

# Physisporinus vitreus

**Chris Stührk**

Doktorand Empa, St. Gallen

**Matthias Jörg Fuhr**

Doktorand D-BAUG, ETH Zürich

**Hans J. Herrmann**

**Francis W.M.R. Schwarze**

**Mark Schubert**

Holzschutz und Biotechnologie

Empa, St. Gallen

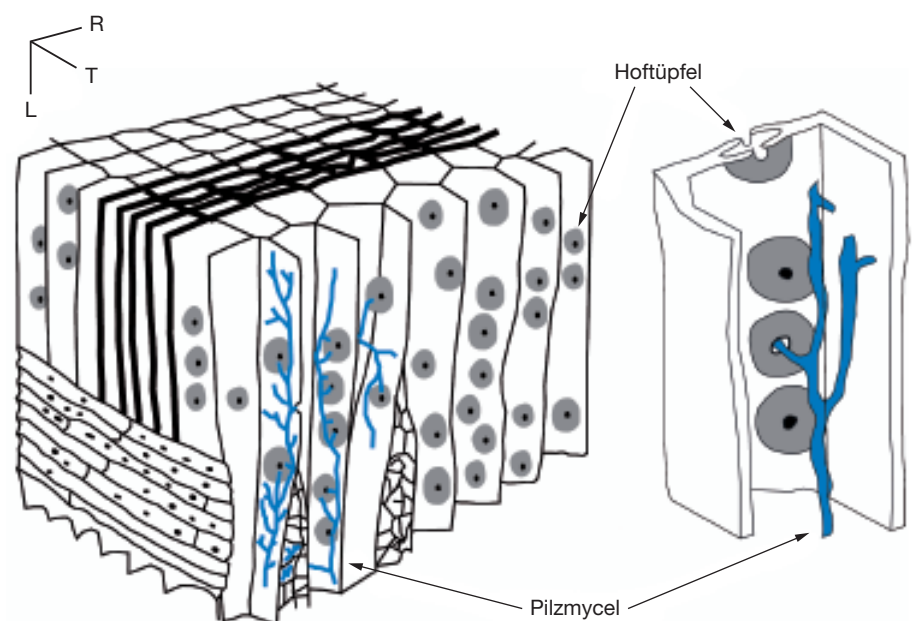
[chris.stuehrk@empa.ch](mailto:chris.stuehrk@empa.ch)

Das biotechnologische Verfahren «Bioincising» beruht auf dem kontrollierten Einsatz des Weissfäulepilzes *Physisporinus vitreus*, der durch den Abbau der verschlossenen Hoftüpfel (Tori) die Permeabilität von Fichten- und Tannenkernholz erhöht. Die erhöhte Permeabilität des Kernholzes verbessert deutlich die Aufnahmefähigkeit, Verteilung und Eindringtiefe von Holzschutzmitteln und anderen Holzveredelungssubstanzen. Für einen effizienten und optimierten biotechnologischen Einsatz von *Physisporinus vitreus* werden in einer Kooperation zwischen der Empa in St. Gallen und der ETH Zürich erstmalig das Hyphenwachstum und die Effekte von *P. vitreus* im Fichtenholz mit diversen Visualisierungstechniken intensiv untersucht und für die Entwicklung eines Pilzwachstumsmodells genutzt. Durch Kombinieren von experimentellen Daten und Computersimulationen lässt sich der biotechnologische Einsatz von *P. vitreus* weiter optimieren.

Aufgrund der Tatsache, dass die natürliche Dauerhaftigkeit von Fichten- und Tannenholz sehr begrenzt ist, wird für zahlreiche Einsatzbereiche ein chemischer Holzschutz vor Holz zerstörenden oder verfärbenden Pilzen nötig. Ausserdem gibt es zunehmend Bestrebungen, ausgewählte Holzeigenschaften mit speziellen Oberflächenveredelungen bzw. Oberflächenmodifizierungen gezielt zu verbessern. Allerdings sind beide Holzarten nur sehr schwer mit Holzschutzmitteln und anderen Holzveredelungssubstanzen imprägnierbar. Sobald Luft in die Tracheiden eintritt – sei es durch eine Verletzung oder eben im Zuge des Trocknens von gerantetem Holz –, legt sich der verdickte Teil (Torus) der Tüpfelmembran (Margo) gegen die Öffnung in der Zellwand (Porus) und verschliesst diese irreversibel. In der Vergangenheit wurden diverse mechanische Perforationsverfahren entwickelt, die eine bessere und tiefere Verteilung von Holzschutzmitteln bewirken [1].

