

10. SPEYER, W., Die Entwicklung von *Psylla-mali* (Schm.). Arb. über phys. u. angew. Ent. aus Berlin-Dahlem 3: 267–283, 1936.
11. WIESMANN, R., Untersuchungen über die Ueberwinterung des Apfelschorfpilzes, *Fusicladium dendriticum* im totem Blatt, sowie die Ausbreitung der Konidien (Sommersporen) des Apfelschorfpilzes. Landw. Jahrb. der Schweiz. 46: 619–679, 1932.
12. WILSON, E. E., Factors important in the development of perithecia of *Venturia inaequalis* (Cke) Wint. Phytopathology 18: 145–146, 1928.
13. ———, Studies of the ascigerous stage of *Venturia inaequalis* (Cke) Wint. in relation to certain factors of the environment. Phytopathology. 18: 375–418, 1928.

ANTIBIOTISCHE STOFFEN

ALS FUNGICIDE TEGEN *CERCOSPORA NICOTIANAE* OP TABAK ¹⁾

With a summary: Antibiotics as fungicides against Cercospora nicotianae on tobacco

DOOR

Dr P. A. VAN DER LAAN ²⁾

INLEIDING

Gedurende de laatste jaren heeft het onderzoek van antibiotica een grote vlucht genomen. De voornaamste reden daarvan was wel de ontdekking der voortreffelijke eigenschappen van penicilline. Het grootste deel der publicaties over antibiotica betreft dan ook deze stof. De successen der medische wetenschap met penicilline hebben echter ook stimulerend gewerkt op het onderzoek naar andere stoffen, die door schimmels of bacteriën afgescheiden worden en talrijke nieuwe antibiotische stoffen zijn de laatste tijd geïsoleerd.

Voor de bioloog lijkt de mogelijkheid, met antibiotische afscheidingsproducten van schimmels en bacteriën, andere microörganismen te bestrijden, zeer aantrekkelijk. Hierbij wordt immers dadelijk aansluiting gezocht bij de evenwichten, die in de vrije natuur voorkomen. Het wordt meer en meer duidelijk, dat b.v. de schimmelflora van de grond in evenwicht blijft, doordat diverse soorten als elkaars antagonist optreden. Nader onderzoek bracht aan het licht, dat chemische verbindingen, door sommige schimmels afgescheiden, hiervoor verantwoordelijk waren. Deze stoffen bleken de groei van andere schimmels te belemmeren (fungistatische werking) of wel dodend te werken op andere schimmels (fungicide werking). Zo verhinderde b.v. het expansine, afkomstig van *Penicillium expansum* THOM. de groei van *Pythium de baryanum* HESSE (VAN LUYK, 1).

Een ander voorbeeld is het volgende: Eén der gevaarlijkste ziekten van de pisangcultuur is de Panama-ziekte, veroorzaakt door *Fusarium oxysporum* SCHL. *cubense* Wr; op Jamaica was bekend, dat op sommige gronden de Panama-ziekte niet of zelden voorkwam. Nader onderzoek van MEREDITH (8) van de schimmelflora op die plaatsen bracht aan het licht, dat daar enkele Actinomyceten voorkwamen, waarvan de extracten een sterk fungicide werking hadden tegen de schimmel van de Panama-ziekte. Zo kon dus verklaard worden, dat dit bodem-

¹⁾ Ontvangen voor publicatie Sept. 1947.

²⁾ Dit onderzoek werd op het Phytopathologisch Laboratorium „Willie Commelin Scholten” te Baarn verricht. Voor de gastvrijheid mij ten behoeve van dit onderzoek verleend, zeg ik Prof. Dr JONAS WESTERDIJK hierbij gaarne dank.

antagonisme tot resultaat had, dat de Panama-ziekte er niet tot uiting kwam (THAYSEN & BUTLIN, 11).

Van vele andere schimmels is bekend, dat ze remmend of dodend werken op andere fungi. *Trichoderma viride* PERS. ex FR. (= *Tr. lignorum* (TODE) HARZ), een groene houtschimmel heeft antagonistische eigenschappen t.o.v. talrijke andere schimmels, b.v. *Rhizoctonia solani* KUHN. WEINDLING & EMERSON (15) isoleerden er een antibioticum uit, dat gliotoxine genoemd werd. Overzichten van de vele stoffen en hun eigenschappen, die reeds uit schimmels en bacteriën vrijgemaakt zijn, geven o.a. WAKSMAN (13), OXFORD (9) en HOOGERHEIDE (5).

