

## WPŁYW WYBRANYCH FUNGICYDÓW NA AKTYWNOŚĆ ENZYMATYCZNĄ GRZYBÓW Z RODZAJU *Trichoderma*

*Joanna Dłużniewska*

Katedra Ochrony Środowiska Rolniczego,  
Akademia Rolnicza im. H. Kołłątaja w Krakowie

### Wstęp

Chemiczne metody ochrony roślin przed chorobami odgrywają bardzo dużą rolę w warunkach wysoko rozwiniętego lub szybko rozwijającego się rolnictwa. Rola ta wynika z doraźnego i skutecznego działania oraz wysokich wskaźników ekonomicznej efektywności i jest szczególnie duża w najbardziej intensywnych dziedzinach rolnictwa, takich jak ogrodnictwo i uprawa roślin przemysłowych. Korzyści uzyskiwane z używania fungicydów są niezaprzeczalne, ale nie można też lekceważyć zagrożeń. Mechanizmy działania fungicydów na grzyby wiążą się z zakłóceniem następujących funkcji fizjologicznych: procesów energetycznych, biosyntezy, działania błony cytoplazmatycznej lub miotycznego podziału jądra komórkowego [BORECKI 2001].

W środowisku glebowym ważne znaczenie ekologiczne i rolnicze mają grzyby z rodzaju *Trichoderma*. Grzyby te są nie tylko jednymi z powszechnie izolowanych z różnych siedlisk grzybów glebowych, ale także mikroorganizmami znanymi z wydzielania do środowiska wtórnych metabolitów o szerokim spektrum oddziaływania na grzyby patogeniczne. *Trichoderma* spp. są silnymi antagonistami pasożytów powodujących u roślin groźne choroby jak: zgorzele siewek, gnicie korzeni oraz wędnięcia prowadzące do zamierania roślin [MONTE 2001]. Mikopasożytnicze oddziaływanie grzybów z rodzaju *Trichoderma* związane jest m.in. z wydzielaniem i aktywnością kompleksu enzymów pozakomórkowych, takich jak:  $\beta$ -(1-3)-glukanazy oraz chitynazy czy enzymów celulolitycznych [VELDEMAN 1993; DAHM 1996].

Celem pracy było zbadanie oddziaływania wybranych fungicydów na aktywność pektolityczną i celulolityczną grzybów z rodzaju *Trichoderma*.

### Materiał i metody

Do badań wybrano następujące gatunki grzybów antagonistycznych: *Trichoderma harzianum* RIFAI, *Trichoderma pseudokoningii* RIFAI, *Trichoderma viride*

PERS. ex GRAY. Izolaty grzybów uzyskano z gleb użytkowanych rolniczo. Badano oddziaływanie następujących fungicydów w stężeniu 100 ppm w przeliczeniu na substancję aktywną: Miedzian 50 WP (50% tlenochlorku miedziowego), Topsin M 70 WP (70% tiofanatu metylu), Zaprawa Oxafun T (37,5% tiuramu i 37,5% karboksyny).

W doświadczeniu badano wpływ fungicydów na zdolność grzybów z rodzaju *Trichoderma* do wytwarzania enzymów pektolitycznych: poligalakturonazy (PG), liazy pektynianowej (PGL) oraz enzymów celulolitycznych: endo-1,4- $\beta$ -D-glukanaz (endocelulaz), egzo-1,4- $\beta$ -D-glukanaz (egzocelulaz) i  $\beta$ -glukozydaz.

Aktywność pektolityczną badano hodując grzyby w płynnej pożywce Czapek-Dox, w której sacharozę zastąpiono pektyną cytrusową (Sigma) w ilości 5 g·dm<sup>-3</sup>. Do pożywki hodowlanej dodawano badane fungicydy. Kontrolę stanowiła hodowla na pożywce bez fungicydu. Przygotowane podłoża zaszczepiano 1 cm<sup>3</sup> zmywu ze skosu pożywki PDA z wyrosniętą 2 tygodniową kulturą *Trichoderma* spp. Hodowlę prowadzono przez 14 dni w temperaturze 26°C w 3 powtórzeniach, a następnie w płynie pohodowlanym oznaczano aktywność enzymów pektolitycznych.

