

MARIA RUDAWSKA, KRYSZYNA PRZYBYŁ, KRYSZYNA BOJARCZUK

## Antagonizm grzybów z rodzaju *Trichoderma* w stosunku do patogena *Phytophthora cinnamomi* Rands wywołującego zgorzel korzeniową na sadzonkach roślin wrzosowatych\*

### Abstract

Rudawska M., Przybył K., Bojarczuk K. 1991. Antagonism of *Trichoderma* spp. against *Phytophthora cinnamomi* Rands causing root rot of *Ericaceae* cuttings. *Arbor. Kórnickie*, 36: 81–95.

Strains of *Trichoderma viride* and *T. harzianum* were tested for production of non-volatile and volatile antibiotics. Severe inhibition of mycelial growth of root rot pathogen *P. cinnamomi* was induced by antibiotics produced by the above mentioned *Trichoderma* strains. The susceptibility of *P. cinnamomi* to these antibiotics revealed great variation. The most active strains *T. viride* 29 and *T. harzianum* 33 were selected and further examined. Preliminary studies of the chloroform soluble and peptide antibiotics from selected strains of *Trichoderma* spp. confirmed their high activity against the tested pathogen. Microscopic examination of the influence of both groups of antibiotics on the growth of *P. cinnamomi* revealed obvious morphological changes of the affected mycelia. The hyphae were generally degenerated: more branched, thicker than normal, with stronger vacuolation and with tendency for spore-like cells formation.

*Additional keywords:* biological control, non-volatile and volatile antibiotics.

*Address:* M. Rudawska, K. Przybył, K. Bojarczuk, Institute of Dendrology, 62-035 Kórnik, Poland.

### WSTĘP

Zgorzel korzeni roślin wrzosowatych jest groźną chorobą obserwowaną w Polsce zarówno w niektórych parkach i ogrodach, jak również w szkółkach produkcyjnych, między innymi na gatunkach z rodzaju *Rhododendron*, *Calluna* i *Erica* (Świąch, 1980; Świąch i Górska-Poczopko, 1984). Choroba zaczyna się odbarwieniem i więdnieniem liści, później więdną i zamierają całe rośliny, a przy ukośnym przecięciu łodygi zauważyć można brązowo-czarne

\* Praca finansowana w ramach problemu MR II-16, koordynowanego przez Instytut Dendrologii PAN w Kórniku.

zabarwienie tkanki przewodzącej (Świąch, 1980). Do grzybów zgorzelowych szczególnie trudnych w zwalczaniu należy gatunek *Phytophthora cinnamomi* Rands, powodujący zgniliznę podstawy pnia, jak również gnicie korzeni. Powszechnym, choć nie do końca skutecznym, sposobem zapobiegania rozpowszechnianiu się zgnilizny na korzeniach, jest stosowanie różnych fungicydów (Bortus i Wood, 1977, 1979; Bojarczuk i Rudawska, 1989). W ochronie roślin zielnych, a także drzew i krzewów przed chorobami grzybowymi, stosuje się ostatnio coraz powszechniej walkę biologiczną. Wykorzystuje się w niej antagonistyczne w stosunku do patogena gatunki grzybów np. z rodzaju *Trichoderma* (Papavizas, 1985). Dane na temat istnienia antagonizmu pomiędzy *Trichoderma* spp. i *P. cinnamomi* są nieliczne i kontrowersyjne (Anderson, 1964; Reeves, 1975; Kelley, 1976). Celem pracy były więc testy fizjologiczne i obserwacje mikroskopowe, stanowiące próbę wstępnego określenia w warunkach *in vitro* charakteru antagonizmu pomiędzy *Trichoderma* spp. i *P. cinnamomi*. Uzyskane wyniki stanowiły podstawę dla dalszych badań prowadzonych w szklarni, mających na celu wykorzystanie wybranego szczepu *Trichoderma* sp. w kombinacji z fungicydami w ochronie sadzonek wrzosów, wrzośców i różaneczników przed zgnilizną korzeniową (Bojarczuk i in., 1991).

#### MATERIAL I METODY

**Kultury grzybowe.** Szczepy grzybów *Trichoderma viride* Pers. ex. Fr. i *Trichoderma harzianum* Rifai nr 23–27 otrzymano od dr Małgorzaty Mańka z Akademii Rolniczej w Poznaniu, natomiast szczepy 28–34 otrzymano od dr O. Kamoen z Rijksstation voor Plantenziekten w Merelbeke w Belgii. Szczep *Phytophthora cinnamomi* Rands wyizolowany z różanecznika otrzymano od dr L. Orlikowskiego z Instytutu Warzywnictwa i Kwaciarstwa w Skierniewicach. Grzyby hodowano na skosach, na pożywce Malt Extract Broth (Difco) – agar 0.9%, pH 4.7, a przed doświadczeniem wyszczepiano je na taką samą pożywkę na szalki Petriego.

**Biotest na antybiotyki nietotne.** Antybiotyki nietotne produkowane przez szczepy *Trichoderma* spp. badano stosując zmodyfikowaną metodę opisaną przez Denisa i Webstera (1971a). W tym celu szalki Petriego napełniano 15 ml pożywki Malt Extract Broth (agar 0.9%). Na powierzchnię agaru nakładano uprzednio dokładnie wymyty, sterylny krążek o średnicy 55 mm, wycięty z woreczka dializacyjnego. Na środek krążka wyszczepiano inokula o średnicy 6 mm wycięte korkoborem z brzegowej strefy 7-dniowych kultur testowanych szczepów *Trichoderma* spp. Tak zaszczepione szalki inkubowano 30 godzin w temperaturze 24°C. Po tym czasie krążki dializacyjne wraz

z rosnącymi na nich kulturami *Trichoderma* sp., które osiągnęły średnicę około 2 cm, usuwano i zaszczepiano agar kulturą grzyba *P. cinnamomi*. Po dwóch dniach rozpoczęto pomiary wzrostu radialnego inokulum *P. cinnamomi* i prowadzono je przez następne 4 dni. Kontrolę stanowiły szalki, na które wyłożono krążki z woreczka dializacyjnego, ale nie zaszczepiono ich grzybem *Trichoderma* sp.

