space. Experiments ought to reveal the production of antibiotics and other antagonism mechanisms (study on diffusible and volatile substances).

The trials on wood seemed to be much clearer

antagonism, care în cazul primului experiment nu există. Este dificil să se facă o comparație referitoare la variabilitatea legată de substrat și condițiile experimentale.

În general rezultatele par să completeze alte rezultate în mod coerent. Acestea au arătat că ciupercile din genul *Trichoderma* nu au fost agresive pe lemn iar rezultatele obținute după confruntarea directă basidiomycete/antagonist în vasele Petri au fost confirmate și la lemn.

Fenomenele observate au luat în considerare doar spațiul liber și spațiul ocupat.

Studiile viitoare asupra difuzivității și substanțelor volatile vor fi utile în producția de antibiotice a antagonistelor din genul *Trichoderma*.

Dacă antagonismul are valoare științifică pentru a fi utilizat în tratamentele preventive pentru a proteja stâlpii din HydroQuébec de putregai, exeperimentările viitoare necesită testarea uneia sau mai multor specii de antagoniste (conceptul amestecului), fiecare având posibilitatea inducerii unui tip diferit de acțiune antagonică, iar experimentele pe lemn să se facă în condiții naturale pentru a verifica efectul preventiv pe lemn sănătos și curativ pe lemn degradat. Stâlpii din HydroQuébec tratați cu CCA și pentaclorfenol ar trebui inoculați cu specii de antagoniste din genul *Trichoderma* și apoi infectate la nivelul solului cu ciuperci de putregai basidiomycete.

Traducerea articolului în limba română a fost realizată de:

Sef lucrari ing. Emanuela BELDEAN.

and much more significant than those obtained with direct "basidiomycete/antagonist" confrontation in Petri dishes. They revealed cases of antagonism that did not exist in the first experiment. However, a comparison seems difficult given the variability linked to the substrate and the experimental conditions.

The results generally seemed to complete each other coherently. They showed that the group of *Trichoderma* fungi was not aggressive to wood and the results obtained after direct "basidiomycete/antagonist" confrontation in Petri dishes were confirmed in wood.

So far, the phenomena observed have only taken into account available space and occupied space. Future studies on diffusible and volatile substances ought to reveal the production of antibiotics in antagonists of the genus *Trichoderma*.

If antagonism is to have any real value for use in preventive treatments to protect HydroQuébec poles from rot, further experiments are called for, such as testing one or more species of antagonist (mixture concept), each having the possibility of inducing different types of antagonistic action, and experiments on wood under natural conditions to check preventive effects in healthy wood and curative effects in deteriorating wood. HydroQuébec poles treated with CCA and PCP would have to be inoculated with strains of *Trichoderma* antagonists, and then infected at ground level with wood-decay basidiomycetes.

BIBLIOGRAFIE / REFERENCES

- ALABOUVETTE, C., COUTEAUDIER, Y., LOUVET, J. (1983). Importance des phénomènes de compétition nutritive dans l'antagonisme entre microorganismes. Colloque de la société Française de phytopathologie, Bordeaux (France), 34: 7-16.
- BAKER, R. (1991). Diversity in biological control. *Crop Protection*, 10: 85-94.
- BESSELAT, B. (1985). Résultats obtenus par le service de la protection des végétaux dans le cadre de la lutte contre la pourriture grise de la vigne avec utilisation du *Trichoderma*. L'emploi des ennemis naturels dans la protection des cultures, p. 51-58. INRA, Paris (France).
- BRUCE, A., KING, B. (1983). Biological control of wood decay by *Lentinus lepideus* (Fr.) produced by *Scytalidium* and *Trichoderma* residues. *Material u. Organismen* 18: 171-181.
- BRUCE, A., HIGHLEY, T.L. (1991). Control of growth of wood decay Basidiomycetes by *Trichoderma* spp. and other potentially antagonistic fungi. *Forest Products Journal*, 41(2): 63-57.
- BUTT, T.M., JACKSON, C., MAGAN, N. (2001). *Fungi as Biocontrol Agents: Progress, Problem and Potential*. CABI Publishing, Wallingford, Oxon, UK. p. 398.
- CAVALCANTE, M.S., EATON, R.A. (1981). Inhibition of wood-inhabiting fungi by actinomycetes. International Research Group on Wood Protection, Document No. IRG/WP/1137.
- CHET, I. (1984). Application of *Trichoderma* as a bio control agent. In Proceedings of the 6th congrès Phytopathologie Méditerranéenne, Cairo (Egypt), p. 110-111.
- CLAUSEN, C.A., YANG, V. (2007). Protecting wood from mould, decay, and termites with multi-component biocide systems. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 59(1): 20-24.
- CLUBBE, C.P. (1980). The colonisation and succession of fungi in wood. International Research Group on Wood Protection: Document No. IRG/WP 1107.
- COMPORATA, M. (1985). Antagonisme in vitro de *Trichoderma* spp vis à vis de *Rhizoctinia solani*, INRA Paris (France), p. 613-620.
- CORBAZ, R. (1990). *Principes de phytopathologie et de lutte contre les maladies des plantes*. Presses polytechniques universitaires. Paris (France), p. 650.
- DAVET, P. (1996). *Vie microbienne du sol et production végétale*, INRA, Paris (France), p. 383.

