

DIE ROL VAN ENDOFITIESE FUNGUSSE BY ENKELE SIEKTES VAN
SORGHUM BICOLOR.

Elizabeth Gouws, B.Sc (Honn.)

Verhandeling voorgelê vir gedeeltelike nakoming van die vereistes vir die graad Magister Scientiae in die Departement Plant- en Bodemwetenskappe aan die Potchefstroomse Universiteit vir Christelike Hoër Onderwys.

Leier: Prof. W.J. Jooste

Potchefstroom

1992

VOORWOORD.

By die voltooiing van hierdie verhandeling, is dit vir my 'n besondere voorreg om die volgende persone te bedank.

1. My studieleier Prof. W.J. Jooste vir sy waardevolle hulp en ondersteuning. U positiewe bydra was deurentyd 'n bron van inspirasie.
2. 'n Besondere woord van dank aan my ouers vir hulle aanmoediging en liefdevolle sowel as finansiële ondersteuning.
3. Die SNO vir finansiële ondersteuning.
4. Prof. G.H.J. Krüger en Mnr. L van Rensburg vir u hulp met chluorofilfluoressensie-metings.
5. Mev. Louise Schutte van die Nasionale Fungus Versameling, Instituut vir Plantbeskerming, Pretoria, vir die identifikasie van die *Paecilomyces* sp. en *Penicillium* sp.
6. Instituut vir Graangewasse vir die beskikbaarstelling van sorghumplante vir die isolering van die fungusse, en glashuisfasiliteite.
7. Mnr. N.W. McLaren vir die verskaffing van die patogeen, *Macrophomina phaseolina* as kultuur.
8. Mev. M.J. Wenzel vir die vertaling van die uittreksel na Engels.

Al my lof en dank aan my Skepper wat dit vir my moontlik gemaak het om hierdie taak aan te pak en te voltooi. Sonder die wysheid en krag van Bo sou dit nie moontlik gewees het nie.

INHOUDSOPGAWE

INLEIDING.....	1
1. LITERATUUROORSIG.....	4
1.1 ENDOFITIESE FUNGUSSE.....	4
1.1.1 Interaksie tussen fungusse en grasse.....	5
1.2 FUNGUSINTERAKSIES IN DIE FILLOSFEER.....	7
1.2.1 Oppervlaktmikroflora (epifitiese organis=	
mes.....	7
1.2.1.1 Die beskikbaarheid van fungusin=	
okulum.....	8
1.2.1.2 Die aard van plantoppervlakke....	9
1.2.1.3 Die mikroklimaat van die plantop=	
pervlak.....	9
1.3 ANTAGONISME IN DIE FILLOSFEER.....	10
1.3.1 Antibiotiese stowwe.....	11
1.3.2 Nutriëntkompetiesie.....	11
1.3.3 Parasitisme.....	12
2. DOELSTELLING.....	16
3. ISOLASIE VAN ENDOFIETE UIT SORGHUMLANTE.....	17
3.1 Metode.....	17
3.1.1 Versameling van plantmateriaal.....	17
3.1.2 Isolاسie van endofitiese fungusse.....	17
3.1.2.1 Die gewysigde metode van Kinkel	
en Andrew (1988).....	17
3.1.2.2 Die metode van Riesen (1985)....	18
3.1.2.3 Die metode van Speakman en Krü=	
ger.....	18
3.1.3 Identifikasie.....	18
3.2 Resultate.....	19
3.2.1 Isolاسie van endofiete na toepassing van	
verskillende sterilisasiemetodes.....	19
3.3 Bespreking.....	20
4. BEPALING VAN ANTAGONISME VAN DIE ENDOFIETE TEENOR DIE	
PATOGENE <i>IN VITRO</i>	22
4.1 Metode.....	22

4.1.1	Loodsproef.....	22
4.1.2	Resultate van loodsproef.....	23
4.1.3	Antagonismetoetse tussen ses endofiete en twee patogene.....	25
4.2	Resultate en Bespreking.....	31
4.3	Kwantitatiewe bepaling van die persentasie kolonisasie van sorghumsade deur die patogene en endofiete alleen en in kombinasie.....	49
4.3.1	Resultate en Bespreking.....	50
5.	HERINFEKSIE VAN PLANTE MET ENDOFIETE.....	52
5.1	Doel.....	52
5.2	Metode.....	52
5.2.1	Kweking van steriele sorghumplante.....	52
5.2.2	Kunsmatige infeksie van sorghumplante met endofiete.....	52
5.3	Resultate en Bespreking.....	53
5.4	Bepaling van die aanwesigheid van endofitiese fungusse in die plantmateriaal.....	55
5.4.1	Metode.....	55
5.4.2	Resultate en Bespreking.....	56
6.	CHLOROFILFLUORESENSIE-BEPALINGS.....	59
6.1	Doel.....	63
6.2	Metode.....	63
6.2.1	Infeksiemetode.....	63
6.2.2	Fluorensensie-bepalings.....	63
6.3	Resultate.....	66
6.4	Bespreking.....	72
6.4.1	I/P-verhouding (fotosintese).....	72
6.4.2	r_2 -waardes (helling) (fluorensensie-blussing).....	74
6.4.3	S-waardes (Fo-energieverspreiding).....	75
6.4.4	M-piekwaardes (membraan-integriteit).....	77
7.	SAMEVATTENDE BESPREKING.....	79
	BYLAAG A.....	83
	BRONNELYS.....	84

UITTREKSEL

In hierdie ondersoek is daar gepoog om die potensiaal van endofitiese fungusse as biologiese beheeragense vas te stel. Gevolglik is eers *in vitro* toetse uitgevoer om vas te stel in watter mate hierdie fungusse antagonisties is teenoor die patogene, *Macrophomina phaseolina* en *Phoma sorghina*. Endofitiese fungusse is uit sorghumplante geïsoleer, en na aanvanklike toetse, is enkele endofiete geselekteer vir verdere proewe naamlik *Cladosporium cladosporioides*, *Epicoccum purpurascens*, *Fusarium equiseti*, *Paecilomyces lilacinus*, *Penicillium chrysogenum* en *Phoma* sp.4. Die patogene en endofiete is afsonderlik en in respektiewelike kombinasie op drie groeimediums, naamlik aartappel-dekstrose-agar, sorghum-agar en koringstrooi gekweek, om die mate van antagonisme vas te stel.

C.cladosporioides, *E.purpurascens*, *F.equiseti*, *Paecilomyces lilacinus*, *Penicillium chrysogenum* en *Phoma* sp.4 is wel in staat om die groei van die patogene op al drie groeimediums te rem, in 'n mindere of meerdere mate. Teenoor *M.phaseolina* en *Phoma sorghina* het *Paecilomyces lilacinus* en *E.purpurascens* die grootse potensiaal as antagoniste getoon.

Die potensiaal van die endofiete om sorghumsade in die teenwoordigheid van die patogene te koloniseer, is ook bepaal. 'n Hoë persentasie kolonisasie van sorghumsade is deur al die endofiete in die teenwoordigheid van *M.phaseolina* verkry. In die teenwoordigheid van *Phoma sorghina* is dit slegs *E.purpurascens*, *F.equiseti*, *Paecilomyces lilacinus* en *Penicillium chrysogenum* wat 'n hoë persentasie kolonisasie toon.

Hierdie aspek is ook *in vivo* ondersoek, en daarom is daar aandag gegee aan metodes om sorghumplante kunsmatig met die endofiet te infekteer. Die invloed van die endofiet op die patoogen en op die plant is aan die hand van chlorofilfluo-

ressensie metings bepaal. Hierdie metode is baie sensitief vir enige nadelige of voordelige effekte wat die fungusse op die plantfisiologie kan hê. In die teenwoordigheid van *M.phaseolina* het slegs *E.purpurascens* 'n voordelige effek op fotosintese, terwyl *C.cladosporioides*, *E.purpurascens*, *F.equiseti*, *Paecilomyces lilacinus* en *Penicillium chrysogenum* saam met *Phoma sorghina* 'n positiewe bydra gelewer het.

C.cladosporioides, *E.purpurascens*, *F.equiseti*, *Penicillium chrysogenum* en *Phoma* sp.4 toon 'n tendens om fluoressensieblussing (r_2) in die teenwoordigheid van *M.phaseolina* te bevoordeel. Teenoor *Phoma sorghina* is dit slegs *Paecilomyces lilacinus* wat 'n positiewe bydrae lewer.

Fo-energieverspreiding tydens fotosintese, word bevoordeel deur *F.equiseti* in kombinasie met *M.phaseolina*, en in die teenwoordigheid van *Phoma sorghina* word energieverspreiding deur *F.equiseti* en *Penicillium chrysogenum* bevoordeel.

Behoud van tilakoïedmembraan-integriteit in die teenwoordigheid van *M.phaseolina*, word bevoordeel deur *F.equiseti* en *Phoma* sp.4. Dieselfde is waargeneem by *Phoma sorghina* in kombinasie met *E.purpurascens*, *F.equiseti* en *Phoma* sp.4.

Alhoewel *in vitro* toetse, antagonisme tussen *Paecilomyces lilacinus* en *M.phaseolina* getoon het, is dit nie deur fluoressensie bepalinge bevestig nie. 'n Positiewe effek op verskillende aspekte van die fotosintesereaksie, is deur *Phoma* sp.4 in alle gevalle saam met *M.phaseolina* in die plant getoon.

Daar is bevind dat die endofiete moontlik nie volkome fisiologies by die plant aangepas is nie. Dit kan 'n verklaring wees waarom die endofiete *in vivo* nie so 'n groot effek op die patogene gehad het nie, maar wel *in vitro*.

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the potential of endophytic fungi as biological control agents. Consequently, *in vitro* tests were initially conducted to determine the measure of antagonism which these fungi displayed towards the pathogens, *Macrophomona phaseolina* and *Phoma sorghina*. Endophytic fungi were isolated from sorghum plants and after initial tests a few endophytes, namely, *Cladosporium cladosporioides*, *Epicoccum purpurascens*, *Fusarium equiseti*, *Paecilomyces lilacinus*, *Penicillium chrysogenum* en *Phoma* sp.4 were selected for further experiments. In order to determine the measure of antagonism the pathogens and endophytes were cultured separately and in certain combinations on three growth media, namely potato-dextrose-agar, sorghum-agar and wheatstraw.

C.cladosporioides, *E.purpurascens*, *F.equiseti*, *Paecilomyces lilacinus*, *Penicillium chrysogenum* en *Phoma* sp.4 are, to a certain extent, capable of retarding the growth of the pathogens on all three growth media. *Paecilomyces lilacinus* and *E.purpurascens* proved to have the highest antagonistic potential when compared with *M.phaseolina* and *Phoma sorghina*.