**Ekstrakcja antybiotyków z płynnej kultury *Trichoderma viride*.** Do doświadczenia zastosowano szczep *T. viride* nr 29, który w teście szalkowym na nietlotne antybiotyki okazał się najbardziej aktywny w hamowaniu wzrostu patogena *P. cinnamomi*. Zastosowano metodę opisaną przez Denisa i Webstera (1971a). Po dwa inokula grzybni *T. viride* wyszczepiono do 10 kolbek Erlenmeyera, zawierających po 100 ml płynnej pożywki Malt Extract Broth (pH 4.7) i umieszczono na wytrząsarce w temp. 24°C. Po 5 dniach hodowli, kiedy grzybnia *T. viride* wypełniła całkowicie wnętrze kolbek, zawartość ich przefiltrowano przez 4 warstwy bibuły Whatman No 1, a filtry połączone tak, aby uzyskać po dwa powtórzenia z 5 kultur. Połączone filtry zagęszczono pod wyparką do 100 ml w 40°C, a następnie ekstrahowano 2 razy z 50 ml chloroformu. Pomiędzy wodną i chloroformową strefą tworzyła się w trakcie ekstrakcji biała warstwa substancji, którą usuwano i testowano osobno. Połączone ekstrakty chloroformowe odparowano, otrzymując brązową substancję o konsystencji żywicy. Zarówno białą warstwę tworzącą się na granicy fazy wodnej i chloroformowej, jak i ekstrakt chloroformowy testowano na aktywność antybiotykową w teście szalkowym. W tym celu niewielką ilość ekstraktu umieszczano w centrum pożywki maltozowej na szalce Petriego i obserwowano wzrost testowanego grzyba *P. cinnamomi* z inokulum zaszczepionego w odległości 1 cm od ekstraktu.

**Biotest na antybiotyki lotne.** Zbadano aktywność antybiotyków lotnych produkowanych przez te same szczepy *Trichoderma* spp., które testowano na antybiotyki nietlotne. Zastosowano zmodyfikowaną metodę opisaną przez Denisa i Webstera (1971b). Izolaty 12 testowanych szczepów *T. viride* i *T. harzianum* wyszczepiono na szalki Petriego zawierające 15 ml pożywki Malt Extract Broth (agar 0.9%), pH 4.7. Inokula o średnicy 6 mm umieszczano w centrum pożywki i inkubowano 24 godziny w temp. 24°C. Po tym czasie kolonie grzyba *Trichoderma* sp. osiągają średnicę około 1,5 cm. Wówczas na taką samą pożywkę, również w pozycji centralnej wyszczepiono inokula grzyba *P. cinnamomi*. Następnie z szalek z rosnącymi na nich szczepami *Trichoderma* sp. usuwano w warunkach sterylnych nakrycie i zastępowano je dolną częścią szalki z pożywką, na której w pozycji centralnej wyszczepiono grzyb *P. cinnamomi*, całość uszczelniając taśmą Parafilm. Jako kontrola służył taki sam układ szalek, na którym jednak na pożywce w górnej części nie wyszczepiono

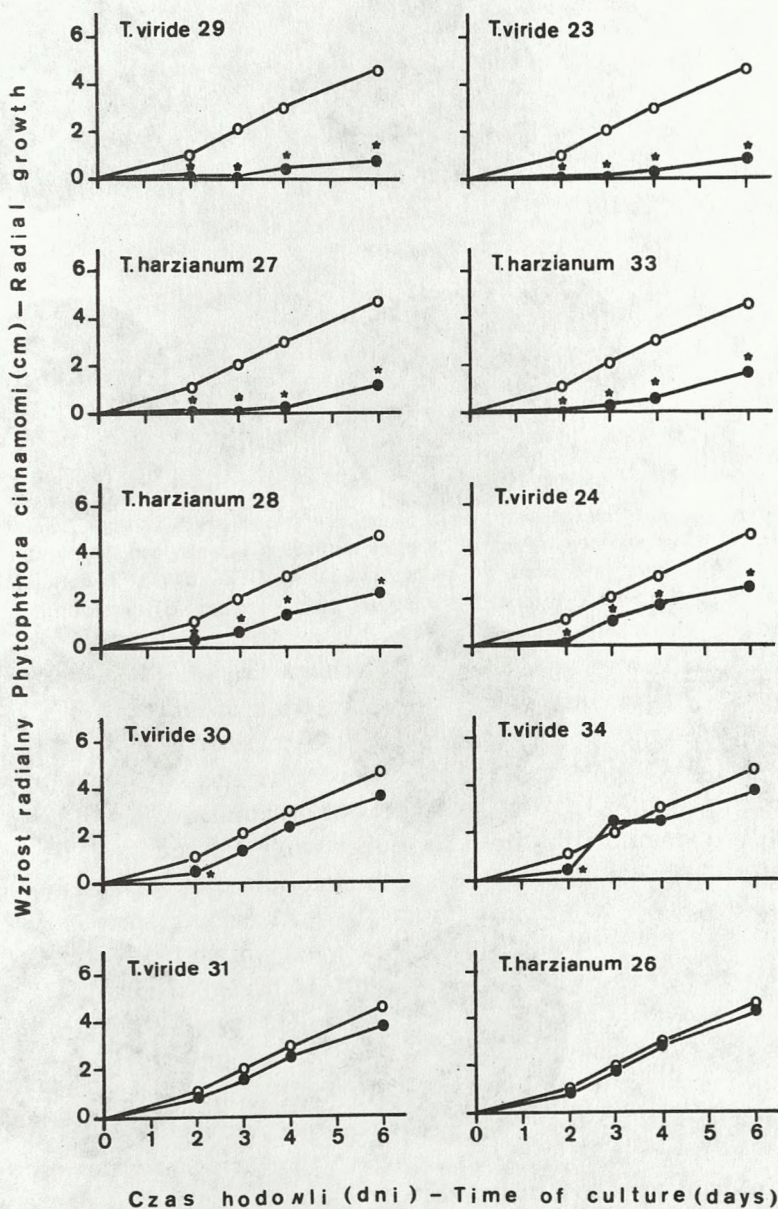
grzyba *Trichoderma*. Szalki inkubowano w temp. 24°C i codziennie przeprowadzano pomiary wzrostu radialnego testowanego patogena *P. cinnamomi*, porównując go z kontrolą.