Das Incising-Verfahren ist der Vorläufer des Bioincising. Wird beim Inci-

sing auf mechanischem Wege durch Bohr- und Schlitzperforation senkrecht zur Faserichtung die Permeabilität des Holzes erhöht, geschieht dies beim Bioincising mit Hilfe des Weissfäulepilzes *Physisporinus vitreus*. Die Hyphen des Pilzes lösen dabei enzymatisch die im Kernholz verschlossene Margo der Hoftüpfel auf. Die dadurch verbesserte Aufnahme verschiedener Holzmodifikationssubstanzen wurde in einer umfassenden Studie bestätigt [2]. Eine weitere Anwendung des Pilzes ist die Produktion von hochwertigem Geigenklangholz, das sich durch enge Jahrringe auszeichnet, die besonders durch kaltes Klima in Hochlagen hervorgerufen werden [3]. Mit neu entwickelten Visualisierungstechniken in Kombination mit einem Pilzwachstumsmodell [4] ist es möglich, einen tieferen Einblick in das komplexe System Pilz-Holz zu bekommen und wichtige Schlüsselprozesse zu identifizieren, die es erlauben, den biotechnologischen Einsatz von *P. vitreus* zu optimieren [5]. Im Folgenden werden einige dieser Techniken mit ihren Vor- und Nachteilen sowie das Pilzwachstumsmodell näher erläutert.



Schematische Darstellung des Besiedlungsmusters von *Physisporinus vitreus* im Fichtenkernholz.

## Environmental Scanning Electron Microscopy

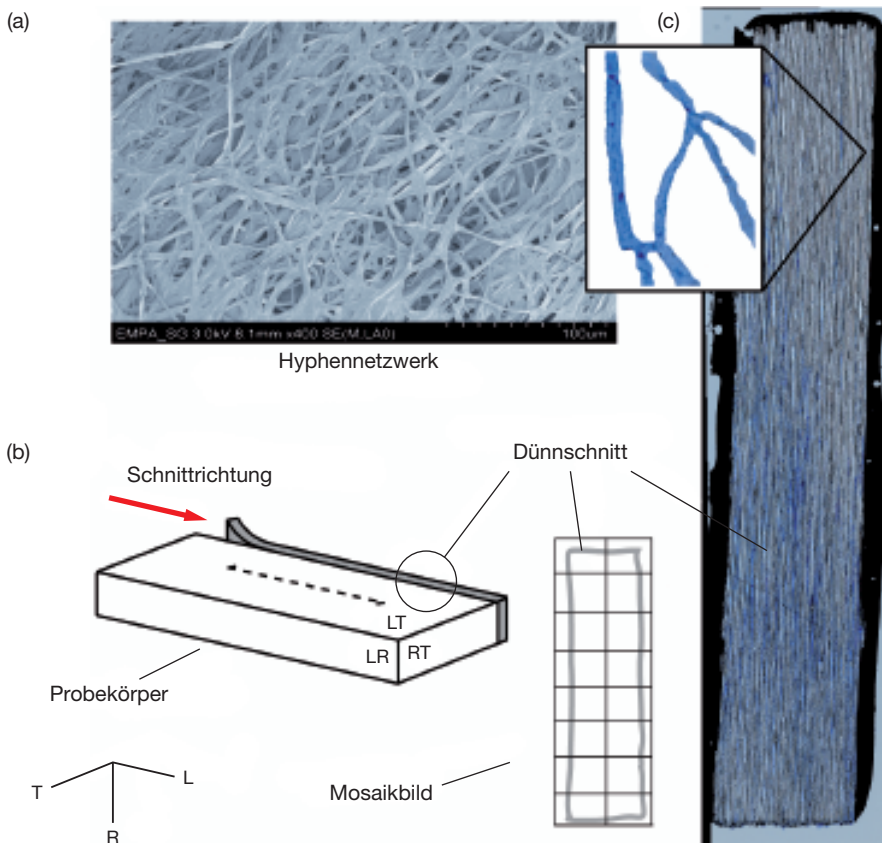
ESEM (Environmental Scanning Electron Microscopy) ist eine spezielle Variante der klassischen REM-Mikroskopie, die sich durch höheren Druck (schwächeres Vakuum) und höhere Luftfeuchtigkeit auszeichnet. Lebende Proben werden daher nicht so stark ausgetrocknet wie im REM. ESEM-Aufnahmen des Pilzes zeigen jedoch, dass das Hyphennetzwerk von *P. vitreus* unter diesen Bedingungen kollabiert und abstirbt. Dreidimensionale Rekonstruktionen sind nicht möglich, da nur die Oberfläche einer Probe abgescannt wird. Für die klassische Lichtmikroskopie