Daar wij ons hier willen beperken tot die antibiotica, die fungistatische eigenschappen hebben, zullen wij er vele, en vaak de bekendste, voorbijgaan. Zo hebben b.v. penicilline en streptomycine alleen belang als bactericiden, doch zijn zij voor ons van geen betekenis. Anderzijds zijn actinomycine en gliotoxine uit medisch-therapeutisch oogpunt van minder belang, daar zij te giftig zijn, doch voor de phytopatholoog verdienen zij belangstelling om hun fungicide eigenschappen.

Nader vergelijkend onderzoek over de fungistatische eigenschappen van een aantal antibiotica deden REILLY, SCHATZ & WAKSMAN (10). De sterkste werking tegen diverse schimmels hadden actinomycine en gliotoxine. Daarop volgde clavacine (= expansine, claviformine of patuline); streptothricine had een matige fungistatische werking, terwijl streptomycine en chaetomine zeer geringe schimmelremmende eigenschappen hadden. Nu zijn actinomycine en clavacine zeer giftig en zouden daardoor bezwaren kunnen opleveren. De meeste perspectieven bieden volgens bovengenoemde auteurs gliotoxine, dat zeer sterk fungistatisch en matig giftig is en streptothricine, dat matig fungistatisch en niet zeer giftig is.

Soms is de groeiremmende werking van de antibiotische stoffen zeer specifiek voor bepaalde schimmels; zo vermeldt TIMONIN (12), dat clavacine reeds in de verdunning 1 : 100.000 de groei van *Ustilago tritici* JENSEN geheel remt, terwijl op andere schimmels de uitwerking veel geringer was: op *Fusarium culmorum* SACC. en *Rhizoctonia solani* KÜHN was de werking nihil, tegen *Helminthosporium sativum* P. K. & B., *Trichophyton* sp. sp. en *Ascochyta* sp. sp. was geringe werking.

HET PROEFOBJECT

De bladspikkel van de tabak, *Cercospora nicotianae* ELL. et EV. komt alleen op tabak in de tropen voor. Veel schade wordt erdoor veroorzaakt op Sumatratabak en op Nieuw-Zeelandse tabakscultures. Op kunstmatige voedingsbodems sporuleert deze schimmel niet. Allerlei pogingen, de in het „Centraal Bureau voor Schimmelcultures” te Baarn aanwezige stam tot sporenvorming te krijgen, mislukten. Evenmin was het mogelijk, tabaksplanten met stukjes mycelium te infecteren; blijkbaar gelukte dit HILL (4) in Australië zonder moeite, doch onze pogingen bleven zelfs in de tropische kas tevergeefs. In Deli kon VAN DER WEY op de volgende wijze tabaksplanten met spikkel infecteren: op plaatsen, waar in de tabaksaanplant veel spikkel was opgetreden, werden monsters grond verzameld, die werden gedroogd en fijngemalen. Deze stofgrond werd gestoven op jonge tabaksplanten in potten, die vervolgens gedurende 2-3 dagen zeer vochtig geplaatst werden en daarna droger. Na ongeveer 10 dagen werden dan de spikkels zichtbaar. Voor mijn onderzoek kon VAN DER WEY mij enige monsters stofgrond uit Deli verschaffen, waarmee wij trachtten op dezelfde wijze in de tropische kas in Baarn de spikkels te verkrijgen. Ook deze pogingen bleven vruchteloos; waarschijnlijk is de nachttemperatuur nog te koud geweest.

De proeven werden dus steeds genomen met de niet-sporulerende cultuur, die veel wit luchtmycelium vormt. Dit mycelium is zeer bros en bij schudden in steriel water kan gemakkelijk een suspensie van hyphe-eindjes verkregen worden, die zeer geschikt is voor uitzaaiingen.

METHODIEK

Voor ons onderzoek naar de antagonistische werking van diverse schimmelstammen tegenover *Cercospora nicotianae* bezigden wij de volgende methoden:

I. Voor het oriënterend testen van Actinomyceten werden deze met *Cercospora* tegelijkertijd en naast elkaar in schalen met havermout-agar geënt. De wijze, waarop beide schimmels al of niet naar elkaar toe groeiden, gaf een ruwe indruk van de mate van antagonisme, die optrad. Bij dergelijke proeven met *Penicillia* gaf ik *Cercospora*, die vrij langzaam groeit, enige dagen voorsprong om overgroeiing door de *Penicillia* te voorkomen.