Oznaczanie aktywności PG i PGL w płynach po hodowli grzybów wykonano metodą tiobarbiturową (TBA) Sherwood'a [1969 cyt. za JOHANSSON 1988]. Mieszaninę reagującą stanowiły: 2 cm<sup>3</sup> płynu po hodowli i 2 cm<sup>3</sup> 1% roztworu polipektynianu sodu w 0,05 M buforze octanowym o pH 5,0 (dla PG) i 0,05 M buforze Tris – HCl o pH 8,0 (dla PGL). W przypadku badania liaz mieszaninę reagującą wzbogacano w 0,5 cm<sup>3</sup> 0,01 mol CaCl<sub>2</sub>·dm<sup>-3</sup>. Za jednostkę aktywności enzymów pektolitycznych przyjęto taką ilość enzymu, która w warunkach doświadczenia uwalniała z substratu 1  $\mu$ M kwasu galakturonowego w ciągu 1 minuty.

Badanie aktywności celulolitycznej wykonano hodując grzyby analogicznie jak powyżej z tą różnicą, że hodowlę prowadzono na pożywce Czapek-Dox bez sacharozy, a wzbogaconej w karboksymetylcelulozę CMC (Sigma) w ilości 5 g·dm<sup>-3</sup>.

Enzymy oznaczano metodą opisaną w pracy CAI i in. [1994]. Aktywność endocelulaz badano oznaczając cukry redukujące kolorymetrycznie metodą Somogyi i Nelsona. Za jednostkę aktywności endocelulaz przyjęto taką ilość enzymu, która w warunkach doświadczalnych uwalniała z substratu 1  $\mu$ M glukozy w ciągu 1 minuty.

Aktywność egzocelulaz oznaczano podobnie jak w endocelulaz z tym, że zamiast 2% karboksymetylcelulozy użyto 1% Awicel (Cellulose microcrystalline Serva, 0,1 mm). Za jednostkę aktywności egzocelulaz przyjęto taką ilość enzymu, która w warunkach doświadczalnych uwalniała z substratu 1  $\mu$ M glukozy w ciągu 1 minuty.

Aktywności  $\beta$ -glukozydaz oznaczano uzyskując z hodowli poprzez wirowanie i homogenizowanie grzybni z 0,01 M buforem octanowym supernatant, który został użyty jako preparat enzymatyczny. Substrat stanowiło 50  $\mu$ l 40 mM p-nitrofenylu  $\beta$ -D-glukopiranozydu (Sigma). Za jednostkę aktywności  $\beta$ -glukozydaz przyjęto taką ilość enzymu, która w warunkach doświadczenia uwalniała z substratu 1  $\mu$ g p-nitrofenolu/minutę.

Wyniki opracowano statystycznie metodą analizy wariancji przewidzianą, dla doświadczeń dwuczynnikowych (czynnik A – fungicyd, czynnik B – izolat *Trichoderma*). Istotność weryfikowano testem Duncana.

## Wyniki i dyskusja

Wybrane do doświadczeń fungicydy doprowadziły do zaniku aktywności liazy pektynianowej (PGL) u *T. harzianum*, który był jedynym izolatem wytwarzającym ten enzym w warunkach kontrolnych (tab. 1). Natomiast wszystkie izolaty *Trichoderma* wytwarzały poligalakturonazę (PG). Najwięcej tego enzymu produkował gatunek *T. pseudokoningii* (tab. 1). Pod wpływem wszystkich fungicydów spadał poziom syntezy poligalakturonazy u grzybów z rodzaju *Trichoderma*. Najbardziej wrażliwy na testowane czynniki był izolat *T. harzianum*. Świadczy o tym całkowity zanik aktywności poligalakturonazy tego grzyba. U izolatu *T. viride* każdy z fungicydów prowadził do zmniejszenia ilości tego enzymu w jednakowym stopniu. Natomiast u *T. pseudokoningii* aktywność poligalakturonazy spadała pod wpływem fungicydów w następującej kolejności: Topsin M, Oxafun T, Miedzian.