The potential of the endophytes to colonise sorghum seeds in the presence of pathogens was also determined. All the endophytes obtained a high percentage of colonisation of sorghum seeds in the presence of *M.phaseolina*. However, in the presence of *Phoma sorghina* only *E.purpurascens*, *F.equiseti*, *Paecilomyces lilacinus* and *Penicillium chrysogenum* showed a high percentage of colonisation.

As this aspect was also studied *in vivo*, methods of infecting sorghum plants artificially with the endophyte were considered. The influence of the endophyte on the patho-

gen and on the plant was determined by means of chlorophyll-fluorescence measurements. This measure is sensitive to any detrimental or advantageous effects that the fungi might have on the physiology of the plant. In the presence of *M.phaseolina* only *E.purpurascens* had an advantageous effect on photosynthesis, while *C.cladosporioides*, *E.purpurascens*, *F.equiseti*, *Paecilomyces lilacinus* and *Penicillium chrysogenum* in combination with *Phoma sorghina* made a positive contribution.

C.cladosporioides, *E.purpurascens*, *F.equiseti*, *Penicillium chrysogenum* and *Phoma* sp.4 show a tendency to favour fluorescence quenching (r_2) in the presence of *M.phaseolina*. In the presence of *Phoma sorghina* only *Paecilomyces lilacinus* made a positive contribution.

Fo-energy distribution during photosynthesis is favoured by *F.equiseti* in combination with *M.phaseolina* while energy distribution is favoured by *F.equiseti* and *Penicillium chrysogenum* in the presence of *Phoma sorghina*.

Preservation of thylakoid membrane-integrity in the presence of *M.phaseolina* was favoured by *F.equiseti* and *Phoma* sp.4. The same was observed with *Phoma sorghina* in combination with *E.purpurascens*, *F.equiseti* and *Phoma* sp.4.

Although *in vitro* tests indicated antagonism between *Paecilomyces lilacinus* and *M.phaseolina* it was not confirmed by fluorescence determinations. A positive effect on different aspects of photosynthesis reaction was indicated in all cases where *Phoma* sp.4 was present together with *M.phaseolina* in the plant.

The results suggested that the endophytes were physiologically, probable not adapted to the plant. This could ex-

plain why *in vivo* the endophytes did not have such a large effect on the pathogens as they had *in vitro*.

INLEIDING

In die vroeë 1950's het plantpatoloë die potensiaal van fungusse as biologiese beheeragense in die beheer van plantsiektes besef. Hierdie fungusse kan afsonderlik of in kombinasie met 'n chemiesemiddel teen die patogeen aangewend word (Johnston & Booth, 1983).

Dubos & Bulit (1981) het aangetoon dat die natuurlike gesondheid van 'n plant afhang van die balans tussen die plant, die patogene, en die omgewing. Wanneer hierdie ewewig versteur word, is die parasitiese populasie nie langer onder beheer nie, en kan dit lei tot 'n verhoging in die voorkoms van plantsiektes. Dit lei daartoe dat daar dikwels oorweging geskenk word aan die biologiese beheer van plantsiektes, deur gebruik te maak van die interaksie tussen mikro-organismes.

Fry (1982) definieer biologiese beheer as enige toestand waaronder oorlewing of aktiwiteit van die patogeen verminder word, deur enige lewende organisme (behalwe die mens), sodat die effek van die siekte verminder word. Om biologiese beheer te verkry, word antagonistiese organismes gebruik, die omgewingstoestande verander, of weerstandbiedende plante gebruik. Alternatiewe metodes vir plaagbeheer soos byvoorbeeld die ontwikkeling van weerstandbiedende plantkultivars, is gewoonlik tydrowend en die ekonomiese druk op die gebruik daarvan, het die tradisionele kulturele tegnieke van beheer, soos gewasrotasie, beperk (Burge, 1988).

Volgens Burge (1988) is daar sekere redes vir die toenemende belangstelling in biologiese beheer. Een daarvan is die algemene toename in die bewuswording van die potensiele ekologiese probleme wat veroorsaak word deur die gebruik van plaagdoders. 'n Tweede belangrike rede is die feit dat baie chemiesemiddels se effektiwiteit grootliks verminder word as

gevolg van die weerstand wat plaagpopulasies teen hierdie middels ontwikkel. Die probleem ontstaan as gevolg van die feit dat baie plaagdoders spesifieke teikensetels op die sellulêre biologie van die organisme het. Die organisme kan egter deur middel van 'n enkele mutasie die teikensetel verander, sodat die plaagdoder geen effek daarop kan hê nie.

Een van die moontlikhede vir biologiese beheer, is die gebruik van die natuurlike funguspopulasie van die plant. Omdat daar min inligting is oor die betekenis van endofitiese fungusse in die plant, is daar ondersoek ingestel na die moontlike rol van hierdie fungusse in die plant.

Macrophomina phaseolina wat as patoog in hierdie ondersoek gebruik is, veroorsaak houtskoolvrot van wortels en stamme, en die verrotting van vrugte en knolle. Die fungus infekteer meer as 300 plantspesies. Siektesimptome kom gewoonlik voor by die wortels en die laer gedeeltes van die stam. Simptome is egter al by die boppegrondse plantdele ook aangeteken. Geïnfekteerde sorgumsaailinge toon 'n rooi-bruin verkleuring by die gedeelte van die hipokotiel wat bo die grondoppervlak verskyn (Sinclair, 1984). Simptome verskyn ook met veroudering van die plante, of wanneer die plante aan lae grondvog en hoë temperature blootgestel word. Wanneer die stam in die lengte gesny word, kan mikrosklerotiums waargeneem word (Sinclair, 1984).

Volgens Shrotria *et.al.*(1986) veroorsaak *Phoma sorghina* blaarspatvlek by sorghum. In 'n ondersoek na die interaksie tussen graanpatogene van sorghum, het Singh *et.al.* (1986) bevind dat *Fusarium moniliforme* en *Curvularia lunatus* antagonisties is teen *Phoma sorghina*, *in vitro* en *in vivo*.

In hierdie ondersoek word daar aandag gegee aan die moontlike invloed wat die fungusse, wat as endofiete getipeer kan word en deel uitmaak van die natuurlike mikroflora van sorg-

humplante *in vitro* en *in vivo*, op die genoemde patogene kan hê.

1. LITERATUUROORSIG

1.1 ENDOFITIESE FUNGUSSE

'n Endofiet is 'n organisme wat simptoos binne die gasheerplant groei. Dit kan parasities wees, en die hele lewenssiklus of byna die hele lewenssiklus in die gasheerplant voltooi. Daar kan onderskei word tussen ware endofitiese fungusse wat nooit uitwendige vrugliggame op die plantoppervlak vorm nie; en nie ware endofiete, dit wil sê die fungus vorm uitwendige miselium en/of spore wat blom- en saadvorming beïnvloed (Siegel *et.al.* 1987).

Die eerste endofiete wat beskryf is, is deur Unger in 1833 beskou as uitgroeisels wat hy "exanthemata" genoem het. In 1846 herken Lèveillé hierdie uitgroeisels as fungusstrukture, en noem dit "endofitiese fungusse" (Riesen & Close, 1987).

Die endofiet miselium in die saad van raaigras, *Lolium temulentum*, is reeds in 1898 deur Vogl waargeneem. Die vroegste bekende eksemplaar van hierdie gasheer en fungus is 4,400jr. gelede in sade, in die graftombe van 'n Farao in Egipte gevind (Siegel *et.al.* 1987).

Sampson (1933) was die eerste persoon om die sistemiese infeksies van 'n endofitiese fungus, die oordraging daarvan na sade, en die verspreiding daarvan in swenkgras en ander meerjarige grasse op te merk. Hierdie fungus word in ondersteunende en assimilerende weefsel van blaarskedes en blomstiele gevind. Die blaarlamina en wortels word nie geïnfecteer nie (Bacon & Siegel, 1988).

1.1.1 Interaksies tussen fungusse en grasse.

Endofitiese fungusse vorm 'n mutualistiese simbiose met die gasheerplant. Die primêre kenmerke van hierdie assosiasie is:

- (a) die onvermoë om gasheerselle/weefsels af te breek
- (b) sirkulering van voeding- en chemiese stowwe tussen die gasheer en fungus
- (c) 'n langer leeftyd en fotosintesevermoë van die geïnfecteerde weefsels
- (d) beter oorlewingsvermoë van die fungushifes, en
- (e) 'n neiging na groter gasheerspesifisiteit (Siegel *et.al.* 1987).

Siegel *et.al.* (1987) dui verder aan dat die assosiasie van die endofiet met die gasheerplant sekere voordele vir beide organismes het. Vir die endofiet beteken dit voeding, langtermyn beskerming, doeltreffender verspreiding (deur middel van sade), en beter moontlikhede vir oorleving. Vir die gasheer beteken hierdie assosiasie dikwels weerstand teen insekte en ander herbivore.

Volgens White (1988) is *Epichloë typhina* en verwante fungusse, wydverspreid as endofiete in die Poaceae. Navorsing het getoon dat hierdie fungusse 'n verskeidenheid toksiese sindrome by soogdiere kan veroorsaak, en verleen ook weerstand teen 'n reeks insekplae van grasse, soos aangetoon deur Siegel *et.al.* (1987).

Acremonium coenophialum is 'n voorbeeld van 'n endofiet in swenkgras (*Festuca arundinacea*), wat die sogenaamde somersindroom by beeste veroorsaak. Daar bestaan 'n simptoomblose verwantskap tussen lang swenkgras (*F.arundinacea* Schreber) en die parasitiese endofitiese fungus, *A.coenophialum*. Die fungus kom meestal voor in die basis van die blaarskede. Dit reflekteer moontlik die hoë vlakke van koolhidraat- en stikstof-voedselreserwes wat gevind word in die basis van

blaarskedes en in sade (Bacon & Siegel, 1988). In die saad kom die fungus tussen die epiteelselle van die skutellum en die styselagtige endosperm voor. Die embrio van die saad word nie geïnfecteer nie, en infeksie kom ook nie gedurende die vroeë stadiums van ontkieming voor nie (Hinton & Bacon, 1984).

Die saadanatomie en saailinggroei van endofiet-geïnfecteerde en ongeïnfecteerde meerjarige raaigras (*Lolium perenne*) en lang swenkgras (*Festuca arundinacea*), is deur Clay (1987) onder beheerde omgewingstoestande ondersoek. Die persentasie sade wat deur geïnfecteerde lang swenkgras geproduseer is, was twee keer soveel as dié van ongeïnfecteerde lang swenkgras. Geïnfecteerde sowel as ongeïnfecteerde meerjarige raaigras het dieselfde persentasie opbrengs gelewer. Die saadmassas van geïnfecteerde en ongeïnfecteerde plante was dieselfde vir beide spesies. Dit is ook bevind dat sade van geïnfecteerde plante van beide spesies 'n hoër ontkiemings-tempo handhaaf as sade van ongeïnfecteerde plante. Geïnfecteerde meerjarige raaigras het ook 'n hoër biomassa as ongeïnfecteerde plante gehad. Resultate van hierdie ondersoek het getoon dat geïnfecteerde plante 'n voorsprong het bo populasies van ongeïnfecteerde plante.