**Obserwacje mikroskopowe.** Preparaty wykonano zarówno z pięciodniowych, kontrolnych kultur grzyba *P. cinnamomi*, jak i z kultur poddanych działaniu nielotnych oraz lotnych antybiotyków produkowanych przez grzyby *T. viride* i *T. harzianum*. Z grzybni sąsiadującej z inokulum oraz środkowej i brzeżnej pobierano powierzchniowe i substratowe strzępki, które umieszczano w kropli sterylnej wody destylowanej na szkiełku mikroskopowym. W celu wykrycia obecności tłuszczu w strzępkach *P. cinnamomi* zastosowano alkoholowy roztwór Sudanu IV. Fragmenty grzybni barwiono przez 5 min., a następnie różnicowano w 50% alkoholu.

#### WYNIKI

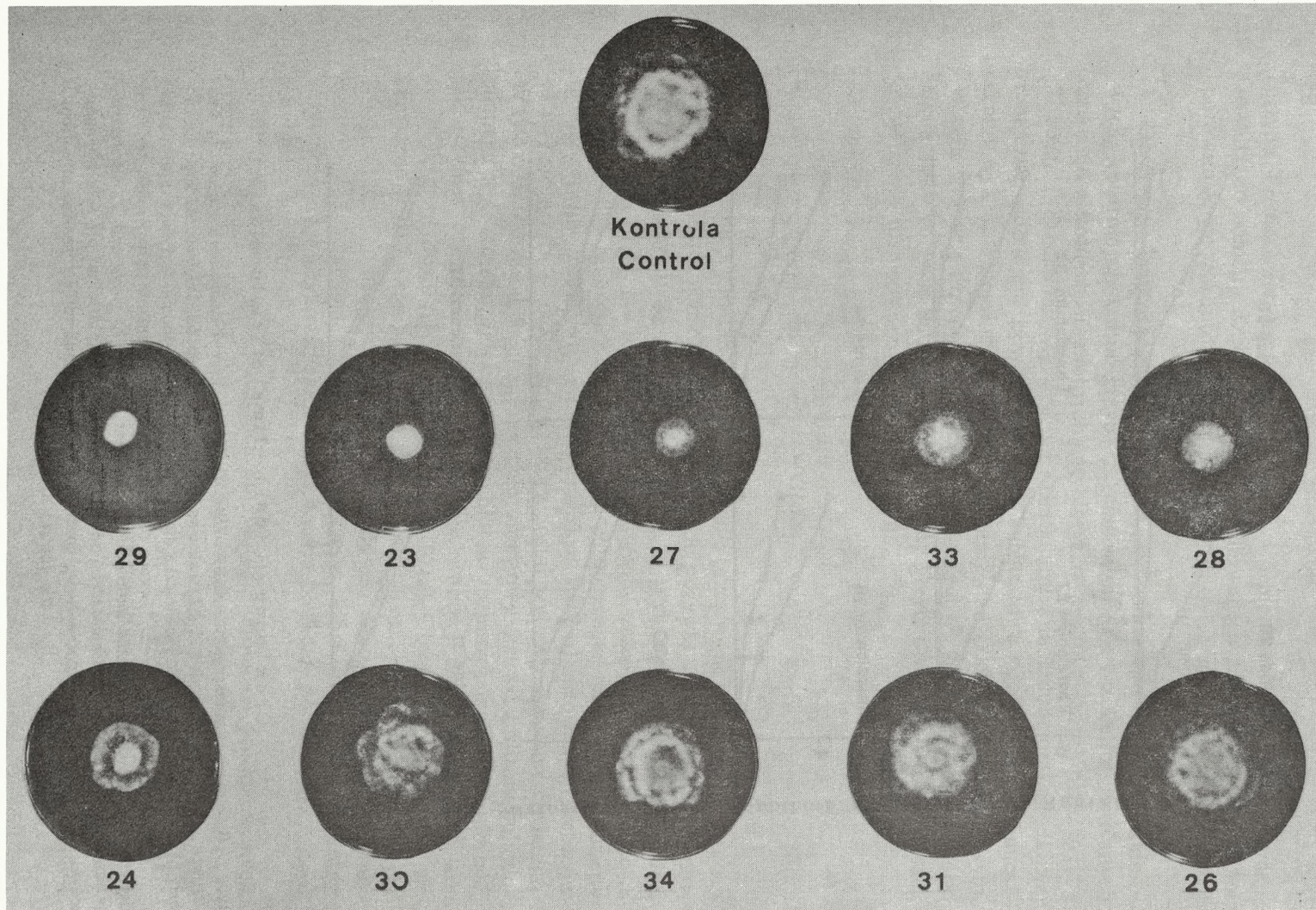
Stwierdzono, że metabolity produkowane przez różne szczepy *Trichoderma* spp. i dyfundujące przez selektywną błonę do pożywki mogą istotnie zahamować wzrost grzybni *P. cinnamomi* (ryc. 1 i 2). Wykazano, że zarówno wśród szczepów *T. viride*, jak i *T. harzianum* występują szczepy o dużej aktywności fungistatycznej w stosunku do patogena *P. cinnamomi*, jak również szczepy niemal zupełnie nieaktywne. Najaktywniejszym spośród testowanych szczepów okazał się grzyb *T. viride* nr 29, który został wybrany do dalszych badań. W tym celu testowano zagęszczony, chloroformowy ekstrakt z filtratu pochodzącego tego szczepu, zawierający antybiotyki rozpuszczalne w chloroformie, jak również rozpuszczalną w wodzie tzw. warstwę białą, zawierającą antybiotyki peptydowe (Denis i Webster, 1971a). Oba preparaty okazały się skuteczne w hamowaniu wzrostu *P. cinnamomi* (ryc. 3). Również antybiotyki lotne, choć w mniejszym stopniu, okazały się skuteczne w ograniczaniu wzrostu *P. cinnamomi* (ryc. 4 i 5). Szczepy, które wykazywały znaczną aktywność antybiotyków nielotnych, nie zawsze posiadały podobną aktywność antybiotyków lotnych.