Tabela 1; Table 1

Wpływ fungicydów na aktywność liazy pektynianowej ( $\text{mU}\cdot\text{min}^{-1}$ ) i poligalakturonazy ( $\text{mU}\cdot\text{min}^{-1}$ ) grzybów z rodzaju *Trichoderma* spp.

Influence of fungicides on activity of polygalacturonic lyase and polygalacturonase produced by *Trichoderma* spp.

Fungicyd; Fungicide 10 ppm s.a.	Aktywność liazy pektynianowej Activity of polygalacturonic lyase ( $\text{mU}\cdot\text{min}^{-1}$ )	Aktywność poligalakturonazy Activity of polygalacturonase ( $\text{U}\cdot\text{min}^{-1}$ )		
	<i>T. harzianum</i>	<i>T. harzianum</i>	<i>T. pseudokoningii</i>	<i>T. viride</i>
Miedzian 50 WP	0,0	0,0a*	0,0516d	0,0248b
Topsin M 70 WP	0,0	0,0a	0,0969f	0,0301b
Zaprawa Oxafun T	0,0	0,0a	0,0704e	0,0279b
Kontrola bez fungicydu Control without fungicide	9,9370	0,0318b	0,1165g	0,0407c

\* średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie wg testu Duncana przy poziomie  $P = 0,05$ ; means marked with the same letter are not significantly different according to Duncan test  $P = 0.05$

Oznaczanie aktywności celulolitycznej grzybów z rodzaju *Trichoderma* wykazało, że badane grzyby produkowały w warunkach kontrolnych endocelulazy, egzocelulazy oraz  $\alpha$ -glukozydazy (tab. 2–4).

Endocelulazy były syntezowane przez wszystkie badane grzyby z rodzaju *Trichoderma*, ale izolaty różniły się między sobą ilością wytwarzanych endocelulaz. Największe ilości tych enzymów produkował gatunek *T. viride*, a najmniejsze *T. pseudokoningii*. Wpływ fungicydów na aktywność endocelulaz zależał od gatunku grzyba, a nie był związany z rodzajem preparatu (tab. 2). Fungicydy całkowicie hamowały syntezę endocelulaz przez grzyba *T. pseudokoningii*, obniżały poziom produkcji tego enzymu przez *T. viride*. Z kolei u grzyba *T. harzianum* pod wpływem fungicydów nie notowano zmian w ilości wytwarzanych endocelulaz.

Najwięcej egzocelulaz syntezował gatunek *T. harzianum*. Egzocelulazy produkował też, choć w mniejszej ilości izolat *T. viride*, natomiast u *T. pseudokoningii* nie notowano tych enzymów w ogóle (tab. 3). Pod wpływem fungicydów obserwowano zanik aktywności egzocelulaz u *T. viride* i spadek ilości tych enzymów syntezowanych przez *T. harzianum*.

Tabela 2; Table 2

Wpływ fungicydów na aktywność endocelulaz grzybów z rodzaju *Trichoderma* spp.  
Influence of fungicides on activity of endocellulases produced by *Trichoderma* spp.