Fisher *et.al.* (1984) het aangetoon dat endofiete van keël-draende plante lipiede kan benut en ook 'n toleransie vir gallussuur het. Lipiedbenutting dui moontlik op die vermoë om kutikulêre wasse op te los, en die gallussuurtoleransie op die vermoë om met fenoliese verbindings, wat normaalweg in die blaarweefsel teenwoordig is, mee te ding. Dit is moontlik dat beide die eienskappe geassosieer word met blaarpenetrasie en langtermyn vestiging van die endofiet in die blare.

Die endofiete is egter nie net tot voergrasse beperk nie, maar kom ook voor in byvoorbeeld die wortels, blare en ko-

ringare van simptomeelose koringplante (Riesen & Close, 1987). Volgens Riesen (1985) is endofiete geïsoleer uit al die plantdele (blaar, wortel, halm, kelkkaffie en die saadhuid) van koringkultivars wat deur hulle getoets is. Die samestelling van die fungus gemeenskap word nie in 'n groot mate deur die kultivar beïnvloed nie. Daar is ook geen aanduiding gevind dat die verskillende spesies op mekaar 'n invloed het nie.

1.2 FUNGUSINTERAKSIES IN DIE FILLOSFEER.

1.2.1 Oppervlakmikroflora (epifitiese organismes)

Vir die laaste twee dekades het navorsers meer aandag begin gee aan die studie van die biosenose op bopgrondse plantoppervlakke. Dit dui op die buffereffek wat natuurlike saprofitiese mikroflora teen patogene het, byvoorbeeld die bufferrol wat die epifitiese mikroflora op siektes van rog speel. Verder is die verskil in vatbaarheid van twee tabakvarieteite vir *Helminthosporium spiciferum*, ook in verband gebring met die aard van die epifitiese mikroflora, en veral die teenwoordigheid van *Mucor* spp., *Aspergillus* spp. en *Colletotrichum* spp. (Dubos & Bulit, 1981).

Die oppervlakmikroflora of fillosfeermikroflora wat bestaan uit 'n verskeidenheid organismes met komplekse interaksies en die ander komponente van die assosiasie nl. die patogeen, gasheer en antagonis, word beïnvloed deur blaareksudate, wisselende omgewingstemperature, relatiewe humiditeit en vrye water, atmosferiese gasse, lig en uitstraling, wind en lugbesoedeling (Elad 1990). Die oppervlakke van plante voorsien dus 'n habitat vir epifitiese mikro-organismes, wat die groei van patogene kan beïnvloed. Dit is aangetoon dat hierdie saprofitiese organismes 'n baie belangrike rol speel in die vermindering van blaarsiektes. Die aktiwiteit van beide die saprofiete en patogene hang af van die mikroklimaat op die plantoppervlak, die chemiese omge-

wing, en die morfologiese kenmerke van die blaaroppervlak wat ook 'n rol speel, byvoorbeeld digte trigoombedekking en kristalneerleggings van epikutikulêre was (Blakeman & Fokkema, 1982).

Die oppervlakke van hoër plante wat onder natuurlike toestande groei, huisves gewoonlik 'n groot verskeidenheid mikro-organismes. Sommige van die organismes het die vermoë om ekstensief op die oppervlakke van gesonde plante te groei. Ander organismes het die vermoë om op plantweefsel te groei as dit begin verouder, of fisies of fisiologies beskadig word (Dickonson, 1976). Die oppervlakke van blare het baie mikrosetels wat die groei van beide die patoëen en die saprofiet bevoordeel. Alhoewel spore van fungusse soos *Alternaria* spp., *Cladosporium* spp. en *Epicoccum* spp. dwarsdeur die groeiseisoen op blare land, ontkiem en vorm dit meestal kolonies aan die einde van die seisoen wanneer blaarveroudering begin (Blakeman & Fokkema, 1982).

Soos aangetoon is daar verskillende faktore wat die funguspopulasies op plantoppervlakke beïnvloed. Omdat die vestiging van 'n epifitiese mikroflora 'n voorvereiste vir die ontwikkeling van die endofitiese mikroflora is, is dit ook van belang om op relevante inligting in hierdie verband te let.

1.2.1.1 Die beskikbaarheid van fungusinokulum

Die teenwoordigheid van fungusse op plantoppervlakke is die resultaat van die neerlegging van funguspropagules uit die atmosfeer, wat weer verband hou met die produksie van die propagules en hul suksesvolle vrystelling en verspreiding in die atmosfeer deur wind en reën (Dickonson, 1976).

1.2.1.2 Die aard van plantoppervlakke.

Epifitiese mikroflora populasies kan beïnvloed word deur die langlewendheid, makro- en mikromorfologie en die oppervlakchemie van hoërplant organe. Die blare van meerjarige plante in die trope ondersteun 'n komplekse mikroflora. Die fillosfeermikroflora op plante in gematigde streke is egter verskillend. Kleinskaalse oneweredighede in die profiel en oppervlak tekstuur, soos verwerking van die plantoppervlak, teenwoordigheid van trigome en kliere en op mikroskopiese vlak, die teenwoordigheid van waskristalle en die rimpeling van die epidermiswand, kan geskikte mikrohabitate voorsien vir die neerlegging en groei van mikro-organismes (Dickonson, 1976).

1.2.1.3 Die mikroklimaat van die plantoppervlak.

Daar is ten minste drie hoof vlakke van interaksie tussen die klimaat en die werwing van epifitiese organismes, naamlik groei en/of oorlewing en verspreiding van epifitiese organismes. Daar is min bewyse oor die relatiewe belangrikheid van individuele klimaatsfaktore, maar 'n wye verskeidenheid waarnemings lei tot die gevolgtrekking dat dou, humiditeit en blaaroppervlak vogtigheid, belangriker is as temperatuur in die bepaling van die samestelling van epifitiese populasies. Seisoenale klimaatsveranderinge beïnvloed die gasheerplant deur 'n rol te speel by inisiëringsprosesse soos blaarontwikkeling, blominsiasie en blaarafval. Sulke seisoenale veranderinge kan ook beteken dat die plant aan humiditeit-, temperatuur-, en ligintensiteit-uiterstes blootgestel word. Hierdie faktore het 'n invloed op die mikroflora van die plant (Dickonson, 1976).

1.3 ANTAGONISME IN DIE FILLOSFEER.

Omdat die epifitiese mikroflora 'n belangrike rol in plant-siekte ontwikkeling kan speel, is dit belangrik om op die aard van die interaksies tussen fungusse op die plantoppervlak te let. Hierdie interaksies mag 'n rol speel tydens die vestiging van 'n epifitiese mikroflora en dus ook op die endofitiese mikroflora.

Volgens Fokkema (1976) beteken antagonisme die verwantskap tussen organismes, waarin een organisme, die antagonis, ongunstige toestande vir die ander organisme veroorsaak. Antagonisme is 'n begrip wat verwys na die resultaat van 'n interaksie tussen die patogeen en antagonis, sonder 'n duidelike aanduiding van die moontlike meganisme wat betrokke is.

Antagoniste sal nie volhardend en aktief teen patogene kan wees nie, tensy dit by die plantomgewing aangepas is. Om suksesvol te wees in die belemmering van die vestiging van die patogeen, moet die biologiese beheeragense met ander organismes kan kompeteer, en 'n aktiewe populasie op die blaaroppervlak of in die blaar vestig. In baie gevalle egter is biologiese beheermaatreëls gestaak omdat die resultaat wat verkry is, nie dié ewenaar wat verkry word met algemene swamdoders nie (Elad, 1990).

Volgens Elad (1990) het antagoniste verskillende meganismes waarmee dit teen 'n patogeen kan optree, naamlik kompetisie vir aktiewe setels, antibiose, litiese ensieme, fisiese beperking, kruisbeskerming, en groeistimulerig. In natuurlike grond is dit aangetoon (Fry, 1982) dat baie organismes 'n geringe antagonistiese effek het, omdat die antagoniste nie in staat is om te oorleef nie. Dit kan ook wees dat die meganisme van antagonisme oneffektief is of gerem word in 'n komplekse grondomgewing.

Vir die antagonis om op plantoppervlakke suksesvol te wees, moet dit vermeerder en die plantoppervlak koloniseer. Onder sekere toestande kan dit moontlik wees om die groei van die antagonis deur manipulasie van die blaarlamina omgewing te bevorder. Voorsiening van hoë humiditeitstoestande of vry water op die plantoppervlak kan gunstig wees vir die meeste antagoniste, maar verhoog die risiko vir infeksie deur nekrotrofe patogene en roese (Blakeman en Fokkema, 1982).

Antagonistiese interaksies kan gewoonlik deur drie meganismes veroorsaak word, naamlik die vorming van antibiotiese stowwe, nutriëntkompetisie en hiperparasitisme (Blakeman, 1988).

1.3.1 Antibiotiese stowwe

Die produksie van antibiotiese stowwe en ander inhibeerders deur die fungusse, veroorsaak inhibisiesones op agarmedium tussen die antagonis en die patogeen. Alhoewel daar geen direkte bewyse is dat antibiotiese stowwe *in vivo* 'n rol speel by die voorbeelde van antagonistiese interaksies wat voorheen bespreek is nie, is baie navorsers dit eens dat antibiotiese die hoof oorsaak is van antagonisme wat deur hulle waargeneem is (Fokkema, 1976).

1.3.2 Nutriëntkompetisie

Kompetisie vir nutriënte in die fillosfeer, veroorsaak 'n vorm van antagonisme wat soortgelyk kan wees aan die meganisme van grondfungistase. Wanneer nutriëntkompetisie beskou word as 'n meganisme van antagonisme, is die eerste vereiste dat die patogeen wat betrokke is, nutriënte benodig voordat dit die gasheer kan binnedring. Wanneer die patogeen die gasheer binnedring deur dooie plantweefsels of wonde, is daar 'n groter moontlikheid vir nutriëntkompetisie met ander saprotrofe fungusse gedurende die saprofitiese groei van die patogeen (waar van toepassing) op hierdie substrate (Fokkema, 1976).

Kompetisie vir ruimte en nutriënte as essensiële meganisme van antagonisme, is verder deur Dubos & Bulit (1981) aangetoon. Deur blaarslaai met antagonist te inokuleer (*Fusarium* sp. en *Penicillium claviforme*), is die vestiging van *Botrytis cinerea* as patoëen voorkom. Die saprofitiese aktiwiteit op blaarslaai is moontlik verantwoordelik vir die grootskaalse siektebeheer onder natuurlike toestande. Dit is verder ook aangetoon dat grysskimmel op tamaties onder glashuistoestande, beheer kan word deur 'n suspensie van *Cladosporium herbarum* en *Penicillium* sp. te spuit op die blomoorblyfsels wat aan die vrugte kleef.