wurden Holzdünnschnitte (10 x 5 x 0,03 mm) aus mit *P. vitreus* inkubierten Holzkörpern mit einem Schlittenmikrotom von jeder der drei Orientierungen (radial, tangential, longitudinal) hergestellt und die Pilzhypen mit Lactophenolblau angefärbt. Mosaiken von 1,5 mm<sup>2</sup> werden mit Hilfe einer Software (AxioVision) zusammengesetzt. Bis zur Dicke von ca. 30 µm sind unter einem Lichtmikroskop Strukturen erkennbar. Eine dreidimensionale Bildgebung ist aber auch mit dieser konventionellen Methode nicht möglich, da alle Bildebenen auf eine Ebene projiziert werden, was zu unscharfen Aufnahmen führt.

## Konfokale Laserscanning-Mikroskopie

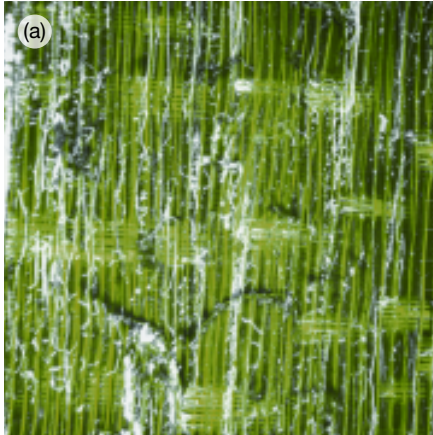
Die konfokale Mikroskopie dagegen bietet einige Vorteile im Vergleich zur klassischen Lichtmikroskopie, wie Kontrolle der Tiefenschärfe und Reduktion von Hintergrundinformationen ausserhalb der Fokusebene (die sonst zu einer Verzerrung des Bildes führen) sowie die Möglichkeit, seriell optische Schnitte von Proben zu sammeln [6]. Dünnschnitte wurden wie jene für die Lichtmikroskopie angefertigt, jedoch mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Alexa Fluor 633 + WGA) gefärbt, das über Agglutinin spezifisch Chitinbestandteile der pilzlichen Zellwand anfärbt [7]. Die Anregungen von Holz und Pilzhypen kann gleichzeitig stattfinden, sofern die Anregungs- und Emissionswellenlängen sich nicht überlappen. Holz wird daher bei 405 nm (UV-Diodenlaser) angeregt und die mit Alexa Fluor gefärbten Hypen bei 632 nm (HeNe-Laser).

Die emittierte Fluoreszenz von Holz und Pilz wird mit einem Photodetektor aufgefangen und davon rasterartig Punkt für Punkt ein Bild aufgezeichnet. Da ein Voxel eine physikalische Ausdehnung von 1,464844 x 1,464844 x 1,790948 µm in x-, y- und z-Richtung besitzt, ist eine schwache Elongation in z-Richtung im fertigen Tomogramm zu beobachten, die jedoch softwaremässig korrigiert werden kann. Ein z-Stapel besitzt eine maximale x-, y-Ausdehnung von 1,5 mm<sup>2</sup> (1024 px x 1,464844) und in z-Richtung von 150 µm. Mosaiken von z-Stapeln können zusammengesetzt werden (XuvTools) und Berechnungen wie der Biomasse, Hyphenausdehnung, Verzweigung mit Imaris durchgeführt werden. Allerdings sind Zellschäden aufgrund der breiten Autofluoreszenz des Holzes nicht immer klar erkenntlich und die Bildbearbeitungszeiten (image processing) steigen exponentiell mit der Anzahl von z-Stapeln.