II. Nauwkeuriger is de volgende methode: Erlenmeyer-kolven van 100 cc werden gevuld met 10 cc vloeibare kers-oplossing en gesteriliseerd. Vier met een rond ponsje van 8 mm diameter uit schalen gestoken schijffjes mycelium van *Cercospora* worden gedurende 3 minuten geschud met 25 cc steriel water. Het water bevat dan talrijke afgebroken hyphe-eindjes en is te gebruiken als infectievloeistof voor de proeven; telkens werd 1 cc in de kolven met kers-oplossing gebracht.

De op hun antagonisme te onderzoeken schimmels werden op vloeibare, synthetische voedingsoplossing gekweekt, bij 26° C. Vervolgens werden de culturen gefiltreerd door een SEITZ-filter en het extract werd in diverse verdunningen toegevoegd aan de met *Cercospora* geïnfecteerde kolven; daarna kwamen de proeven weer in de thermostaat bij 26° te staan. De proeven werden steeds in 2-, 3- of 4-voud genomen; bij elke proef werden enige kolven als controle uitsluitend met *Cercospora* voorzien.

Reeds na 3 dagen ontwikkelen zich in de kolven talrijke kleine kolonies van *Cercospora*, tenzij de remmende of toxische werking der extracten de ontwikkeling verhinderde. De mate van ontwikkeling der spikkelkolonies, alsmede het aantal kolonies, dat tot ontwikkeling komt; bleek een uitstekend en gevoelig criterium te zijn voor de werking der antibiotische schimmelextracten. In de tabellen betekent: – geen groei; $\pm$ weinig groei (1–5 kolonies); + matige groei (5–10 kolonies); ++ vrij goede groei (oppervlak na 7 dagen nog niet volledig overgroeid); +++ goede groei (oppervlak na 7 dagen volledig overgroeid).

UITKOMSTEN

A. Actinomycine-producenten. Elf stammen van *Actinomyces*-soorten werden in schalen geënt tegen *Cercospora* (methode I). De resultaten werden na een maand beoordeeld en de groeifiguren werden getekend. De stam 6841 gaf de beste werking. Deze stam, afkomstig van MEREDITH, is sterk rood gekleurd, wellicht door de aanwezigheid van Actinomycine A (WAKSMAN & WOODRUFF, 14; HOOGERHEIDE, 5). Voor therapeutische doeleinden heeft deze stof geen toepassing gevonden wegens de grote giftigheid voor de mens, die elk gebruik tegen pathogene bacteriën onmogelijk maakt. Ook de stam 6870 en *Actinomyces albus* GASP., stam C 14, tonen duidelijke antagonistische werking op de spikkel. De overigen hebben slechts geringe uitwerking.

De werkzame stammen werden op een synthetische voedingsoplossing gezet en nadat de cultures goed gegroeid waren, hetgeen minstens drie weken duurde, werden de extracten volgens de tweede methode onderzocht. Uit de talrijke proeven lichten wij de volgende:

TABEL 1. *Extracten van Actinomyceten. Groei na 7 dagen*

Verdunningen	1 : 1	1 : 1,33	1 : 2	1 : 4	contrôle
Actinomyces spec. no. 6841	+	++	++	++	+++
no. 6870			+++	+++	+++
Act. albus no. C 14	+++	+++	+++	+++	+++
Act. antibioticus Waks. & Woodr.		+++	+++	+++	+++

Al deze extracten hadden dus weinig of geen werking op *Cercospora*. Zij zijn voor ons van geen betekenis.

B. Streptomycine-producerende schimmels. Voor dit doel werd een tweetal stammen van *Actinomyces griseus* KRAINSKY (no's 6961 en 6962) op dezelfde voedingsbodem als de voorgaande geënt en geëxtraheerd. De resultaten met deze extracten waren als volgt.

TABEL 2. *Extracten van Actinomyces griseus. Groei na 7 dagen*

Verdunningen	1 : 2	1 : 4	1 : 10	contrôle
no. 6961	+	++	+++	+++
no. 6962	±	++	+++	+++

Ook deze stammen hebben slechts een zwakke werking tegen *Cercospora*.