Die voordeel wat plantpatogene uit eksogene voedingstowwe in die fillosfeer kan behaal, hang grootliks af van die teenwoordigheid van kompeterende saprofiete, en die periode waartydens die voedingstowwe beskikbaar is. Wanneer blare of blomme van eenjarige plante ontluik, is die aanvanklike getal saprofiete baie laag. Wanneer eksogene voedingstowwe op die oppervlakte gedeponeer word, is dit beskikbaar vir die eerste koloniseerders, saprofiete of parasiete (Fokkema, 1981). Vir sekere blaarpatogene is 'n voorsiening van eksogene nutriënte essensieel vir infeksie. Eksogene voedingstowwe kan kieming, miseliumgroei of appresoriumvorming op die blaaroppervlak, sowel as ernstige letselontwikkeling by nekrotrofe patogene soos *Botrytis cinerea* stimuleer (Blakeman en Fokkema, 1982).

1.3.3 Parasitisme

Hiperparasitisme kom voor waar 'n sekondêre parasiet die primêre parasiet parasiteer. 'n Voorbeeld is die beheer van *Claviceps purpurea* deur *Fusarium roseum* wat vanaf *C. purpurea* sklerotiums, geïsoleer is. Verskeie ander sklerotiumvormende patogene word ook deur fungusse geparasiteer. *Trichoderma harzianum* wat geïsoleer is vanaf ontbindende sklerotiums van *Sclerotium rolfsii*, beheer die fungus in die kweekhuis en in die veld (Kuhlman, 1980).

Volgens Dubos & Bulit (1981) kan blare wat deur verpligte patogene geparasiteer word, 'n meer spesifieke mikroflora huisves. Die infeksie van *Melampsora* sp. op blare van *Populus*, deur 'n *Cladosporium* sp., dien waarskynlik om die aantal luggedraagde uredospore te verminder, en beïnvloed dus ook die ontwikkeling van die siekte.

Weinhold en Hancock (1976) het die interessante hipotese dat geëksudeerde chemiese verbindings 'n indirekte rol speel in siekte weerstand, deur organismes te stimuleer wat antagonisties is teen die patoogen. Stowwe wat toksies is teen die patoogen op blaaroppervlakke, kan deur die mikroflora geproduseer word, eerder as deur die gasheer.

Biologiese beheer is 'n gevestigde begrip wat reeds toegepas word. Deur die omgewing te verander, kan die aktiwiteit van die antagonis verhoog word, en dit kan verkry word deur: wisselbou, fisiese verandering (grondvog, grondbewerking), gebruik van chemiese middels, en die gebruik van organiese veranderinge (Fry, 1982).

Die voorkoms van siektes by verskeie plante word vertraag deur sekere saprofitiese fungusse (gewoonlik Hyphomycetes). Die meganisme van vertraging kan gebaseer wees op die induksie van fito-aleksiene, produksie van antibiotiese stowwe, en/of kompetisie vir voedingstowwe. Fito-aleksiene, geïnduseer deur metaboliete wat vrygestel word deur blaarsaprofiete, kan ontkieming van patoogen propagules verminder, en dus ook die voorkoms van die siekte (Suzuki, 1980).

Volgens Dubos & Bulit (1981) is dit bekend dat stuifmeel die groei van nekrotrofe patogene, sowel as saprofiete op blare kan stimuleer. Daar is aangetoon dat *Cladosporium cladosporioides* die stimulerings effek van stuifmeel op infeksie van rogblare deur *Cochliobolus sativus* verminder. Die effektiwiteit van hierdie antagonis teen *Phoma betae* op suikerbeet=

blare is ook verhoog deur die toevoeging van stuifmeel. Die teenwoordigheid van verskeie saprofiete op die blare van gewasse kan dien om surplus voedingstowwe wat van die suifmeel afkomstig is, te benut.

Epicoccum purpurascens en *Aureobasidium pullulans*, wat beide ook komponente van die mikroflora van koolplante is, vermindert die suksesvolle infeksie van koolblare deur *Alternaria brassicicola* (Dubos & Bulit, 1981).

Siektebeheer met antagonistiese organismes is nog selde grootskaals met sukses as siektebeheermaatreëls toegepas. Volgens Suzuki (1980) kan daar drie redes aangevoer word, naamlik:

- (1) antagonistiese fungusse is vreemde organismes, en hulle populasies is dikwels moeilik om te stabiliseer
- (2) antibiotiese stowwe word nie in groot hoeveelhede in die grond geproduseer nie, en
- (3) as dit geproduseer word, kan dit nie in die grond stabiliseer nie.

Suzuki (1980) beweer verder dat die aktiwiteit van blaarmikro-organismes versnel kan word deur voedingstowwe op die blaaroppervlak te spuit. Deur vrugtebome na die oes en voor ontblaring met ureum te spuit, word die normale oorwintering van *Venturia inaequalis* op die blare onderdruk. Hierdie verskynsel is meer gebaseer op die geïnduseerde sinergisme van mikro-organismes op die blare, as op die direkte invloed van ureum op die patoëen.

Die praktiese gebruik van antagonistiese fungusse in siektebeheer as 'n vorm van biologiese beheer skep dus 'n groot uitdaging vir plantpatoloë (Fokkema, 1976).

Die produksie van antibiotiese stowwe en ander inhiberende stowwe deur mikro-organismes, insluitende biologiese beheer=

agense en blaarpatogene, is hoofsaaklik nog net *in vitro* bestudeer (Elad, 1990). Volgens Blakeman (1988) is daar 'n groot getal mikro-organismes wat die potensiaal het om die groei van blaarpatogene *in vitro* of op die gasheerplant, onder gekontroleerde of semi-gekontroleerde omgewingstoestande, te beperk. Hierdie moontlikhede moet egter nog ondersoek word.

2. DOELSTELLING

In hierdie ondersoek is die moontlikheid vir die aanwending van endofitiese fungusse in die beheer van plantsiektes ondersoek. *Sorghum bicolor* en die plant se natuurlike mikroflora is as modelsisteem gekies in die studie oor die moontlike rol van endofitiese fungusse in biologiese beheer van blaar- en stamsiektes van *Sorghum bicolor*.

Die volgende doelwitte is gestel om die doelstelling te bereik.

1. Die suksesvolle oppervlaksterilisering van plantmateriaal.
2. Die isolasie en identifikasie van endofitiese fungusse.
3. Die bepaling van die interaksie tussen die endofiet en patoogen *in vitro* en *in vivo*.
4. Die kweking van steriele sorghumplante.
5. Die kunsmatige infeksie van plante met die endofiet en patoogen, en die bepaling van enige invloed wat dit op die groei en ontwikkeling van die plant sowel as die patoogen het.
6. Die ligmikroskopiese ondersoek van die endofiet geïnfecteerde plante.
7. Chlorofilfluoressensie metings om te bepaal wat die effek van die endofiet alleen en endofiet/patoogen kolonisasie op die metabolisme van die gasheer is.

3. ISOLASIE VAN ENDOFIETE UIT SORGHUMLANTE

Om te kan bepaal of endofitiese fungusse 'n rol kan speel in die biologiese beheer van plantpatogene, is dit nodig om vas te stel watter fungusse as endofiete in die plant aanwesig is. Doeltreffende oppervlaksterilisasië sonder benadeling van die fungusse is in dié geval van groot belang en die mees geskikte metode moet bepaal word.

3.1 Metode

3.1.1 Versameling van plantmateriaal

Sorghumlante, vir die isolasie van endofitiese fungusse, is uit proefpersele van die Navorsingsinstituut vir Graangewasse te Potchefstroom gedurende April 1990 versamel.

3.1.2 Isolasië van endofitiese fungusse.

Vir die isolasië van endofitiese fungusse is daar van verskillende metodes gebruik gemaak om die plante oppervlak-kig te steriliseer. Die metodes wat gebruik is, is die volgende:

3.1.2.1 Die gewysigde metode van Kinkel en Andrew (1988)

Die blare word in 15% H_2O_2 vir 75-95 sek gedompel. Elke blaar is daarna vir 1 h in 100cm³ fosfaatbuffer (Long, 1961) waarvan die pH 6.0 is, gewas. Hierdie buffer het ook 0.01% Tween 60 bevat om die oppervlakspanning te breek. Die fosfaatbuffer het bestaan uit 80cm³ 0.5M KH_2PO_4 -oplossing en 7cm³ van 0.5M Na_2HPO_4 -oplossing. Hierna is elke blaar in gesteriliseerde gedistilleerde water gewas en 5mm blaar-stukkies is daarna op aartappel-dekstrose-agar (Biolab) in Petri-bakkies uitgeplaas. Die aartappel-dekstrose-agar (ADA) plate is vir een of meer weke in die donker by 24C geïnkubeer, waarna van die uitgroeiende fungushifes oorgeplaas is na gesteriliseerde ADA-plate.

3.1.2.2 Die metode van Riesen (1985)

Hierdie metode is gebruik om die saad-, stam- en ook blaar-oppervlakke te steriliseer. Die plantdele (4cm) is in 96% etanol vir 60 sek gedompel om die oppervlakspanning te verbreek en beter benatting te verseker. Daarna is die plantdele oppervlakkig gesteriliseer in 'n oplossing van een deel kommersiële Jik (natriumhipochloriet, 1.31%) tot 5 dele water vir 180 sek. Hierna is die plantdele drie keer in gesteriliseerde gedistilleerde water gewas en 5mm gedeeltes is op moutekstrakagar (2%; Difco) uitgeplaat. Die plate is vir agt weke in die donker in 'n inkubasiëkamer by 20-24°C geïnkubeer. Van die fungushifes wat uit die plantdele gegroei het, is oorgeplant na 1% moutekstrakagar en onder dieselfde toestande geïnkubeer.

3.1.2.3 Die metode van Speakman en Krüger (1983)

Hierdie metode is vir saadsterilisasië gebruik. Droë sade en sade wat vir 20 h in H₂O geweek is, is gebruik. Die sade is in 0.1% HgCl₂ vir 10 min en daarna in 70% etanol vir 5 min geplaas. Beide oplossings het 0.01% Tween 60 as benattingsmiddel bevat. Hierna is die sade drie keer met gesteriliseerde gedistilleerde water gewas, en op gesteriliseerde ADA in Petri-bakkies geplaas en in die donker by 24°C geïnkubeer. Uitgroeïende fungushifes is na 1% ADA oorgeplaas.

3.1.3. Identifikasië

Vir die identifikasië van die fungusse is die volgende bronne gebruik: Ellis (1971), Ellis (1976), Ellis & Ellis (1985), Nelson *et.al.* (1983) en Raper & Fennell (1965).

In Tabel 1 word die fungusse wat geïsoleer is na toepassing van drie sterilisasiëmetodes gegee. Die fungusse wat uit ongesteryliseerde plante (kontrole) geïsoleer is, word ook vermeld.