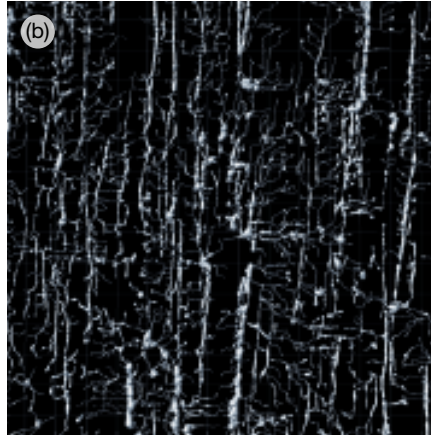


### ESEM / LM

Nachweis von *Physisporinus vitreus* auf einer ESEM-Aufnahme (a), Holzprobekörper, der mit *Physisporinus vitreus* inkubiert wurde (b), Mosaikaufnahmen (LM) des Dünnschnitts aus dem Probekörper (b) und fertige Rekonstruktion der 2D-Mosaiken, Hyphen (blau) (c).



LR-Schnitt: Holzfluoreszenz (grün), Hyphen (weiss) (a), nach Segmentierung fertige 3D-Struktur des Hyphengeflechts (b).



## Synchrotron-Tomographie

Die Synchrotron Lichtquelle TOMCAT befindet sich am PSI. Ihr Licht liefert ein 2,9 T superbeugender Magnet mit einer kritischen Energie von 11,1 keV. In der Standardkonfiguration beherbergt die TOMCAT-Endstation den Strahlenkonditionierungsblock, den Probenmanipulator sowie ein Mikroskop. Der Standarddetektor bietet ein Blickfeld von 0,75 mm<sup>2</sup> bis 12,1 mm<sup>2</sup> mit einer Voxel-Auflösung von 0,37 µm bis 5,92 µm [8]. In geringer Auflösung lassen sich Probekörper mit Abmessungen von 2,5 x 2,5 x 10 mm und in hoher Auflösung mit Abmessungen von 0,4 x 0,4 x 10 mm tomographieren. Tomogramme wurden entweder im Phasenkontrast oder im Absorptionsmodus durchgeführt. Im Phasenkontrast sind Details etwas schärfer abgebildet und in der höchsten Auflösung lassen sich alle relevanten Holzdetails darstellen, wie etwa einfache Tüpfel. Da die Hyphen wie auch die Holzstrukturen anhand ihrer Dichte durch entsprechende Grauwerte im resultierenden Tomogramm repräsentiert werden, ist somit eine Segmentierung von Hyphengewebe allenfalls aufgrund anatomischer Merkmale möglich. Im Vergleich

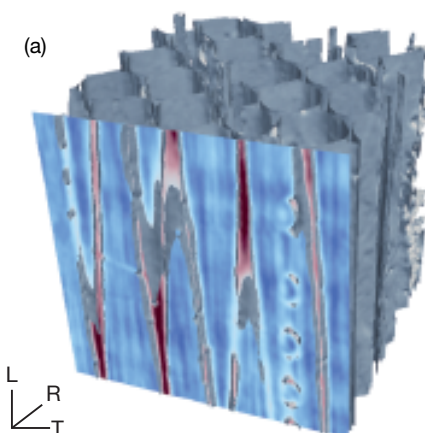
zur konfokalen Mikroskopie scheinen auch dünne, einzelne Hyphen aufgrund ihrer geringen Röntgendichte schlecht abgebildet zu werden.

## Modellierung des Pilzwachstums

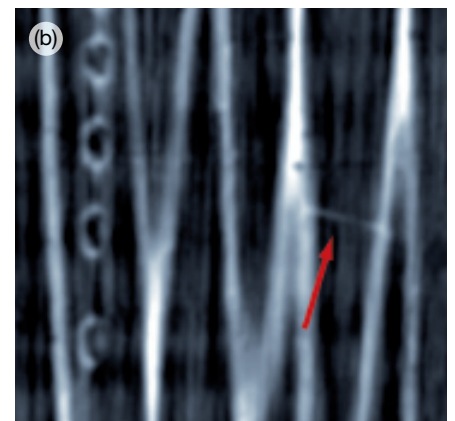
Die Ergebnisse der Visualisierung bilden die Grundlage des nachfolgend skizzierten Pilzwachstumsmodells. Inspiriert durch den selektiven Abbau der Hof-tüpfel im Anfangsstadium des Wachstums von *P. vitreus* im Fichtenkernholz wird ein Tüpfel-zu-Tüpfel-Wachstum des Pilzes