Fungicyd; Fungicide (10 ppm s.a.)	Aktywność endocelulaz Activity of endocellulases (mU·min <sup>-1</sup> )		
	<i>T. harzianum</i>	<i>T. pseudokoningii</i>	<i>T. viride</i>
Miedzian 50 WP	1,9314d*	0,0a	0,7869b
Topsin M 70 WP	1,5265cd	0,0a	1,2310bc
Zaprawa Oxafun T	1,4873cd	0,0a	0,8375b
Kontrola bez fungicydu Control without fungicide	1,9098d	0,7830b	2,6384e

\* średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie wg testu Duncana przy poziomie P = 0,05; means marked with the same letter are not significantly different according to Duncan test P = 0.05

Tabela 3; Table 3

Wpływ fungicydów na aktywność egzocelulaz grzybów z rodzaju *Trichoderma* spp.  
Influence of fungicides on activity of exocellulases produced by *Trichoderma* spp.

Fungicyd; Fungicide (10 ppm s.a.)	Aktywność egzocelulaz Activity of exocellulases (mU·min <sup>-1</sup> )	
	<i>T. harzianum</i>	<i>T. viride</i>
Miedzian 50 WP	0,8684b*	0,0a
Topsin M 70 WP	0,8339b	0,0a
Zaprawa Oxafun T	0,7597b	0,0a
Kontrola bez fungicydu; Control without fungicide	1,6484c	0,9518b

\* średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie wg testu Duncana przy poziomie P = 0,05; means marked with the same letter are not significantly different according to Duncan test P = 0.05

Tabela 4; Table 4

Wpływ fungicydów na aktywność  $\beta$ -glukozydazy grzybów z rodzaju *Trichoderma* spp.  
Influence of fungicides on activity of  $\beta$ -glucosidase produced by *Trichoderma* spp.

Fungicyd; Fungicide (10 ppm s.a.)	Aktywność $\beta$ -glukozydazy Activity of $\beta$ -glucosidase (mU·min <sup>-1</sup> )		
	<i>T. harzianum</i>	<i>T. pseudokoningii</i>	<i>T. viride</i>
Miedzian 50 WP	0,0a*	0,3690e	0,1609cd
Topsin M 70 WP	0,0a	0,0894b	0,1867d
Zaprawa Oxafun T	0,0a	0,0867b	0,1615cd
Kontrola bez fungicydu; Control without fungicide	0,0769b	0,1815d	0,1344c

\* średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie wg testu Duncana przy poziomie P = 0,05; means marked with the same letter are not significantly different according to Duncan test P = 0.05

$\beta$ -glukozydazy były wytwarzane przez wszystkie badane gatunki *Trichoderma*. Ilość produkowanych  $\beta$ -glukozydaz malała u poszczególnych grzybów



w następującej kolejności: *T. pseudokoningii*, *T. viride*, *T. harzianum*. Zastosowane fungicydy całkowicie hamowały wytwarzanie  $\beta$ -glukozydazy przez grzyba *T. harzianum* (tab. 4). Preparat Miedzian wpływał na istotny wzrost ilości  $\beta$ -glukozydaz syntezowanych przez *T. pseudokoningii*. Natomiast fungicydy Topsin M i OxafunT powodowały istotne obniżenie aktywności tego enzymu u *T. pseudokoningii*. Grzyb *T. viride* produkował istotnie więcej  $\beta$ -glukozydazy w obecności preparatu Topsin M.

Dane literaturowe wskazują, że wśród grzybów gatunki *Trichoderma* spp. należą do najaktywniejszych producentów pozakomórkowych celulaz [CZAJKOWSKA i in. 1992; WITKOWSKA 1993; JANAS, TARGOŃSKI 1995]. Wytwarzają one kompleks enzymów charakteryzujący się wysoką aktywnością endoglukanazy oraz niską aktywnością  $\beta$ -glukozydazy. Oprócz producentów zespołu enzymów hydrolizujących celulozę zalicza się grzyby z rodzaju *Trichoderma* do organizmów wytwarzających kompleks enzymów pektolitycznych, a wśród nich liazy pektynowe, liazy pektynianowe i poligalakturonazy [WITKOWSKA 1993; DAHM 1987].