DAVET, P. (1983a). Les Trichoderma, exemple de champignon antagoniste d'agents pathogènes. Faune et flore auxiliaire en agriculture. ACTA, INRA- ENSAM- Montpellier (France), p. 193-204.

DAVET, P. (1983b). Introduction et conservation de Trichoderma dans le sol. Les antagonistes microbiens, mode d'action et application à la lutte biologique contre les maladies des plantes. ACTA, INRA- ENSAM- Montpellier (France), p. 159-168.

DENNIS, C., WEBSTER, J. (1971a). Antagonistic properties of species-groups of Trichoderma I. Production of non-volatile antibiotics. Transactions of the British Mycological Society, 57(1): 25-39.

DENNIS, C., WEBSTER, J. (1971b). Antagonistic properties of species-groups of Trichoderma II. Production of non-volatile antibiotics. Transactions of the British Mycological Society, 57(1): 41-48.

DENNIS, C., WEBSTER, J. (1971c). Antagonistic properties of species-groups of Trichoderma III. Hyphal interaction. Transactions of the British Mycological Society, 57: 363-369.

DUBOS, B. (1985). L'utilisation des Trichoderma comme agent de lutte biologique à l'égard de deux parasites aériens: *Chondrostereum purpureum* (Pers. Ex. fr.) pouzar (plomb des arbres fruitiers) et *Botrytis cinerea* pers. (pourriture grise de la vigne. L'emploi des ennemis naturels dans la protection des cultures, INRA, Paris (France), p. 35-49.

DIK, A.J., ELAD, Y. (1999). Comparison of antagonists of *Botrytis cinerea* in greenhouse grown cucumber and tomato under different climatic conditions. European Journal of Plant Pathology, 105: 123-137.

EVANS, P. (2003). Emerging technologies in wood protection. Forest Products Journal, 53(1): 14-22.

FREEMAN, M.H., SHUPE, T.F., VLOSKY, R.P., BARNES, H.M. (2003). Past, present, and future of the wood preservation industry. Forest Products Journal, 53(10): 8-15.

FREITAG, M., MORRELL, J.J., BRUCE, A. (1991). Biological protection of wood: Status and prospects. Biodeterioration Abstracts, 5: 1-13.

HARMAN, G.E., STASZ, T.E. (1989). Combining effective strains of *Trichoderma harzianum* and solid matrix priming to provide improved biological seed treatment systems. Plant Disease, 72: 631-637.

HAYES, C.K., PETERBAUER, C., TRONSMO, A., KLEMSDAL, S., HARMAN, G.E. (1993). Antifungal chitinolytic enzymes from *Trichoderma harzianum* and *Gliocladium virens* purification, characterization, biological activity and molecular cloning. In Muzzarelli, R.A.A. (ed). Chitin Enzymology. Ancona, Italy, p.383-392.

HJELJORD, L.G., STENSVAND, A., TRONSMO, A. (2000). Effect of temperature and nutrient stress on the capacity of commercial *Trichoderma* products to control *Botrytis cinerea* and *Mucor piriformis* in greenhouse strawberries. Biological Control, 19: 149-160.

HIGHLEY, T.L., RICARD, J.L. (1988). Antagonism of *Trichoderma* spp. and *Gliocladium virens* against wood decay fungi. Material und Organism, 23(3): 157-169.

HIRATSUKA, Y., CHAKRAVARTY, P., MIAO, S., AYER, W.A. (1994). Potential for biological protection against blue stain in *Populus tremuloides* with a hyphomycetous fungus, *Stachybotrys cylindrospora*. Canadian Journal Forest Research, 24: 174-179.