3.2 Resultate

3.2.1 Isolasië van die endofiete na toepassing van verskillende sterilisasiemetodes.

Tabel 1: Lys van fungusse wat as endofiete beskou kan word wat uit sorghumplante geïsoleer is na toepassing van verskillende sterilisasiemetodes.

Sterilisasiemetode en fungusse wat geïsoleer is.	Plantdeel
Kinkel & Andrew (1988) se metode	
<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen) de Vries	blaar
<i>Epicoccum purpurascens</i> Ehrenb	blaar
<i>Fusarium equiseti</i> (Corda) Sacc. sensu Gordon	blaar
<i>Phoma</i> sp.1	blaar
<i>Phoma</i> sp.2	blaar
<i>Phoma</i> sp.3	blaar
<i>Phoma</i> sp.4	blaar
<i>Phoma</i> sp.5	blaar
Speakman & Krüger (1983) se metode	
<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen) de Vries	saad
<i>Paecilomyces lilacinus</i> (Thom) Samson	saad
<i>Penicillium chrysogenum</i> Thom	saad
<i>Phoma</i> sp.6	saad
<i>Phoma</i> sp.7	saad

Tabel 1: (vervolg)

Riesen (1985) se metode	
<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen) de Vries	blaar
<i>Epicoccum purpurascens</i> Ehrenb	blaar
<i>Fusarium equiseti</i> (Corda) Sacc. sensu Gordon	stam
<i>Paecilomyces lilacinus</i> (Thom) Samson	blaar
<i>Penicillium chrysogenum</i> Thom	blaar
<i>Phoma</i> sp.7	saad
Kontrole (ongesteriliseerde plante)	
<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissler	blaar
<i>Alternaria citri</i> Ellis & Pierce apud Pierce	blaar
<i>Aspergillus niger</i> groep van Tiegh	blaar
<i>Aspergillus flavus</i> groep Link	blaar
<i>Curvularia pallescens</i> Boedijn	blaar
<i>Drechslera stadium</i> van <i>Cochliobolus spicifer</i> Nelson	stam
<i>Drechslera papendorfii</i> (Van der Aa) M.B. Ellis	blaar
<i>Paecilomyces lilacinus</i> (Thom) Samson	blaar
<i>Penicillium chrysogenum</i> Thom	blaar
<i>Phoma</i> sp.3	saad
<i>Phoma</i> sp.4	saad
<i>Rhizopus</i> sp.	saad
<i>Trichothecium roseum</i> Link	stam

3.3 Bespreking

As gevolg van die mate van oorvleueling van fungusse wat tydens verskillende sterilisasiemetodes geïsoleer is, is daar vir verdere sterilisasie doeleindes op die metode van Riesen (1985) besluit. Die rede hiervoor is dat dié metode effektief en ook minder tydrowend is.

Alhoewel *Phoma* sp., *Paecilomyces lilacinus* en *Penicillium chrysogenum* ook uit die ongestertiliseerde plante geïsoleer is, is daar ook 'n aantal ander fungusse (Tabel 1) wat uit die ongestertiliseerde plante geïsoleer is. Die afleiding kan gemaak word dat die sterilisasiemetodes wat gebruik is, dus effektief is om endofitiese fungusse te isoleer.

4. BEPALING VAN ANTAGONISME VAN DIE ENDOFIETE TEENOR DIE PATOGENE *IN VITRO*.

Die doel van hierdie deel van die ondersoek is om te bepaal of die endofitiese fungusse, wat uit die verskillende plantdele geïsoleer is, antagonisties teenoor die twee patogene naamlik *Macrophomina phaseolina* en *Phoma sorghina* is. Die toetse is *in vitro* op verskillende groeimediums gedoen.

4.1 Metode

4.1.1 Loodsproef

Al die isolate van die endofitiese fungusse in Tabel 1 is aanvanklik teenoor die twee patogene, *M.phaseolina* en *Phoma sorghina* getoets. Hiervoor is die endofiete en patogene afsonderlik op gesteriliseerde aartappel-dekstrose-agar (ADA), waarby chloromycetin (250 mg l^{-1}) en penbritin (250 mg l^{-1}) antibiotikums gevoeg is, aan die een kant van die Petri-bakkie (60mm deursnee) geplant. Hierdie proef het as kontrole gedien van die werklike groei van die fungusse waarby geen antagonis betrokke is nie. Die groei van die fungusse is daaglik onder die stereomikroskoop gemeet.

Om vas te stel watter van die bogenoemde fungusse die grootste mate van antagonisme toon, is die endofitiese fungusse ook elkeen afsonderlik teenoor *M.phaseolina* en *Phoma sorghina* respektiewelik op ADA aan teenoorgestelde kante in die Petri-bakkie geplant. Die planting is gedoen deur inokulum te plaas in elke helfte van die bakkie. Daaglikse metings van die groei is onder die stereomikroskoop gedoen, deur die radius vanaf die punt van inokulasie tot by die vlak van interaksie te meet (Tabel 2 en 3).

4.1.2 Resultate van loodsproef.

Tabel 2: Die gemiddelde groei (in mm.) van *Macrophomina phaseolina* teenoor die onderskeie fungusse wat as endofiete uit die plantmateriaal geïsoleer is na 12 dae op aartappel-dekstrose-agar (Loodsproef).

Fungusse	Gemiddelde groei
<i>M. phaseolina</i> alleen	60.0
<i>M. phaseolina</i> + <i>Cladosporium</i>	43.4
<i>M. phaseolina</i> + <i>Epicoccum</i>	30.6
<i>M. phaseolina</i> + <i>Fusarium</i>	32.2
<i>M. phaseolina</i> + <i>Paecilomyces</i>	33.8
<i>M. phaseolina</i> + <i>Penicillium</i>	43.6
<i>M. phaseolina</i> + <i>Phoma</i> sp.1	33.6
<i>M. phaseolina</i> + <i>Phoma</i> sp.2	20.3
<i>M. phaseolina</i> + <i>Phoma</i> sp.3	24.0
<i>M. phaseolina</i> + <i>Phoma</i> sp.4	20.6
<i>M. phaseolina</i> + <i>Phoma</i> sp.5	31.3
<i>M. phaseolina</i> + <i>Phoma</i> sp.6	38.6
<i>M. phaseolina</i> + <i>Phoma</i> sp.7	32.6

Tabel 3: Gemiddelde groei (in mm.) van *Phoma sorghina* teenoor die onderskeie fungusse wat as endofiete uit die plantmateriaal geïsoleer is na 12 dae op aartappel-dekstrose-agar (Loodsproef).

Fungusse	Gemiddelde groei
<i>Phoma sorghina</i> alleen	43.2
<i>Phoma sorghina</i> + <i>Cladosporium</i>	31.6
<i>Phoma sorghina</i> + <i>Epicoccum</i>	15.8
<i>Phoma sorghina</i> + <i>Fusarium</i>	12.0
<i>Phoma sorghina</i> + <i>Paecilomyces</i>	21.8
<i>Phoma sorghina</i> + <i>Penicillium</i>	27.2
<i>Phoma sorghina</i> + <i>Phoma</i> sp.1	27.6
<i>Phoma sorghina</i> + <i>Phoma</i> sp.2	33.6
<i>Phoma sorghina</i> + <i>Phoma</i> sp.3	35.6
<i>Phoma sorghina</i> + <i>Phoma</i> sp.4	27.4
<i>Phoma sorghina</i> + <i>Phoma</i> sp.5	28.3
<i>Phoma sorghina</i> + <i>Phoma</i> sp.6	42.0
<i>Phoma sorghina</i> + <i>Phoma</i> sp.7	32.3

Uit hierdie loodsproef is ses fungusspesies geïdentifiseer om die mees antagonisties teenoor *M.phaseolina* en *Phoma sorghina* te wees, naamlik *Cladosporium cladosporioides*, *Epicoccum purpurascens*, *Fusarium equiseti*, *Paecilomyces lilacinus*, *Penicillium chrysogenum* en *Phoma* sp.4. Daar is op *Phoma* sp. 4 besluit omdat dit die patogene se groei die meeste gerem het. Daar kon net so wel van die ander *Phoma* sp. isolate gebruik word, omdat hierdie spesies ook die groei van die patogene rem.