W trakcie testowania substancji antybiotykopodobnych produkowanych przez grzyby *T. viride* i *T. harzianum* przeprowadzono porównawcze obserwacje mikroskopowe kontrolnych i traktowanych kultur *P. cinnamomi*. Grzybnia kontrolnej kultury *P. cinnamomi* składała się z luźno splecionych, zwykle prostych, regularnych strzępek powierzchniowych oraz nieregularnych w swoim kształcie strzępek substratowych. W tym ostatnim przypadku stwierdzono obecność następujących rodzajów strzępek: (1) z bocznymi odgałęzieniami



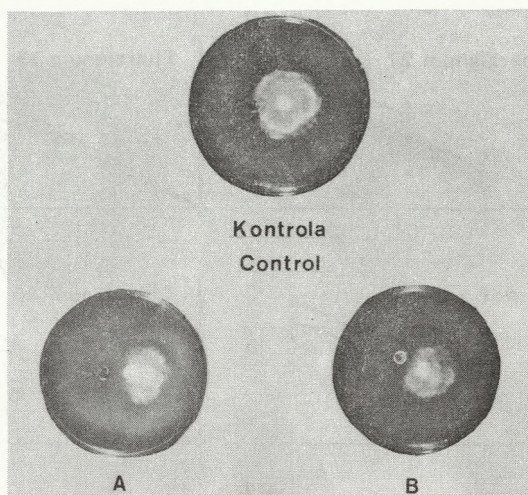
Ryc. 1. Biotest na antybiotyki nietlotne; wzrost radialny kultur *Phytophthora cinnamomi* na pożywce Malt Extract Broth pH 4,7, traktowanej różnymi szczepami *Trichoderma* spp., które rosły na tej pożywce na krążku z woreczka dializacyjnego przez 30 godzin. Pożywka traktowana ●—●, kontrola ○—○. \* wynik różni się istotnie od kontroli przy  $P=0,01$

Fig.1. Production of non-volatile antibiotics by different isolates *T. viride* and *T. harzianum* (as radial growth of the *P. cinnamomi* on Malt Extract Broth agar medium pH 4.7). Medium treated with *Trichoderma* spp. ●—●; control ○—○. \* Result differs significantly from the control at  $P=0.01$



<http://rcin.org.pl>

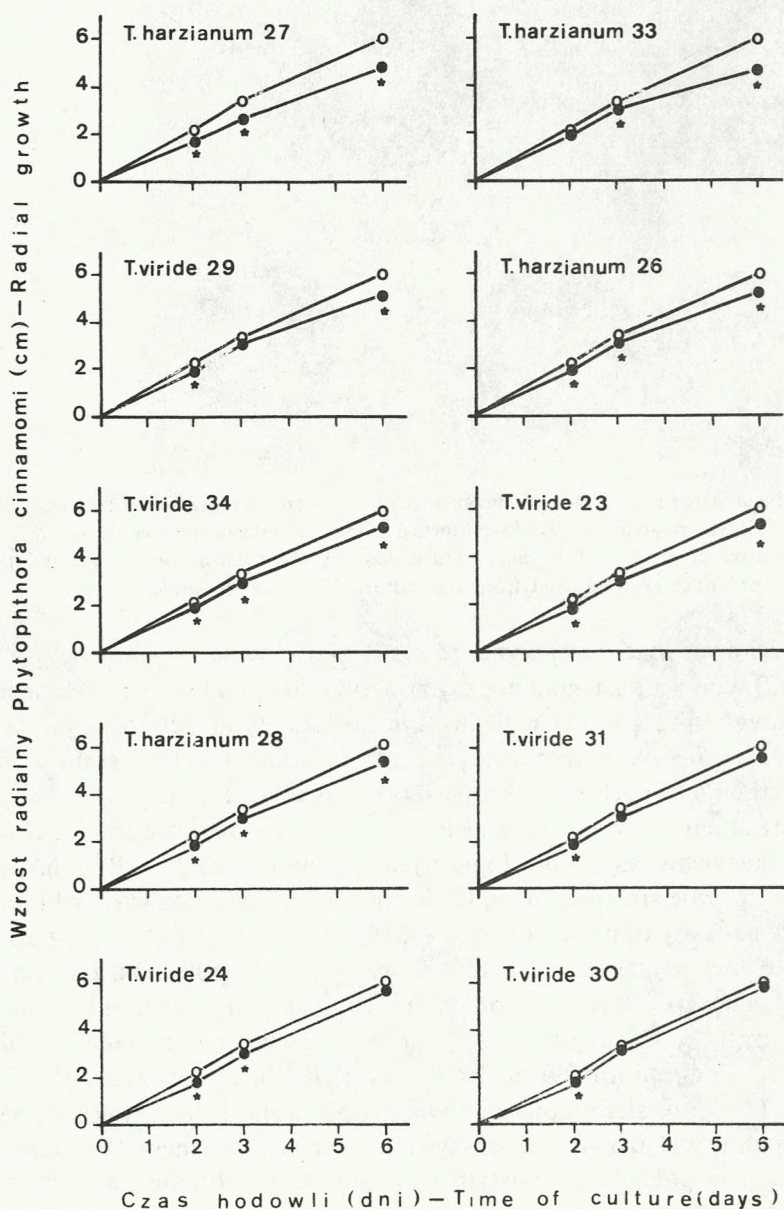
Ryc. 2. Inhibicja wzrostu *P. cinnamomi* przez antybiotyki nielotne produkowane przez różne szczepy *Trichoderma* spp. (oznaczenia szczepów jak na ryc. 1)  
Fig. 2. Inhibition of growth of *P. cinnamomi* caused by non-volatile antibiotics from different strains of *Trichoderma* (Numbers of strains as in fig. 1.)



Ryc. 3. Inhibicja wzrostu *P. cinnamomi* przez antybiotyki rozpuszczalne w chloroformie (A) oraz antybiotyki peptydowe (B) ekstrahowane z filtratu *Trichoderma viride* nr 29

Fig. 3. Inhibition of growth of *P. cinnamomi* caused by chloroform soluble (A) and peptide antibiotics (B) extracted from the culture filtrate of *T. viride* No. 29