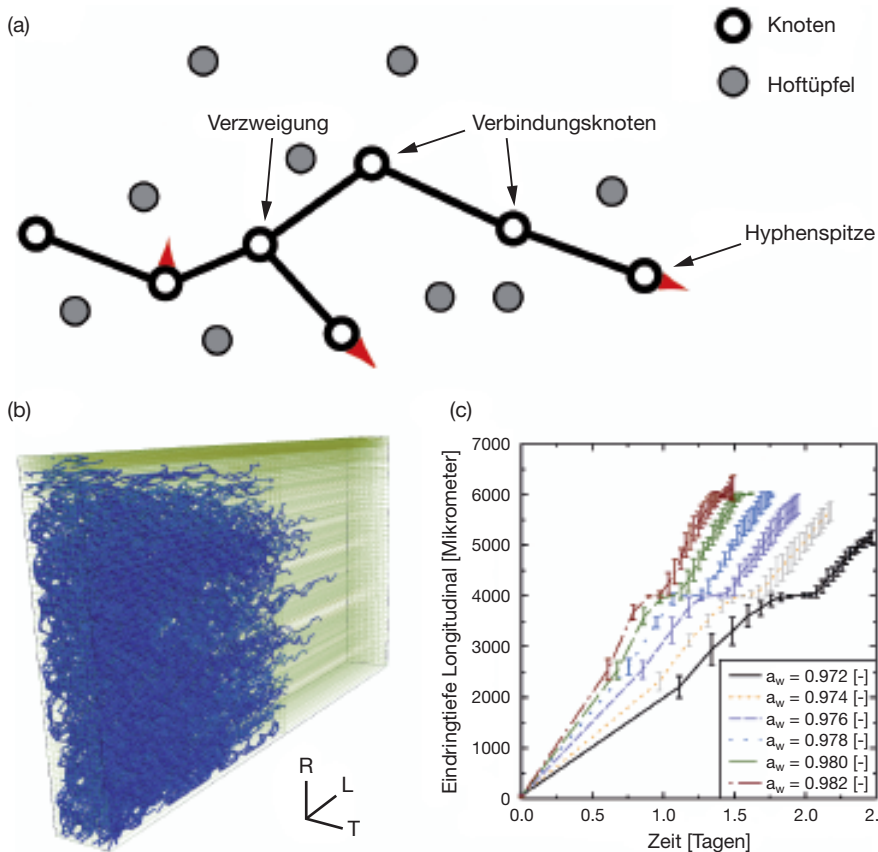
vorgeschlagen. Dabei wird im Modell die komplexe dreidimensionale Holzstruktur lediglich durch die Tüpfel repräsentiert und somit stark vereinfacht. Die Tüpfel sind die Verbindungen zwischen den Poren im Holz (Tracheiden und Holzstrahlen) und als die Hauptwachstumspfade des Pilzes bekannt. Das Myzel des Pilzes wird durch ein Netzwerk von Knoten und Verbindungen gebildet. Die Position der Knoten ist dabei an die Position der Tüpfel gebunden. Alle Modellgrößen wie z.B. die Nahrungsmenge und die Polarisierung der Pilzhyphen sind auf den Knoten und auf den Tüpfel definiert. Die Dynamik des Pilzwachstums wird modelliert, indem Prozesse wie Nahrungsabbau, Nahrungs-transport und Hyphenwachstum auf dem Pilznetzwerk durchgeführt werden.

Zu Beginn einer Simulation sind alle Tüpfel verschlossen. Durch das Wachstum des Pilzes werden die Tüpfel abgebaut und dem Pilz Nahrung zugeführt. Dabei nehmen wir an, dass der Pilz eine gewisse Nahrungsmenge benötigt, um durch einem aspirierten und lignifizierten Tüpfel von einer Tracheide zur nächsten zu wachsen. Wir stellen fest, dass sich der Pilz das Substrat schrittweise erschliesst – es wechseln sich also Phasen von schnellem und langsamem Pilzwach-



Synchrotron-Tomographie erlaubt die Quantifizierung von Zellwandschäden (a) und eine Identifizierung möglicher Hyphen, die sich aufgrund des geringen Kontrastes nicht automatisch segmentieren lassen (b).