Prace dotyczące wpływu fungicydów na grzyby antagonistyczne donoszą, że mikroorganizmy te, podobnie jak patogeny, ulegają działaniu środków grzybobójczych. MACHOWICZ-STEFANIAK i in. [1998] stwierdzili, że fungicydy w stężeniu 100 ppm hamowały wzrost kolonii *T. harzianum*. Wrażliwość tego grzyba na badane preparaty była zróżnicowana w zależności od rodzaju fungicydu. Jednak dla każdego środka spadek stężenia substancji aktywnej wiązał się z zanikiem aktywności fungistatycznej. Badania APPAIAH i in. [1993] wykazały z kolei, że ograniczenie wzrostu *T. harzianum* pod wpływem tiramu nie było proporcjonalne do wzrostu stężenia substancji. W doświadczeniach SAS-PIOTROWSKIEJ i PIOTROWSKIEGO [1997] obserwowano podwyższenie toksyczności w stosunku do grzybów *Trichoderma* spp. w następstwie sporządzenia kompozycji fungicydów z preparatami Apron lub Previcur. Spośród badanych gatunków najmniej wrażliwym na testowane fungicydy, okazał się gatunek *T. viride*. Autorzy wykazali również, że gatunki *T. viride* i *T. koningii* charakteryzowały się wyższą odpornością na fungicydy aniżeli grzyby fitopatogeniczne.

Środki grzybobójcze mogą wywoływać zmiany ilościowe i jakościowe nienasyconych kwasów tłuszczowych w membranach komórkowych, co prowadzi do utraty tolerancji osmotycznej przez grzyby. Zmiany w budowie membran komórkowych związane są ze zmianami w ilości wydzielanych pozakomórkowo enzymów hydrolitycznych [PIETR i in. 1993].

### Wnioski

1. Fungicydy Miedzian 50 WP, Topsin M 70 WP oraz Zaprawa Oxafun T powodują spadek ilości wydzielanych enzymów pektolitycznych i celulolitycznych przez izolaty grzybów *Trichoderma* spp.

### Literatura

APPAIAH K.A.A., PASHA M.M., KARANTH N.G.K. 1993. *Thiram residue estimation by fungal bioassay and its evaluation in paddy and its milled products*. Tropical-Agriculture 70(3): 235–239.

- BORECKI Z. 2001. *Nauka o chorobach roślin*. Warszawa
- CAI Y.J., BUSWELL J.A., CHANG S.T. 1994. *Production of cellulases and hemicellulases by the straw mushroom, Volvariella volvacea*. Mycol. Res. 98(9): 1019–1024.
- CZAJKOWSKA D., ILNICKA-OLEJNICZAK O., WITKOWSKA-GWIAZDOWSKA A. 1992. *Otrzymywanie mutantów Trichoderma reesei – nadproducentów enzymów celulozowych*. Prace Instytutów i Laboratoriów Bad. Przem. Spoż. 46: 5–19.
- DAHM H. 1987. *Cellulolytic and pectolytic activity of nonmycorrhizal fungi associated with roots of forest trees*. Acta Microbiol. Polonica 36(4): 317–324.
- DAHM H. 1996. *Synteza enzymów celulozowych i pektolitycznych u grzybów z rodzaju Fusarium, Rhizoctonia i Trichoderma*. Mat. z Symp. „Nowe kierunki w fitopatologii” Kraków, red. Kowalik M. Kowalski S.: 386–387.
- JANAS P., TARGOŃSKI Z. 1995. *Effect of temperature on the production of cellulase, xylanases and lytic enzymes by selected Trichoderma reesei mutants*. Acta Mycol. 30(2): 255–264.
- JOHANSSON M. 1988. *Pectic enzymes activity of spruce (S) and pine (P) strains of Heterobasidion annosum (Fr.) Berg*. Physiol. Mol. Plant Pathol. 33: 333–349.
- MACHOWICZ-STEFANIAK Z., ZALEWSKA E., KRÓL E. 1998. *Susceptibility of antagonistic microorganisms to some fungicides*. Ann. Agricul. Sci., Ser. E, Plant Prot. 27(1/2): 91–97.
- MONTE E. 2001. *Understanding Trichoderma: between biotechnology and microbial ecology*. Int. Microbiol 4: 1–4.
- PIETR S. J., STANKIEWICZ M., LEWICKA T., ŻUKOWSKA Z. 1993. *Charakterystyka mutantów Trichoderma viride Td50 odpornych na fungicyd Iprodione*. Zesz. Nauk. AR w Szczecinie, Rolnictwo LVII Seria Przyrodnicza 161: 125–137.
- SAS-PIOTROWSKA B., PIOTROWSKI W. 1997. *The reaction of Trichoderma spp. to synthetic and natural pesticide compounds A. Fungicides and their compositions*. Pol. Agricult. Annual, Series E, 26(1/2): 93–101.
- VELDEMAN R. 1993. *Possibilities of Trichoderma for control of tree diseases – 10 years of experience and further perspectives*. Biotechnologia 1(20): 8–13.
- WITKOWSKA D. 1993. *Studia nad biosyntezą i praktycznym wykorzystaniem pozakomórkowych hydrolaz Trichoderma viride*. Zesz. Nauk. AR we Wrocławiu, Rozpr. habilitacyjna 115: 72 ss.