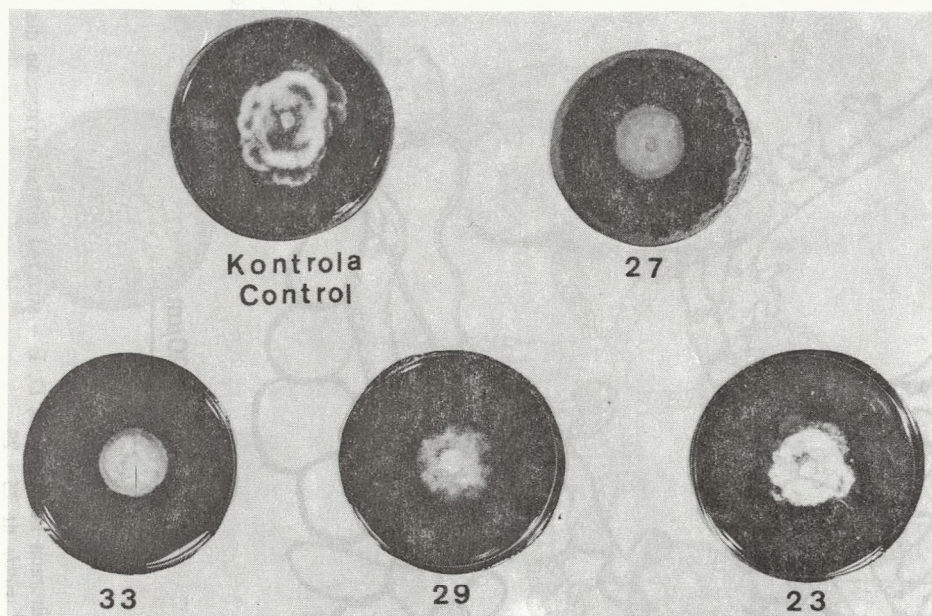
o szerokości odpowiadającej wymiarom strzępki głównej w granicach 5–7  $\mu\text{m}$  (ryc. 6A), (2) typu koralistego z bocznymi nabrzmieniami kształtu owalnego lub gruszkowatego o szerokości 6–8  $\mu\text{m}$  (ryc. 6B), (3) typu dendroidalnego (ryc. 6C). Regularne i nieregularne strzępki kultury kontrolnej zawierały nieliczne drobne wakuole wypełnione kropelkami tłuszczu. Kultury *P. cinnamomi* poddane działaniu antybiotyków nielotnych i lotnych ze szczepów *T. viride* nr 25 i 29 wykazywały pięć morfologicznych rodzajów strzępek (Ryc. 6A, B, C, D, E). Trzy rodzaje strzępek (A, B, C), które również występowały w kulturach kontrolnych zostały opisane powyżej. Dwa pozostałe (ryc. 6D, E) o szerokości strzępki głównej w granicach 11–15  $\mu\text{m}$  przypominały pokrojem typy: drzewkowaty rozgałęziony (ryc. 6D) oraz koralisty (ryc. 6E). Strzępki o pokroju dendroidalnym, dominujące w grzybni *P. cinnamomi* poddanej działaniu metabolitów *T. viride* (nr 29) posiadały odgałęzienia o szerokości 10–30  $\mu\text{m}$ . Wewnątrz komórek strzępkowych stwierdzono liczne i duże wakuole wypełnione kroplami wykazującymi pozytywną reakcję z Sudanem IV. Natomiast w strzępkach o pokroju koralistym obserwowano nabrzmienia różnorodne w kształcie, ułożone łańcuszkowato, przezroczyste, z wyraźnie zarysowaną ścianą komórkową. W tego rodzaju strzępkach nie stwierdzono obecności kropli tłuszczowych. Scharakteryzowane powyżej strzępki nieregularne występowały zarówno w warstwie powierzchniowej, jak i substratowej grzybni. Chlamydospory (20–50  $\mu\text{m}$ ), podobnie jak w koloniach kontrolnych, tworzyły się terminalnie i interkalarnie. Bardziej liczne ich występowanie stwierdzono w koloniach testowanych ze szczepami *Trichoderma* (ryc. 7B). W grzybni *P.*



Ryc. 4. Biotest na antybiotyki lotne; wzrost radialny *P. cinnamomi* na pożywce Malt Extract Broth pH 4,7, w podwójnej kulturze z różnymi szczepami *Trichoderma* spp. Wzrost kultur traktowanych ●—●, kontrola ○—○. \* jak ryc. 1.

Fig. 4. Production of volatile antibiotics by different strains of *T. viride* and *T. harzianum* (as radial growth of *P. cinnamomi* on Malt Extract Broth agar medium pH 4.7. ●—● growth of the *P. cinnamomi* mycelium in a double culture with tested *Trichoderma* strains. ○—○ control, growth of *P. cinnamomi* not affected by the vapour of *Trichoderma* spp. \* as in fig. 1





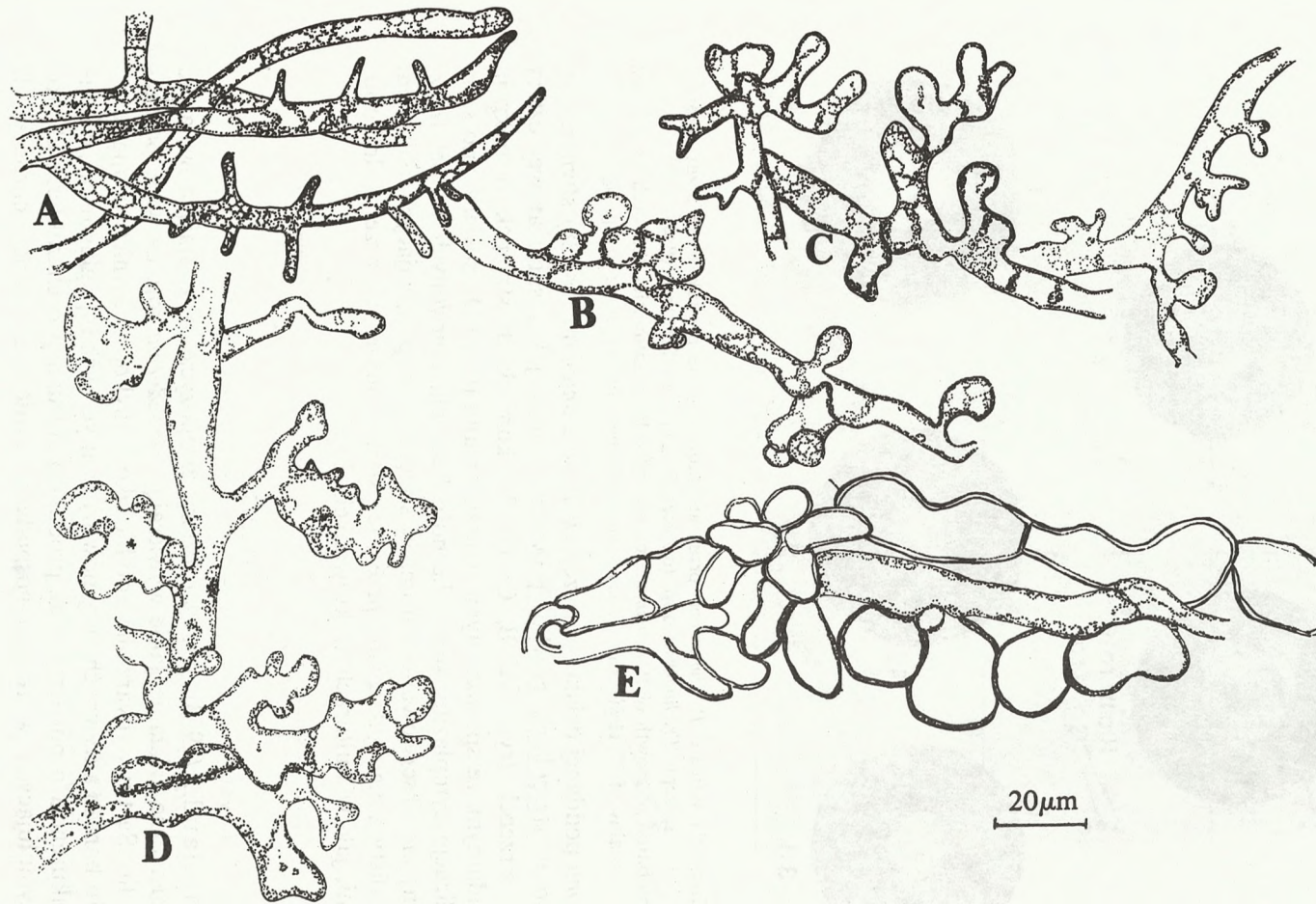
Ryc. 5. Inhibicja wzrostu *P. cinnamomi* przez antybiotyki lotne produkowane przez wybrane szczepy *Trichoderma* spp. (oznaczenia szczepów jak na ryc. 4.)