4.1.3 Antagonismetoetse tussen ses endofiete en twee patogene.

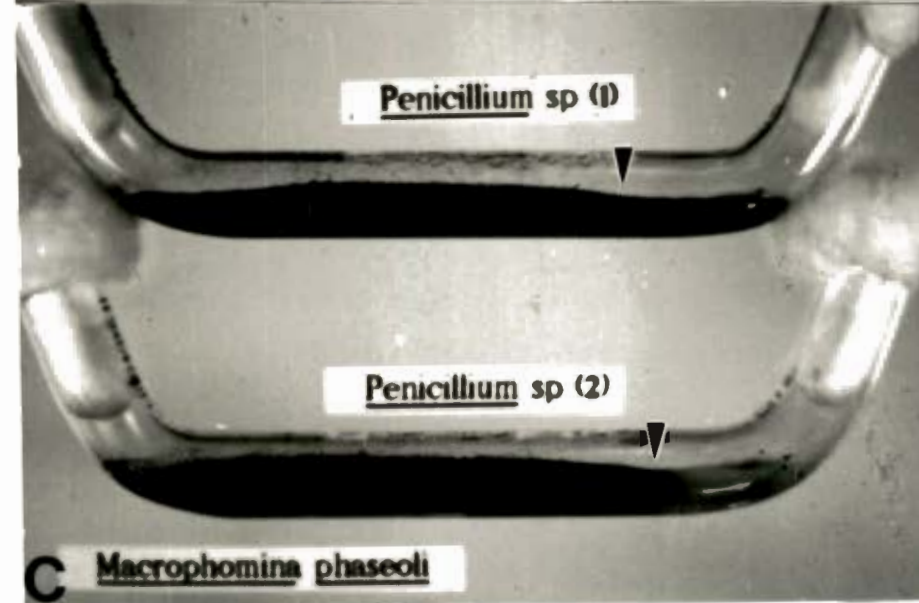
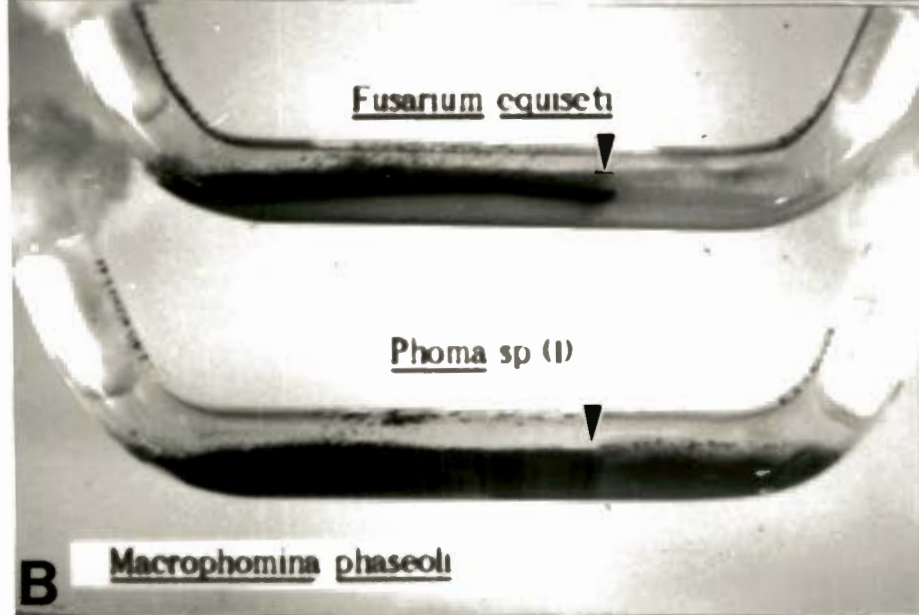
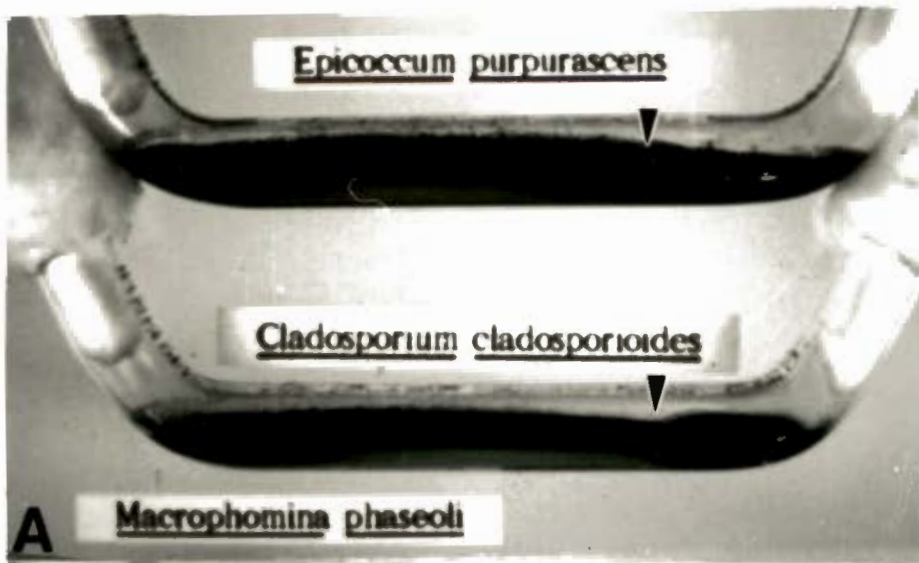
Aangesien die radiale groei van fungusse in Petri-bakkies nie altyd 'n bevredigende aanduiding van die antagonisme van een fungus teenoor 'n ander gee nie (funguskonidiums word maklik tydens hantering van die bakkies op die agar versprei, sodat aaneenlopende groei nie noodwendig verkry word nie), is besluit om eerder liniêre groei as maatstaf te gebruik. Vir hierdie doel is spesiale borosilikaat glasbuis laat maak waarin die fungusse op teenoorgestelde kante op groeimediums geplaas is, en dus direk na mekaar kan groei. Hierdie buise is ongeveer 110mm lank en 12mm in deursnee, oop aan beide kante en die uiteindes is effens opgebuig (Plaat 1 en 2).

Drie verskillende groeimediums naamlik aartappel-dekstrose-agar (ADA; voorbereiding in bylaag A), sorghum-agar (SA; voorbereiding in bylaag A) en koringstrooi, is gebruik om antagonisme tussen die fungusse in die spesiale buise te bepaal.

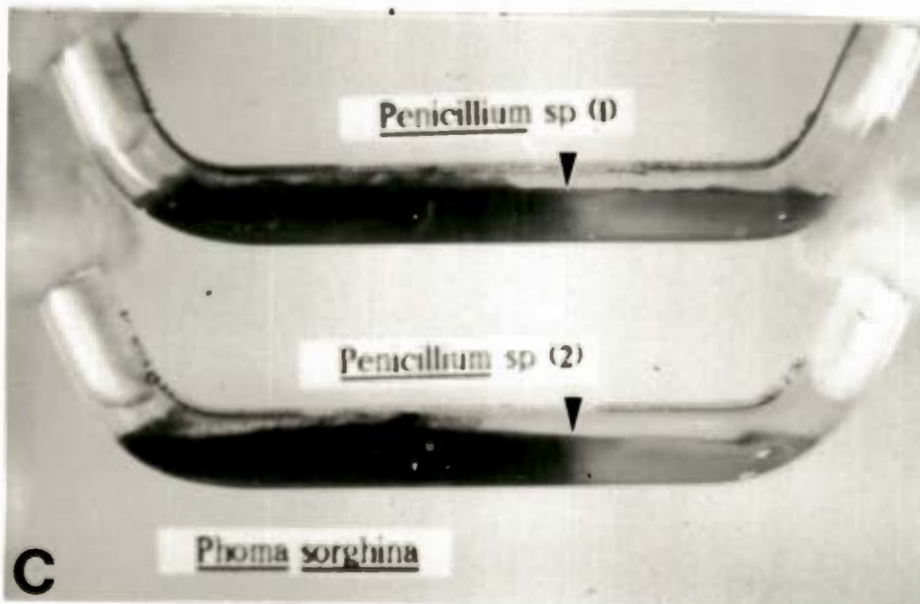
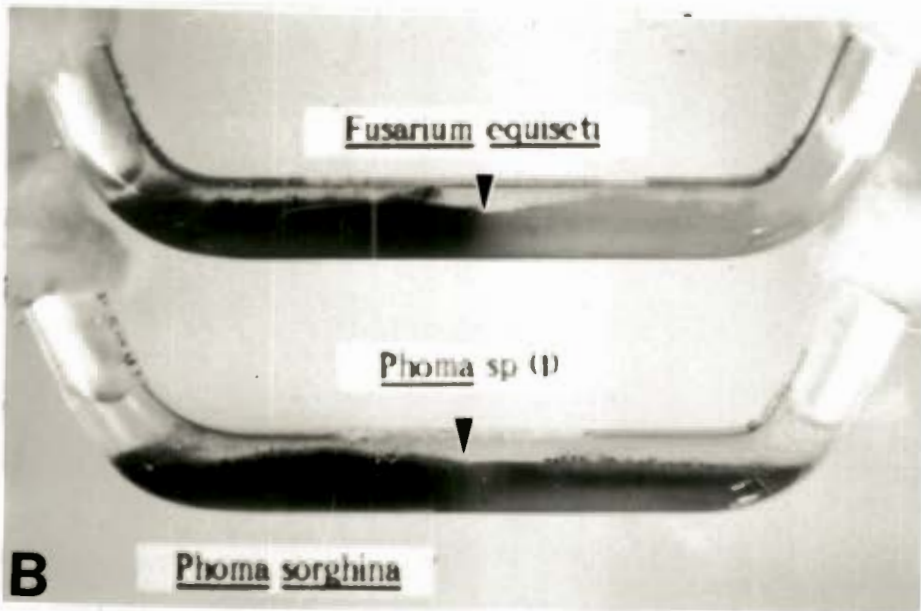
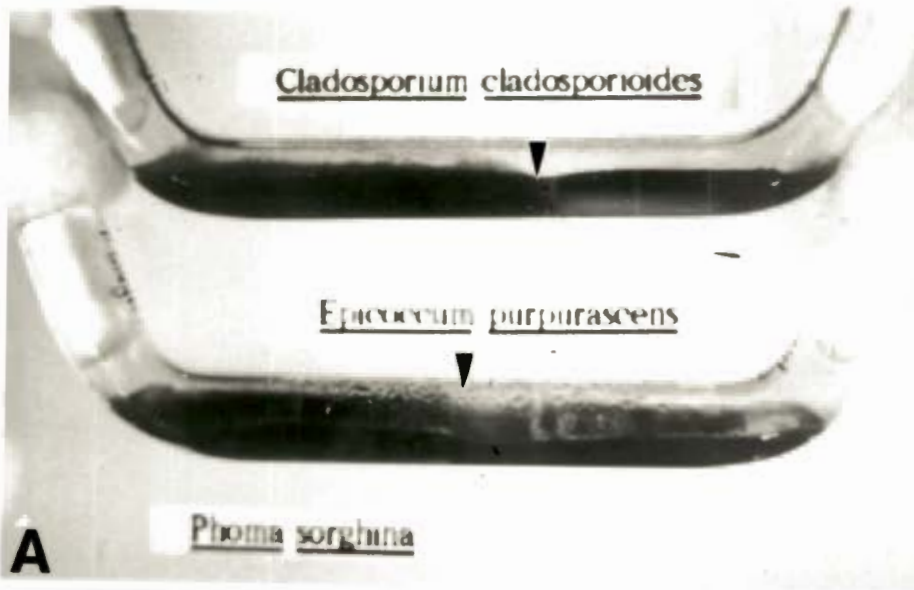
Om die groeitempo van elkeen van die fungusse te bepaal, is *M.phaseolina*, *Phoma sorghina*, *C.cladosporioides*, *E.purpurascens*, *F.equiseti*, *Paecilomyces lilacinus*, *Penicillium chrysogenum* en *Phoma sp.4* alleen op die een kant van die buise met ADA en SA geplant (kontroles) en die lengtegroei is daaglik onder die stereomikroskoop gemeet. Vyf herhalings is vir elke fungus gedoen.

Om die mate van antagonisme tussen die fungusse vas te stel, is die patoogen en endofiet op teenoorgestelde kante in die buise geplant (Plaat 1 en 2). Ook hier is vyf herhalings van elke endofiet teenoor die spesifieke patoogen gedoen. Hierdie buise is vir 'n periode van tot 12 dae by 24°C gekubeer. Tydens hierdie inkubasieperiode is die groei van die fungusse daaglik onder die stereomikroskoop gemeet

Plaat 1: Die groei van *Macrophomina phaseolina* teenoor die endofiete op groeimedium in die spesiale buise. (A) *Epicoccum purpurascens* en *Cladosporium cladosporioides* oor *M.phaseolina* respektiewelik, (B) *Fusarium equiseti* en *Phoma* sp.4 teenoor *M.phaseolina*, (C) *Penicillium chrysogenum* en *Paecilomyces lilacinus* teenoor *M.phaseolina*.
Penicillium sp.1 = *Penicillium chrysogenum*
Penicillium sp.2 = *Paecilomyces lilacinus*



Plaat 2: Die endofiete teenoor *Phoma sorghina* op aartappeldekstrose-agar. (A) *Cladosporium cladosporioides* en *Epicoccum purpurascens* teenoor *Phoma sorghina*, (B) *Fusarium equiseti* en *Phoma* sp.4 teenoor *Phoma sorghina*, (C) *Penicillium chrysogenum* en *Paecilomyces lilacinus* teenoor *Phoma sorghina*.
Penicillium sp.1 = *Penicillium chrysogenum*
Penicillium sp.2 = *Paecilomyces lilacinus*



vanaf die punt van inokulasie tot by die vlak van interaksie.