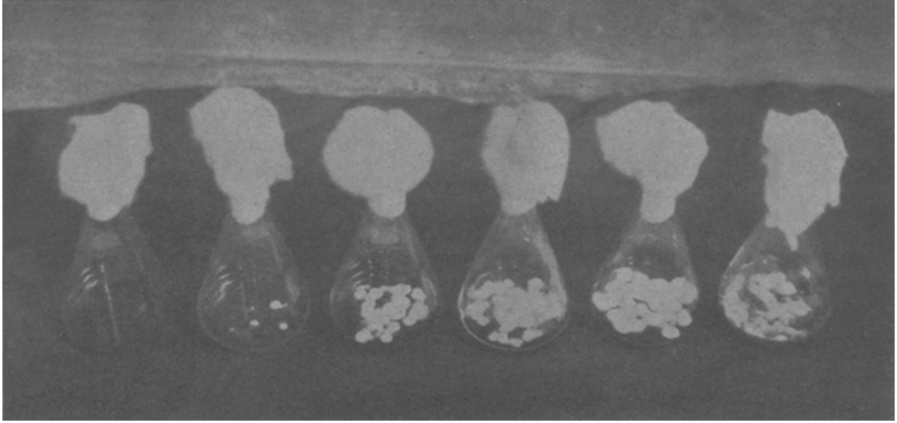
C. Streptothricine. Een producent van dit antibioticum is *Actinomyces lavendulae* WAKSM. & CURTIS. Ook hiervan werden de extracten onderzocht.

TABEL 3. *Extracten van Actinomyces lavendulae. Groei na 7 dagen*

Verdunningen	1 : 2	1 : 4	1 : 10	contrôle
Stam no. 8	-	-	++	+++
Stam no. 14	+++	+++	+++	+++

De stam no 8 vertoont enige fungistatische werkzaamheid, die misschien van belang kan zijn. Streptothricine staat weliswaar niet als een sterk fungicide bekend, maar het is niet giftig, hetgeen van groot voordeel kan zijn.

D. Expansine (= clavacine, patuline). Dit antibioticum werd mij als zuivere stof ter beschikking gesteld door de Fa. Brocades & Stheeman te Amsterdam. Verdunningen in steriel water gaven de volgende uitkomsten (zie ook fig. 1).



Opn. J. Mooi

Fig. 1. Invloed van Expansine (= clavacine = patuline) op de groei van cultures van de veldspikkel van tabak, *Cercospora nicotiana*.

Influence of Expansin (= clavacin = patulin) upon the growth of tobacco frog-eye disease (Cercospora nicotianae).

Concentraties expansine, van links naar rechts <i>Concentrations expansin, left to right</i>	1:10.000	1:50.000	1:100.000	1:200.000	1:500.000	Controle (check)
Groei	—	±	++	+++	+++	+++
<i>Growth</i>	—	±	++	+++	+++	+++

TABEL 4. *Expansine. Groei na 7 dagen*

Verdunningen.	1 : 10.000	1 : 20.000	1 : 40.000	1 : 50.000
Expansine	—	—	—	±
Verdunningen.	1 : 80.000	1 : 100.000	1 : 200.000	contrôle
Expansine	+	++	+++	+++

De fungistatische werking van expansine treedt dus op bij de verdunning 1 : 50.000 en sterkere concentraties. Om na te gaan, of expansine in dergelijke verdunningen bruikbaar zou zijn als fungicide, werden verdunningen van 1 : 25.000, 1 : 50.000 en 1 : 100.000 op tabaksplanten (White Burley) in de kas gespoten. Bij alle concentraties trad lichte verbranding op in de vorm van talrijke kleine necrotische vlekken op het blad. Deze phytocide werking van expansine is een bezwaar voor de toepassing op tabak.

E. Viridine. Kortgeleden ontdekte BRIAN (2), dat bepaalde stammen van *Trichoderma viride* niet het hierna te bespreken gliotoxine, doch een andere antibiotische stof, die hij viridine noemde, afscheidde. Een paar stammen, die speciaal deze stof produceren, werden onderzocht.

TABEL 5.

Viridine. Groei na 7 dagen

Verdunningen.	1 : 2	1 : 4	1 : 10	contrôle
Stam no. 213 (Brian).	+	++	++	+++
Stam Weindling	++	+++	+++	+++

Van deze stammen is de fungistatische werking op *Cercospora* niet groot.