Fig. 5. Inhibition of growth of *P. cinnamomi* caused by volatile antibiotics produced by chosen strains of *T. viride* and *T. harzianum* (numbers of strains as in fig. 4.)

*cinnamomi* poddanej działaniu szczepów *T. harzianum* (nr 27 i 28), stwierdzono zarówno w strzępkach grzybni powierzchniowej, jak i substratowej cztery rodzaje strzępek (ryc. 6A, B, C, D). W komórkach strzępek o pokroju dendroidalnym, ze spłaszczonymi nabrzmieniami (ryc. 6D), stwierdzono silną wakuolizację cytoplazmy oraz obecność licznych, czerwonych kropek tłuszczowych; nie obserwowano natomiast strzępek przypominających pokrojem typ koralisty z nieregularnymi, przezroczystymi komórkami przetrwalnikopodobnymi, jak w kulturach traktowanych *T. viride*.

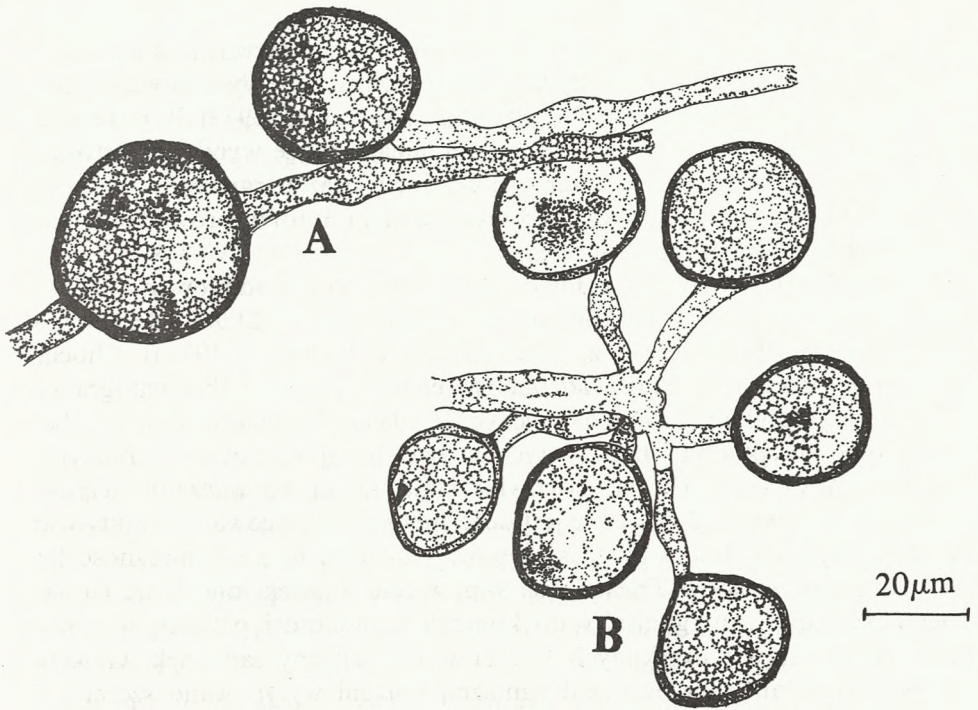
#### DYSKUSJA

Grosclaude (1983) wysuwa cztery propozycje pozwalające wyjaśnić antagonistyczne działanie, jakie wywierają *Trichoderma* spp. na wiele patogenów roślin. Są to: wytwarzanie antybiotyków, mykopasożytnictwo oparte na działaniu bardzo aktywnych enzymów hydrolitycznych (np. glukanazy, celulazy), konkurencja o pokarmy oraz produkcja substancji o charakterze elicytorów, stymulujących w roślinie-gospodarzu syntezę substancji chroniących



Ryc. 6. Morfologia strzępek *P. cinnamomi*: A, B, C – strzępki dominujące w kulturach kontrolnych, D, E – strzępki charakterystyczne dla kultur traktowanych antybiotykami *T. viride* nr 25 i 29

Fig. 6. Normal (A, B, C) and affected by antibiotics from *T. viride* No. 29 (D, E) hyphae of *P. cinnamomi*