Vir die derde en meer natuurlike substratum, is luggedroogde koringhalms gebruik. Die halms is in 40mm lengtes gesny en met etileenoksiedgas vir 24 h gesteriliseer, gelaat vir 48 h om te ontgas en daarna in gesteriliseerde gedistilleerde water vir 10 min geweek. Hierdie koringstukkies is op gesteriliseerde voorwerpglasies (76x26mm) op vogtige, gesteriliseerde filtreerpapier in Petri-bakkies geplaas wat as vogkamer gedien het. *M.phaseolina*, *Phoma sorghina*, *C.cladosporioides*, *E.purpurascens*, *F.equiseti*, *Paecilomyces lilacinus*, *Penicillium chrysogenum* en *Phoma* sp.4, is alleen op die een kant van die stukkie halm geplaas as kontrole om die ongeïnhibeerde groei van die fungusse te bepaal. Die Petri-bakkies is vir 'n periode van 7 dae by 24°C geïnkubeer en die groei van elke fungus op die halmstukkies is daaglik onder die stereomikroskoop gemeet.

Om antagonisme te bepaal, is die endofiet en patogeen op die teenoorgestelde kante van die koringhalmstukkies geplaas en vir 'n periode van 7 dae by 24°C geïnkubeer. Elke funguskombinasie is drie keer herhaal. Ook hier is die groei van die fungusse daaglik soos hierbo gemeet.

Statistiese ontleding van data is met behulp van veelfaktorvariëansie analise met Statgraphics (Plus Ware) program gedoen.

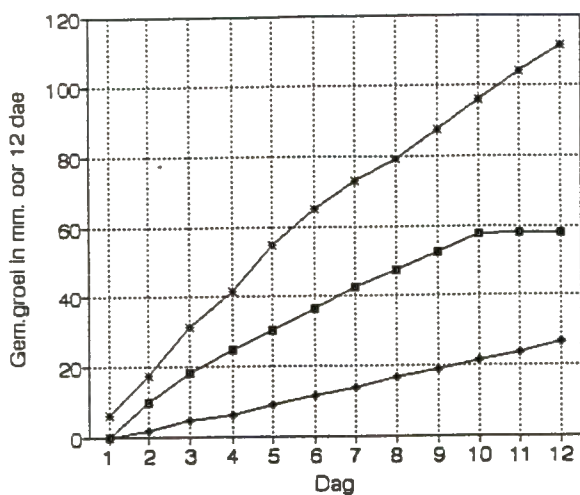
4.2 Resultate en Bespreking

Die resultate van die groei-remming van *M.phaseolina* deur die endofiete soos in die glasbuis op ADA en SA bepaal, word in Figure 1 en 3 gegee. Die groei van die patogeen, *M. phaseolina* word deur al die endofiete, naamlik *C.cladosporioides*, *E.purpurascens*, *F.equiseti*, *Paecilomyces lilacinus*, *Penicillium chrysogenum* en *Phoma* sp.4 op ADA in 'n baie groot mate (20mm en meer) gerem (Figuur 1: a-f). Daar kan gesien word dat daar geen betekenisvolle verskil binne die groep is nie (Tabel 4). *Paecilomyces lilacinus* het die groei van *M.phaseolina* die meeste gerem, terwyl *E. purpurascens* en *Penicillium chrysogenum* ook 'n betekenisvolle effek gehad het.

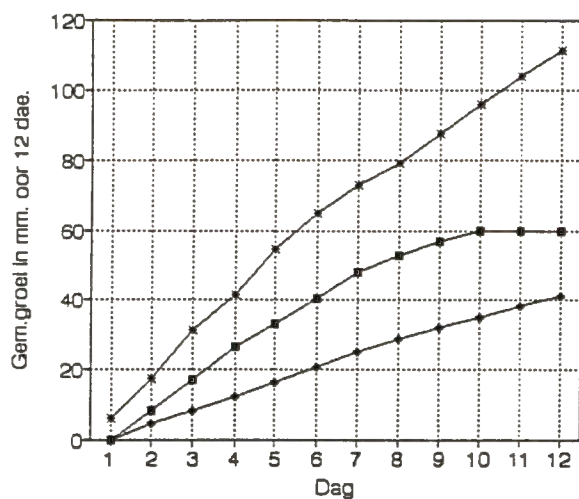
Teenoor *Phoma sorghina* is al die endofiete nie in so 'n groot mate antagonisties nie (Figuur 2 a-f). Endofiete wat wel die groei van die patogeen in 'n groter mate gerem het, is *Paecilomyces lilacinus* (Figuur 2d), *Penicillium chrysogenum* (Figuur 2e) en *Phoma* sp.4. (Figuur 2f). In hierdie geval is dit slegs *Paecilomyces lilacinus* wat betekenisvol van *Phoma sorghina* verskil (Tabel 5).

Die groei van die patogeen, *M.phaseolina* teenoor die onderskeie endofiete is ook op sorghum-agar (SA) getoets. Op SA verskil die antagonisme tussen die fungusse, van dit wat op ADA waargeneem is. Dit kan afgelei word uit figure 3(a-f). Dit is slegs 'n kleiner getal endofiete naamlik *E.purpurascens*, *F.equiseti* en *Phoma* sp.4 wat die groei in 'n groot mate rem. *E.purpurascens* en *F.equiseti* het die groei van *M.phaseolina* hoogs betekenisvol gerem (Tabel 6).

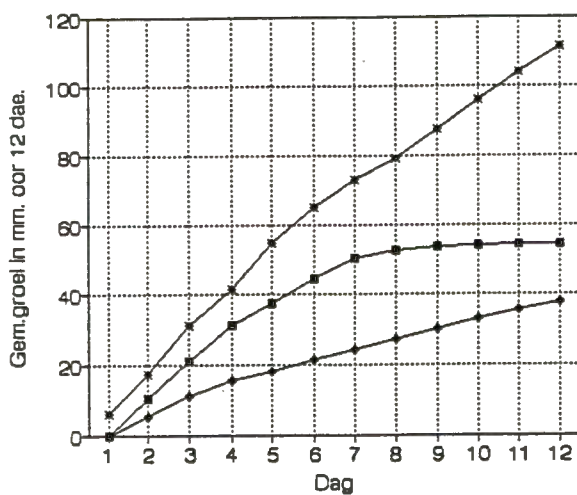
Indien daar na die groei van die patogeen, *Phoma sorghina* op SA (Figuur 4a-f) gekyk word, is dit slegs *C.cladosporioides* (Figuur 4a), *E.purpurascens* (Figuur 4b) en *F.equiseti* (Figuur 4c) wat remming in 'n groter mate veroorsaak het.



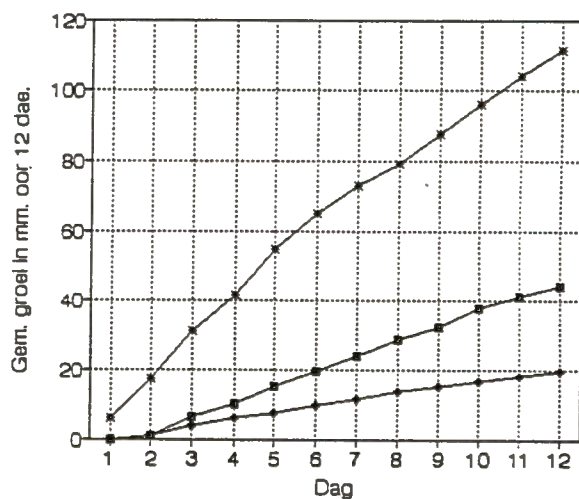
a. —■— M.phas. + Clad. —●— C.cladosporioides —▲— M.phaseolina



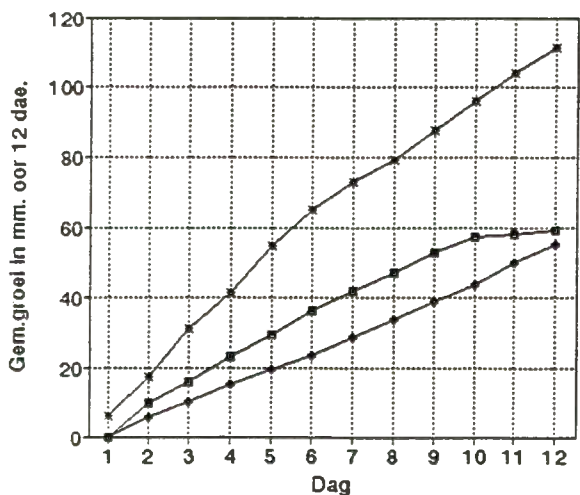
b. —■— M.phas. + Epic. —●— E.purpurascens —▲— M.phaseolina



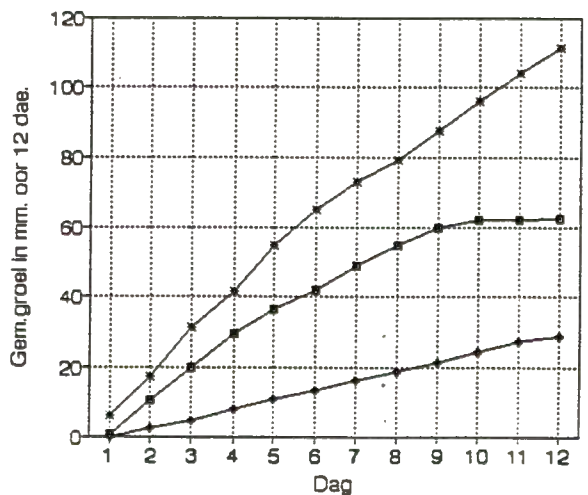
c. —■— M.phas. + Fus. —●— F.equiseti —▲— M.phaseolina



d. —■— M.phas. + Pae. —●— Pae.lilacinus —▲— M.phaseolina



e. —■— M.phas. + Ph.sp.4 —●— Phoma sp.4 —▲— M.phaseolina



f. —■— M.phas. + Pen. —●— Pen.chrysogenum —▲— M.phaseolina

Fig. 1: Gemiddelde groei van *Macrophomina phaseolina* teen= oor die onderskeie endofiete in mm. oor 12 dae op aartappel-dekstrose-agar. (a) *Cladosporium cladosporioides*, (b) *Epicoccum purpurascens*, (c) *Fusarium equiseti*, (d) *Paecilomyces lilacinus*, (e) *Penicillium chrysogenum*, (f) *Phoma sp.4*.