F. Gliotoxine. Andere stammen van *Trichoderma viride* produceren gliotoxine. Tevens wordt gliotoxine door een aantal andere schimmelsoorten in variërende hoeveelheden geleverd. De stammen, die hier onderzocht werden, waren door het C.B.S. uit het laboratorium van BRIAN ontvangen.

TABEL 6.

Gliotoxine. Groei na 7 dagen

Verdunningen	1 : 2	1 : 4	1 : 10	1 : 20	1 : 30	1 : 40
<i>Trichoderma viride</i> , stam no. 211 .	-	-	-	-	-	-
<i>Penicillium terlikowski</i> Zal., stam no. 241	-	-	-	±		
<i>Penicillium jensenii</i> Zal.	±	+	++			

Verdunningen	1 : 50	1 : 60	1 : 100	1 : 200	contrôle
Stam no. 211	±	-	±	+	+++
Stam no. 241	++				+++
<i>Penicillium jensenii</i> Zal.					+++

BRIAN vermeldt, dat de stam 211 van *Trichoderma viride* een sterke producent van gliotoxine is. Ook uit onze proeven blijkt, dat de productie blijkbaar veel groter is dan die van de tevens onderzochte *Penicillia*.

Deze stam 211 kwam dus in aanmerking voor nader onderzoek. De schimmel werd gekweekt op de synthetische oplossing, die door BRIAN (3) wordt opgegeven. De lage pH van deze oplossing is noodzakelijk, daar in oplossingen met hogere pH gliotoxine niet bestendig is. Dit bleek mij ook uit het feit, dat verdunningen van het extract in steriel water reeds na één dag bewaren veel minder werkzaam waren.

Het onverdunde extract bleek langer houdbaar:

TABEL 7.

Houdbaarheid van gliotoxine-houdende extracten

Verdunningen	1 : 40	1 : 60	1 : 100	1 : 200	contrôle
vers.	-	-	±	+	+++
na 1 dag	-	-	-	+	+++
na 3 dagen	-	-	±	+	+++
na 5 dagen	-	±	±	+	+++
na 8 dagen	-	±	±	++	+++

Minstens drie dagen blijft het extract even werkzaam als in verse toestand, terwijl ook na 8 dagen de werking nog maar zeer weinig afgenomen is. Het bewaren geschiedde bij kamertemperatuur.

Het gliotoxinebevattende extract werd voorts in verdunningen van 1 : 10, 1 : 20 en 1 : 50 op jonge tabaksplanten gespoten. Geen enkele maal trad verbranding op.

Gliotoxine heeft dus vele eigenschappen, die de toepassing als fungicide mogelijk maken. Het geeft op een gevoelig gewas als tabak geen verbranding, de fungistatische werking is veel groter dan alle tot nu toe onderzochte antibiotische stoffen, terwijl de matige giftigheid voor de mens voor phytopathologische doeleinden in het algemeen geen bezwaar zal zijn. Of het op commerciële schaal te bereiden valt, evenals thans met penicilline geschiedt, kan ik niet overzien.

CHEMISCHE EIGENSCHAPPEN VAN GLIOTOXINE

Gliotoxine is een kristallijne stof met de formule $C_{13}H_{14}N_2S_2O_4$; het smeltpunt is 185° C, doch bij 165° begint het te ontleden. Het is tamelijk oplosbaar in aceton en chloroform, minder in warme benzeen en alcohol, nog minder in warme methylalcohol. Het is sterk links draaiend. In alkalisch milieu ontleedt de stof snel, terwijl het ook in het licht niet bestendig is. De letale dosis bij konijnen is volgens J. R. JOHNSON c.s. (6) 45 mg/kg, intraveneus toegediend.

De bereiding van gliotoxine uit schimmelcultures geschiedt als volgt (BRIAN & HEMMING, 3).

Het filtraat van de cultuur wordt driemaal geëxtraheerd, met telkens 100 cc chloroform per liter filtraat. Het chloroformextract, watervrij gemaakt met uitgegloeid glauberzout, wordt onder vacuum ingedampt tot een klein volume, waarna overmaat van petroleum-aether (kooktraject 60–80° C) wordt toegevoegd. De gliotoxine slaat dan neer, tesamen met een zekere hoeveelheid harsig, geel materiaal. Dit ruwe gliotoxine kan gezuiverd worden door wassen met een kleine hoeveelheid warme alcohol, waaruit het vervolgens gekristalliseerd wordt. Men krijgt dan kleurloze, naaldvormige kristallen.