Ryc. 7. Chlamydospory z kultur kontrolnych *P. cinnamomi* (A) oraz grona komórek chlamydosporopodobnych (B) z kultur traktowanych antybiotykami *T. viride*  
 Fig. 7. Chlamydozoetes of a control culture *P. cinnamomi* (A) and chlamydozoete-like cells (B) found in the culture treated with antibiotics produced by *T. viride*

przed infekcją, np. fitoaleksyn, fenoli itp. Produkcję lotnych i nielotnych antybiotyków i ich aktywność w stosunku do *P. cinnamomi* testowano w niniejszej pracy. Wykazano, że testowane szczepy zarówno *T. viride*, jak i *T. harzianum*, produkują nielotne i lotne substancje o charakterze antybiotyków. Jednocześnie stwierdzono istotny, hamujący wpływ tych substancji na wzrost i cykl rozwojowy patogena *P. cinnamomi*. W grzybni kultur *P. cinnamomi* poddanych działaniu antybiotyków *Trichoderma* spp. stwierdzono występowanie strzępek nieregularnych, posiadających odgałęzienia w postaci spłaszczonego nabrzmienia, wypełnionych licznymi wodniczkami lub całkowicie zwakuolizowanych, bądź strzępek złożonych z przezroczystych komórek przetrwalnikopodobnych. Powyższe zmiany szczególnie wyraźnie wystąpiły w strzępkach grzybni *P. cinnamomi* poddanej działaniu grzyba *T. viride*. Wakuolizacja cytoplazmy oraz wzmożone pojawienie się kropeł tłuszczowych może być objawem degeneracji komórek strzępkowych grzybni, połączonej z rozkładem kompleksów lipoproteidowych, zawartych przede wszystkim w membranach cytoplazmatycznych. W przeprowadzonych obserwacjach

mikroskopowych testowanej grzybni *P. cinnamomi* nie obserwowano obecności zarodni pływkowych oraz oospor, choć takie organy były obserwowane przez niektórych autorów (Brasier, 1975; Reeves i Jackson, 1972). Brak tworzenia takich organów w niniejszych doświadczeniach może wynikać ze stosunkowo krótkiego okresu prowadzenia obserwacji, oraz ograniczenia eksperymentu do badań *in vitro*, podczas gdy wspomniani autorzy prowadzili swoje obserwacje w próbkach glebowych.

Do antybiotyków rozpuszczalnych w chloroformie, produkowanych przez *Trichoderma* spp. należy trichodermina i antybiotyk U 21,963 (dermadina) (Meyer, 1966; Pyke i Dietz, 1966; Denis i Webster, 1971a). Choć w niniejszej pracy nie przeprowadzono szczegółowej analizy chromatograficznej tych antybiotyków, to można założyć, że właśnie te dwie substancje obok antybiotyków peptydowych zawartych w tzw. białej warstwie ekstrakcyjnej (Denis i Webster, 1971a), odpowiedzialne są za ograniczanie wzrostu grzybni *P. cinnamomi*. Znamienne jest dość znaczne zróżnicowanie w aktywności antybiotykowej testowanych szczepów. Wskazuje to na konieczność testowania wielu szczepów *Trichoderma* spp. w celu wyselekcjonowania najbardziej efektywnych antagonistów do kontroli biologicznej patogenów roślinnych. Na podstawie uzyskanych wyników, do ochrony sadzonek wrzosów, wrzosców i różaneczników przed zgnilizną korzeni wytypowano szczepy *T. viride* nr 29 i *T. harzianum* nr 33 (Bojarczuk i in., 1991).

Antybiotyki lotne wykazały słabsze działanie w hamowaniu wzrostu *P. cinnamomi* w stosunku do nielotnych związków produkowanych przez testowane szczepy *Trichoderma* sp. W niniejszej pracy test na antybiotyki lotne przeprowadzono wg metody Denisa i Webstera (1971b), która zakłada użycie pożywki maltozowej. Znany jest fakt, że ilość i rodzaj źródła azotu i węgla w pożywce mogą dość istotnie modyfikować antagonistyczne właściwości grzybów z rodzaju *Trichoderma* (Tokimoto i Komatsu 1975). Na przykład aktywność niektórych enzymów z *Trichoderma* spp. pozostaje w znacznej zależności od składników pożywki. Stwierdzono m.in. wysoką aktywność  $\beta$ -glukanaz w kulturze *T. viride* w obecności wysokiego stężenia glukozy i znacznie słabszą aktywność, gdy poziom glukozy był niski (Del Rey i in. 1979, Elad i in. 1982). Należy dodać, że nie u wszystkich grzybów występuje ten sam model regulacji aktywności enzymów przez glukozę. Podobnie jak u *Trichoderma* sp. glukoza reguluje aktywność  $\beta$ -glukanazy u *Saccharomyces cerevisiae* (Del Rey i in., 1979). Natomiast represję syntezy 1,3- $\beta$ -glukanazy powoduje glukoza u takich grzybów, jak *Penicillium italicum* (Santos i in., 1978), *Botrytis cinerea* Dubordieu, 1981), czy *Neurospora crassa* (Del Rey i in., 1979). Oliver i Germain (1983) wspominają, że produkcja antybiotyków lotnych może być słaba i nieregularna, kiedy *Trichoderma* sp. rośnie na pożywce maltozowej, natomiast znacznie wzrasta, gdy grzyb hoduje się na pożywce z dodatkiem słomy pszenicznej lub liści jabłoni. Konieczne więc

jest dokładne rozpoznanie aktywności metabolicznej używanych szczepów *Trichoderma* spp. również w zależności od składników pożywki. Otwiera to możliwość takiego sterowania składnikami odżywczymi, aby uzyskać maksymalny efekt antagonistyczny.

**PODZIĘKOWANIE.** Pani Halinie Narożnej dziękujemy za pomoc techniczną w trakcie wykonywania doświadczeń i przygotowywania pracy do druku.