IDWAN SUDIRMAN, L., IRAQI HOUSSEINI, A.I., LE FEBVRE, G., KIFFER, E., BOTTON, B. (1992). Screening of some basidiomycetes for biocontrol of *Rigidoporus lignosus*, a parasite of the rubber tree *Hevea brasiliensis*. Mycological Research, 96(8): 621-625.

JIN, X., HAYES, C.K., HARMAN, G.E. (1992). Principles in the development of biological control systems employing *Trichoderma* species against soil-borne plant pathogenic fungi. In Leatham, G.F. (ed): Symposium on Industrial Mycology, Mycological Soc. Am., Brock/Springer Series in Contemporary Bioscience, p. 174-195.

LAND, C.J., HULT, K. (1987). Mycotoxin production by some wood-associated *Penicillium* spp. Letters in Applied Microbiology, 4: 41-44.

LANUSSE, M., LUNG-ESCAVANT, B., DUBOT, B., TARIS, B. (1983). Etude in-vitro des propriétés antagonistes de 8 espèces de *Trichoderma* à l'égard de deux souches d'*Armillaria mellea*. XXIV colloque de la société Française de phytopathologie, Bordeaux (France), 34: 179-192.

MORRIS, P.I., SUMMERS, N.A., DICKINSON, D.J. (1986). The leachability and specificity of the biological protection of timber using *Scytalidium* sp. and *Trichoderma* spp. International Research Group on Wood Preservation, Document No. IRG/WP/1302.

SHAKERI, J., FOSTER, H.A. (2007). Proteolytic activity and antibiotic production by *Trichoderma harzianum* in relation to pathogenicity to insects, Enzyme and Microbial Technology, 40: 961-968.

SMITH, V.L., WILCOX, W.F., HARMAN, G.E. (1990). Potential for biological control of *Phytophthora* root and crown rots of apple by *Trichoderma* and *Gliocladium* spp. Phytopathology, 70: 880-885.

STASZ, T.E., HARMAN, G.E., WEEDEN, N.F. (1988). Protoplast preparation and fusion in two biocontrol strains of *Trichoderma harzianum*. Mycologia, 80: 141-150.

STILWELL, M.A., WALL, R.E., STRUNZ, G.M. (1973). Production, isolation and antifungal activity of scytalidin, a metabolite of *Scytalidium* sp. Canadian Journal Microbiology, 19: 597-602.

VAN DER STEEN, J.J.M., LANGERAK, C.J., VAN TONGEREN, C.A.M., DIK, A.J. (2003). Aspects of the use of honeybees and bumblebees as vector of antagonistic micro-organisms in plant disease control. In: J. Bruin, Editor, Proceedings of the Netherlands Entomological Society Meeting, Uitgeverij Nederlandse Entomologische Vereniging. Amsterdam. The Netherlands.

VANNESTE, J.L., HILL, R.A., KAY, S.J., FARRELL, R.L., HOLLAND, P.T. (2002). Biological control of sapstain fungi with natural products and biological control agents: A review of the work carried out in New Zealand. *Mycological Research*, 106(2): 228-232.

WILSON, M. (1997). Biocontrol of aerial plant diseases in agriculture and horticulture: current approaches and future prospects. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 19: 188–191.

YANG, D.Q., PLANTE, F., BERNIER, L., PICHÉ, Y., DESSUREAULT, M., LAFLAMME, G., OUELLETTE, G.B. (1993). Evaluation of a fungal antagonist, *Phaeothea dimorphospora*, for biological control of tree diseases. *Canadian Journal of Botany*, 71: 426-433.

YANG, D.Q., ROSSIGNOL, L. (1999). Evaluation of *Gliocladium roseum* against wood-degrading fungi in vitro and on major Canadian wood species. *Biocontrol Science and Technology*, 9: 409-420.

YANG, D.Q., WANG, X.M., WAN, H. (2007a). Biological protection of logs with *Gliocladium roseum* against biodegradation for panel manufacturing. *BioControl*, 52: 559-571.

YANG, D.Q., WANG, X.M., WAN, H. (2007b). Biological treatment of aspen strands to improve mold resistance and reduce resin consumption of strand boards. *Forest Products Journal*, 57(7/8): 58-62.

YANG, D.Q., WANG, X.M., WAN, H. (2007c). Use of fungal metabolites to protect wood based panels against mold infection. *BioControl*, 52: 427-436

YANG, D.Q. (2009). Biological Treatment to Improve Wood Product Quality and Durability – Fifteen Years of Effort and Experience at FPInnovations-Forintek Division. International Research Group on Wood Preservation, Document No. IRG/WP 09-40444.