SUMMARY

Several fungus extracts containing antibiotics were tested for fungistatic activity on *Cercospora nicotianae*, causing the „frog-eye“-disease of tobacco in the tropics.

The activity of extracts with actinomycin, streptomycin and viridin appeared very weak; an extract containing streptothricin was a little more promising; the pure clavacin is fungistatic against *Cercospora* at the concentration of 1 to 50.000, but burns tobacco-leaves already at 1 to 25.000. Best results gave gliotoxine extracts from *Trichoderma viride*, strain 211 of BRIAN. This antibiotic does not burn tobacco leaves and has a highly fungistatic and fungicidal action.

LITERATUUR

1. P. W. BRIAN: Production of gliotoxin by *Penicillium terlikowskii* Zal. Trans. Brit. Myc. Soc. 29, IV (1946).
2. P. W. BRIAN, P. J. CURTIS, H. G. HEMMING & J. C. MCGOWAN: The produc-

- tion of viridin by pigmentforming strains of *Trichoderma viride*. Ann. Appl. Biol. 33, 2, 190 (1946).
3. P. W. BRIAN & H. G. HEMMING: Gliotoxin, a fungistatic metabolic product of *Trichoderma viride*. Ann. Appl. Biol. 32, 214 (1945).
 4. A. V. HILL: Cercospora leaf-spot (frog-eye) of tobacco in Queensland. Commonwealth Austr. Co. Sci ind. Res. Bull. 88 (1936).
 5. J. C. HOOGERHEIDE: Antibiotic Substances, produced by Soil-Bacteria. Bot. Rev. 10, 10, 599 (1944).
 6. J. R. JOHNSON, W. F. BRUCE & J. D. DUTCHER: Gliotoxin, the antibiotic principle of *Gliocladium fimbriatum*. I. Production, physical and biological properties. Journ. Am. Chem. Soc. 65, 2005 (1943).
 7. A. VAN LUYK: Antagonism between various micro-organisms and different species of the genus *Pythium*, parasitizing upon grasses and lucerne. Med. Phytopath. Lab „W. C. Scholten”, 14, 43 (1938).
 8. C. H. MEREDITH: The antagonism of soil organisms to *Fusarium oxysporum cubense*. Phytopathology 34, 426 (1944).
 9. A. E. OXFORD: The chemistry of antibiotic substances other than penicillin. Ann. Rev. Biochem. 14, 749 (1945).
 10. H. C. REILLY, A. SCHATZ & S. A. WAKSMAN: Antifungal properties of antibiotic substances. Journ. Bacteriol. 49, 6, June 1945.
 11. A. C. THAYSEN & K. R. BUTLIN: Inhibition of the development of *Fusarium oxysporum cubense* by a growth substance produced by Meredith Actinomyces. Nature 156, 3974 (1945).
 12. M. I. TIMONIN: Activity of patulin against *Ustilago tritici*. Sci. Agric. (Canada) 26, 8, 358 (1946).
 13. S. A. WAKSMAN: Microbial antagonisms and antibiotic substances. New York 1945.
 14. S. A. WAKSMAN & H. B. WOODRUFF: *Actinomyces antibioticus*, a new soil organism, antagonistic to pathogenic and non pathogenic bacteria. Journ. Bacteriol. 42, 231 (1941).
 15. R. WEINDLING & O. H. EMERSON: The isolation of a toxic substance from the culture filtrate of *Trichoderma*. Phytopathology 26, 1068 (1936).

KORTE MEDEDELINGEN

VERSCHIJNSELEN BIJ DIVERSE TUINBOUWGEWASSEN, DIE IN VERBAND STAAN MET DE DROGE EN WARME ZOMER¹⁾

With a summary:

Phenomenon on different horticultural crops due to the dry and hot summer

DOOR

P. H. VAN DE POL

Plantenziektenkundige Dienst, Wageningen

Deze verschijnselen kunnen verschillende oorzaken hebben.

1. *Droogte*, gevolgd door verwelking en verbranding. Vooral bij groenten. Planten gaan slap hangen en vertonen van af de rand der bladeren verbrandingsverschijnselen. Soms ook verbranding vlak boven de wortelhals als gevolg van plaatselijke hoge temperaturen.

¹⁾ Ontvangen voor publicatie Nov. 1947.