#### STRESZCZENIE

Rośliny wrzosowate atakowane są w trakcie ukorzenienia przez grzyby zgorzelowe, spośród których do najgroźniejszych należy *Phytophthora cinnamomi* Rands. Można go częściowo zwalczać środkami chemicznymi, stosując różne fungicydy. Walka biologiczna przy użyciu antagonistycznych w stosunku do *P. cinnamomi* grzybów z rodzaju *Trichoderma* stanowi ważną alternatywę dla metod chemicznych. W niniejszej pracy testowano szereg szczepów *T. viride* Pers. ex Fr. i *T. harzianum* Rifai, w celu określenia w warunkach *in vitro* antagonizmu pomiędzy tymi grzybami a patogenem *P. cinnamomi*. Badano nielotne oraz lotne antybiotyki produkowane przez testowane szczepy *Trichoderma* spp. Stwierdzono znaczne zróżnicowanie badanych szczepów w produkcji tych antybiotyków. Aktywność antybiotyków nielotnych, objawiająca się zahamowaniem wzrostu kultur *P. cinnamomi* była wyższa, niż analogiczna aktywność antybiotyków lotnych. Jako najaktywniejsze wyselekcjonowano szczepy *T. viride* nr 29 i *T. harzianum* nr 33, które przeznaczono do dalszych badań. Biotest z antybiotykami rozpuszczalnymi w chloroformie oraz tzw. antybiotykami peptydowymi wyekstrahowanymi ze szczepu *T. viride* nr 29 potwierdził ich aktywność jako substancji o charakterze fungistatycznym w stosunku do *P. cinnamomi*. Badania mikroskopowe grzybni *P. cinnamomi* poddanej działaniu antybiotyków produkowanych przez oba wybrane szczepy *Trichoderma*, wykazały znaczne zmiany morfologiczne strzępek u testowanego patogena. Stwierdzono m.in. występowanie strzępek nieregularnych, posiadających odgałęzienia w postaci spłaszczonych, silnie zwakuolizowanych nabrzmiń, bądź strzępek złożonych z przezroczystych komórek przetrwalnikopodobnych. Wakuolizacja cytoplazmy oraz wzmożone pojawianie się kropeł tłuszczowych są prawdopodobnie objawem degeneracji komórek grzybni pod wpływem metabolitów *Trichoderma* spp. Uzyskane wyniki stanowią obiecujący wstęp do zastosowania wyselekcjonowanych szczepów *T. viride* i *T. harzianum* w ochronie biologicznej sadzonek roślin wrzosowatych przed chorobami zgorzelowymi.

## LITERATURA

- Anderson E. J., 1964. Long term effects of soil fungicides. Annu. Conf. Control Soil Fungi, San Diego, California, 10: 13-14.
- Bojarczuk K., Rudawska M., 1989. Wpływ grzyba antagonistycznego *Trichoderma* sp. na grzyby wywołujące zgorzel korzeniową u roślin wrzosowatych. Rośliny Wrzosowate, 2: 40-43.
- Bojarczuk K., Rudawska M., Przybył K., 1991. Zwalczanie zgorzeli korzeniowej roślin wrzosowatych przy zastosowaniu antagonistycznych grzybów z rodzaju *Trichoderma*. Arbor. Kórnickie, 36: 000-000. (w druku).
- Bortus A. L., Wood B., 1977. The effects of soil applications of three fungicides on host rot caused by *Phytophthora cinnamomi* Rands. Phytopath. Z., 88: 229-235.
- Bortus A. L., Wood B., 1979. Protective treatments with six soil fungicides to control root rot caused by *Phytophthora cinnamomi* Rands. Phytoph. Z., 96: 277-280.
- Brasier C. M., 1975. Stimulation of sex organ formation in *Phytophthora* by antagonistic species of *Trichoderma*. II. Ecological implications. New Phytol., 74: 195-198.
- Del Rey F., Garcia-Acha J., Nombela C., 1979. The regulation of  $\beta$ -glucanase synthesis in fungi and yeast. J. of General Microbiol., 110: 83-89.
- Denis C., Webster J., 1971a. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. I. Production of non-volatile antibiotics. Trans. Br. mycol. Soc., 57: 41-48.
- Denis C., Webster J., 1971b. II. Production of volatile antibiotics. Trans. Br. mycol. Soc., 57: 41-48.
- Dubordieu D., 1981. Degradation enzymatique du glucane de *Botrytis cinerea*. Connaissance Vigne Vin, 15: 161-177.
- Elad Y., Chet J., Henis Y., 1982. Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. Can. J. Microbiol., 28: 719-725.
- Grosclaude C., 1983. Activites du *Trichoderma harzianum* vis-à-vis du *Stereum purpureum*. W: Les antagonistes microbiens, 24° Colloque de la Société Française de Phytopathologie. INRA, 18: 115-118.
- Kelley W. D., 1976. Evaluation of *Trichoderma harzianum*-impregnated clay granules as a biocontrol for damping-off of pine seedlings caused by *Phytophthora cinnamomi*. Phytopathology, 66: 1023-1027.
- Meyer C. E., 1966. U-21, 963 - a new antibiotic. II. Isolation and characterization. Applied Microbiology, 14: 511-512.
- Oliver J. M., Germain R., 1983. Antibiotiques volatiles des *Trichoderma*. W: Les antagonistes microbiens, 24° Colloque de la Société Française de Phytopathologie INRA, 18: 13-17.
- Papavizas G. C., 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology and potential for biocontrol. Ann. Rev. Phytopathol., 23: 23-54.
- Pyke T. R., Dietz A., 1966. U-21, 963, a new antibiotic I. Discovery and biological activity. Applied Microbiology, 14: 506-510.
- Reeves R., 1975. Behaviour of *Phytophthora cinnamomi* Rands in different soils and water regimes. Soil Biol. Biochem., 7: 19-24.
- Reeves R. J., Jackson R. M., 1972. Induction of *Phytophthora cinnamomi* oospores in soil by *Trichoderma viride*. Trans. Br. mycol. Soc., 59: 156-159.
- Santos T., Sanchez M., Villanueva J. R., Nombella C., 1978. Regulation of the  $\beta$ -1,3 glucanase system in *Penicillium italicum*: glucose repression of the various enzymes. J. of Bacteriol., 133: 465-471.
- Świąch T., 1980. Badania nad występowaniem chorób na różanecznikach (*Rhododendron*) oraz możliwością ich zwalczania za pomocą fungicydów produkcji krajowej. Praca doktorska, Kraków, 1-76.

- Święch T., Górską-Poczopko J., 1984. The influence of systematic fungicides on some fungi of *Phytophthora* genus isolated from rhododendrons. Tag.-Ber., Akad. Landwirtsch. Wiss. DDR, Berlin, 222: 269-276.
- Tokimoto K., Komatsu M., 1975. Effect of carbon and nitrogen sources in media on the hyphal interference between *Lentinus edodes* and some species of *Trichoderma*. Ann. Phytopath. Soc. Japan, 45: 261-264.

Przyjęto do druku w listopadzie 1990