**Schematische Tüpfelverteilung und Hyphennetzwerk (a), Simulation der Penetration von Hyphen in Holzprobekörper (b) und Eindringtiefe der Hyphen in Abhängigkeit von verschiedenen Wasseraktivitätswerten (c).**

tum ab [4]. In Kombination mit den Labor-experimenten können nun Messgrößen wie z.B. die Eindringtiefe des Pilzes ins Holz näher untersucht und optimiert werden.

## Fazit

Mit den Synchrotron Röntgenstrahlen (TOMCAT) lassen sich die Einwirkungen des Pilzes auf das Holz hervorragend visualisieren (Paraview) und mit speziellen Matlab-Skripten automatisiert auswerten. Die konfokale Mikroskopie dagegen erlaubt die Visualisierung des Hyphennetzwerkes weitestgehend *in vivo* sowie Berechnungen der Biomasse, Verzweigung, Geschwindigkeit mit einer geeigneten Visualisierungssoftware (Imaris). Beide Methoden zusammen ergeben ein Werkzeug, mit dem das Pilzwachstums-

modell sich verfeinern lässt. In einem rückkoppelnden Prozess können die Ergebnisse aus den Computersimulationen des Modells zu einer weiteren Optimierung der Prozessbedingungen führen. In einem weiteren Schritt sollen Echtzeitaufnahmen mit transgenen selbstfluoreszierenden *P. vitreus*-Isolaten durchgeführt werden.

## Dank

Wir danken dem SNF für die finanzielle Unterstützung des Projekts (Nr. 205321-121701). Zudem geht unser Dank an F. Marone, P. Modregger für die Unterstützung am TOMCAT und J. Hehl (Light Microscopy Center der ETH) für Ratschläge am konfokalen Mikroskop. Und speziell danken wir H. Véléz (SLU, Uppsala) für seine Hilfestellungen in der Materie der Pilzgentechik.

## Literatur

- [1] Perrin P.W.: Review of Incising and Its effects on Strength and Preservative Treatment of Wood. *Forest Products Journal*. 28. 9. 1978. 27–33.
- [2] Schubert M., Volkmer T., Lehringer C., Schwarze F.W.M.R.: Resistance of bioincised wood treated with wood preservatives to blue-stain and wood-decay fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation*. xxx. 2010. 1–8. doi:10.1016/j.ibiod.2010.10.003
- [3] Schwarze F.W.M.R., Spycher M., Fink S.: Superior wood for violins – wood decay fungi as a substitute for cold climate. *New Phytologist*. 179. 2008. 1095–1104. doi: 10.1111/j.1469-8137.2008.02524.x
- [4] Fuhr M.J., Schubert M., Schwarze F.W.M.R., Herrmann H.J.: Modeling hyphal growth of the wood decay fungus *Physisporinus vitreus*, submitted to *Fungal Biology*, arXiv:1101.1747
- [5] Lehringer C., Hillebrand K., Richter K., Arnold M., Schwarze F.W.M.R., Militz H.: Anatomy of bioincised norway spruce wood. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 64: 2010. 346–355. doi:10.1016/j.ibiod.2010.03.005
- [6] Claxton N.S., Fellers T.J., Davidson M.W.: Laser scanning confocal microscopy. *Department of optical and digital imaging, National High Magnetic Field Laboratory, The Florida State University, Tallahassee, Florida 32310*. 2006. <http://www.olympusconfocal.com/theory/LSCMIntro.pdf>
- [7] Stührk C., Fuhr M., Schubert M., Schwarze F.W.M.R.: Analyzing hyphal growth of the bioincising fungus *Physisporinus vitreus* with light-, confocal laser scanning- and, Synchrotron X-ray tomographic microscopy. 2010. *International Group on Wood Preservation*. IRG 1020438. Biarritz, France
- [8] Marone F., Hintermüller C., McDonald S., Abela R., Mikuljan G., Isenegger A., Stamparoni M.: X-ray tomographic microscopy at TOMCAT. *Journal of Physics: Conference Series* 186. 2009. 012042. 1–3. doi: 10.1088/1742-6596/186/1/012042