**Słowa kluczowe:** *Trichoderma* spp., enzymy celulozowe i pektynolityczne, fungicydy

### Streszczenie

W pracy przedstawiono wyniki badań nad wpływem herbicydów na aktywność pektolityczną i celulozową następujących grzybów antagonistycznych: *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma pseudokoningii* i *Trichoderma viride*. W badaniach wykorzystano fungicydy: Miedzian 50 WP, Topsin M 70 WP, Zaprawa Oxafun T. Stwierdzono, że badane grzyby różniły się ilością produkowanych enzymów oraz składem kompleksów enzymatycznych. Testowane fungicydy powodo-

wały spadek lub całkowite zahamowanie syntezy liazy pektynianowej, poligalakturonazy, endocelulaz, egzocelulaz oraz  $\alpha$ -glukozydazy. Jedynie Miedzian 50 istotnie zwiększał aktywność  $\beta$ -glukozydazy u *T. pseudokoningii*.

## INFLUENCE OF SELECTED FUNGICIDES ON ENZYMATIC ACTIVITY OF *Trichoderma* spp.

Joanna Dłużniewska

Department of Agricultural Environment Protection,  
Agricultural University, Kraków

Key words: *Trichoderma* spp., cellulolytic and pectolytic enzyme, fungicides

### Summary

Investigations were carried out to study the effect of chemical treatment with fungicides such as Miedzian 50 WP, Topsin M 70 WP and Oxafun T on enzymatic activity of *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma pseudokoningii* and *Trichoderma viride*, known for their antagonism to plant pathogenic fungi. The enzymatic activity was determined on the basis of cellulolytic and pectolytic enzyme production by *Trichoderma* spp. The *Trichoderma* spp. isolates considered in question of synthesized enzymes: polygalacturonic lyase, polygalacturonase, endocellulases, exocellulases and  $\beta$ -glucosidase. Individual fungi differed in the number of enzymes produced and enzymatic complex composition. All tested fungicides caused reduction or total inhibition of enzyme synthesis in *Trichoderma* spp. Only Miedzian 50 significantly increase activity of  $\beta$ -glucosidase in *T. pseudokoningii*.

Dr inż. Joanna **Dłużniewska**  
Katedra Ochrony Środowiska Rolniczego  
Akademia Rolnicza im. H. Kołłątaja  
Al. Mickiewicza 21  
31-120 KRAKÓW  
e-mail: rrdluzni@cyf-kr.edu.pl