Tabel 4: Rangordes van die antagonistiese effek van die verskillende endofitiese fungusse ten opsigte van die gemiddelde groei (in mm.) na 12 dae teenoor *Macrophomina phaseolina* op aartappel-dekstrose-agar. (Homogene groepe aangetoon deur a, b en c).
** = P < 0.01

Fungusse	Gemiddelde groei na 12 dae (mm.)	Homogene groepe		
<i>Pae.lilacinus</i>	44.0 **	a		
<i>F.equiseti</i>	54.2 **	a	b	
<i>C.cladosporioides</i>	58.2 **	a	b	
<i>Phoma sp.4</i>	59.2 **	a	b	
<i>E.purpurascens</i>	60.0 **		b	
<i>Pen.chrysogenum</i>	62.2 **		b	
<i>M.phaseolina</i>	111.6			c

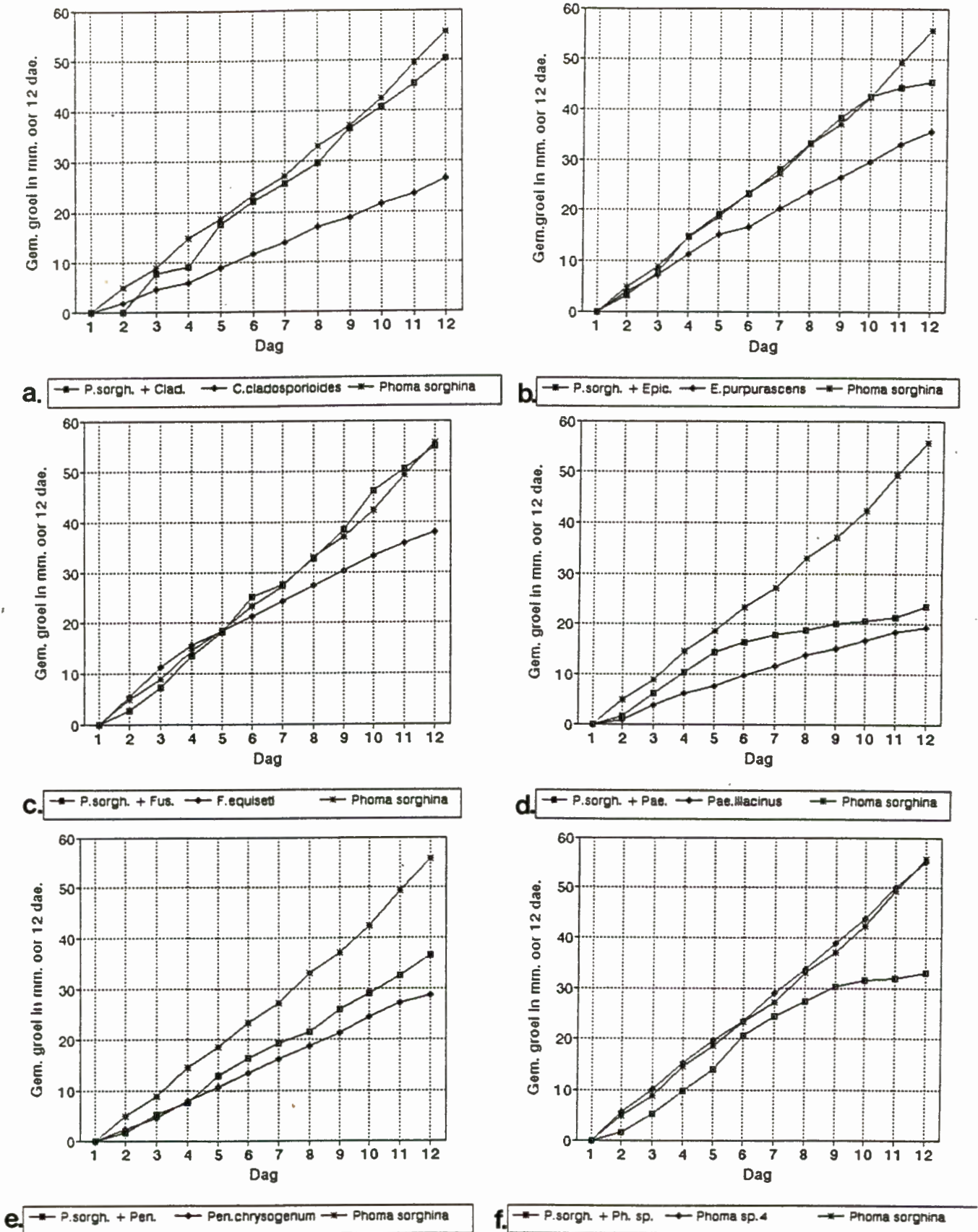


Fig.2: Gemiddelde groei van *Phoma sorghina* teenoor die onderskeie endofiete in mm. oor 12 dae op aartappeldekstrose-agar. (a) *Cladosporium cladosporioides*, (b) *Epicoccum purpurascens*, (c) *Fusarium equiseti*, (d) *Paecilomyces lilacinus*, (e) *Penicillium chrysogenum*, (f) *Phoma* sp.4.

Tabel 5: Rangorde van die antagonistiese effek van die verskillende endofitiese fungusse ten opsigte van die gemiddelde groei na 12 dae (in mm.) teenoor *Phoma sorghina* op aartappel-dekstrose-agar. (Homogene groepe aangetoon deur a en b) * = $P > 0.01$; < 0.05

Fungusse	Gemiddelde groei na 12 dae (mm.)		Homogene groepe	
<i>Pae.lilacinus</i>	23.6	*	a	
<i>Phoma sp.4</i>	30.4	*	a	b
<i>Pen.chrysogenum</i>	36.4	*	a	b
<i>E.purpurascens</i>	45.6	*	a	b
<i>C.cladosporioides</i>	50.4	*		b
<i>F.equiseti</i>	55.0	*		b
<i>Phoma sorghina</i>	55.8			b

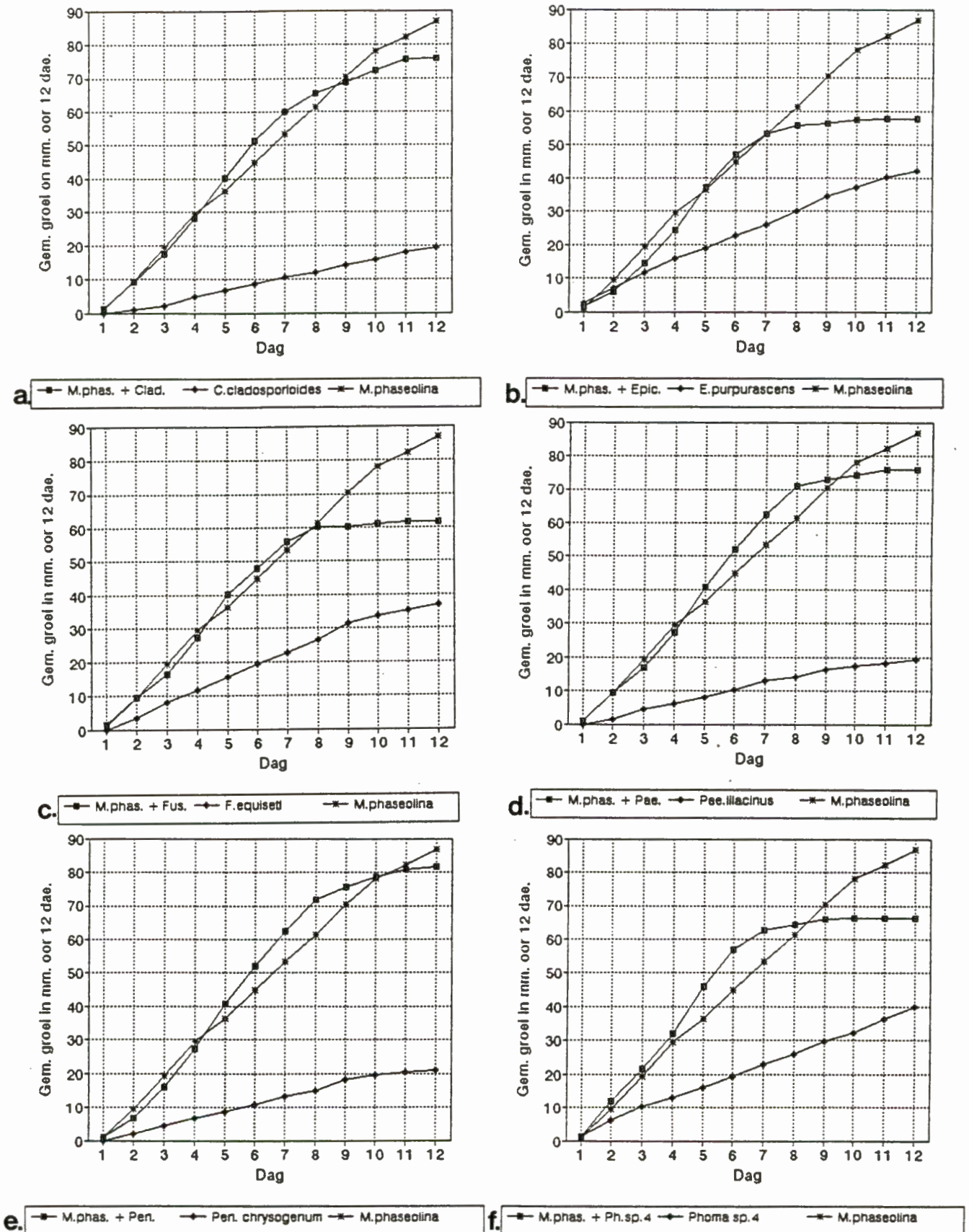


Fig.3: Gemiddelde groei van *Macrophomina phaseolina* teenoor die onderskeie endofiete in mm. oor 12 dae op sorghum-agar. (a) *Cladosporium cladosporioides*, (b) *Epicoccum purpurascens*, (c) *Fusarium equiseti*, (d) *Paecilomyces lilacinus*, (e) *Penicillium chrysogenum*, (f) *Phoma sp.4*.

Tabel 6: Rangordes van die antagonistiese effek van die verskillende endofitiese fungusse ten opsigte van die gemiddelde groei (in mm.) na 12 dae teenoor *Macrophomina phaseolina* op sorghum-agar. (Homogene groepe aangetoon deur a, b en c).
 ** = $P < 0.01$

Fungusse	Gemiddelde groei na 12 dae (mm.)		Homogene groepe		
<i>E.purpurascens</i>	58.0	**	a		
<i>F.equiseti</i>	61.8	**	a		
<i>Phoma sp.4</i>	66.4	**	a	b	
<i>C.cladosporioides</i>	76.0	**		b	c
<i>Pae.lilacinus</i>	76.0	**		b	c
<i>Pen.chrysogenum</i>	81.6	**			c
<i>M.phaseolina</i>	87.0				c

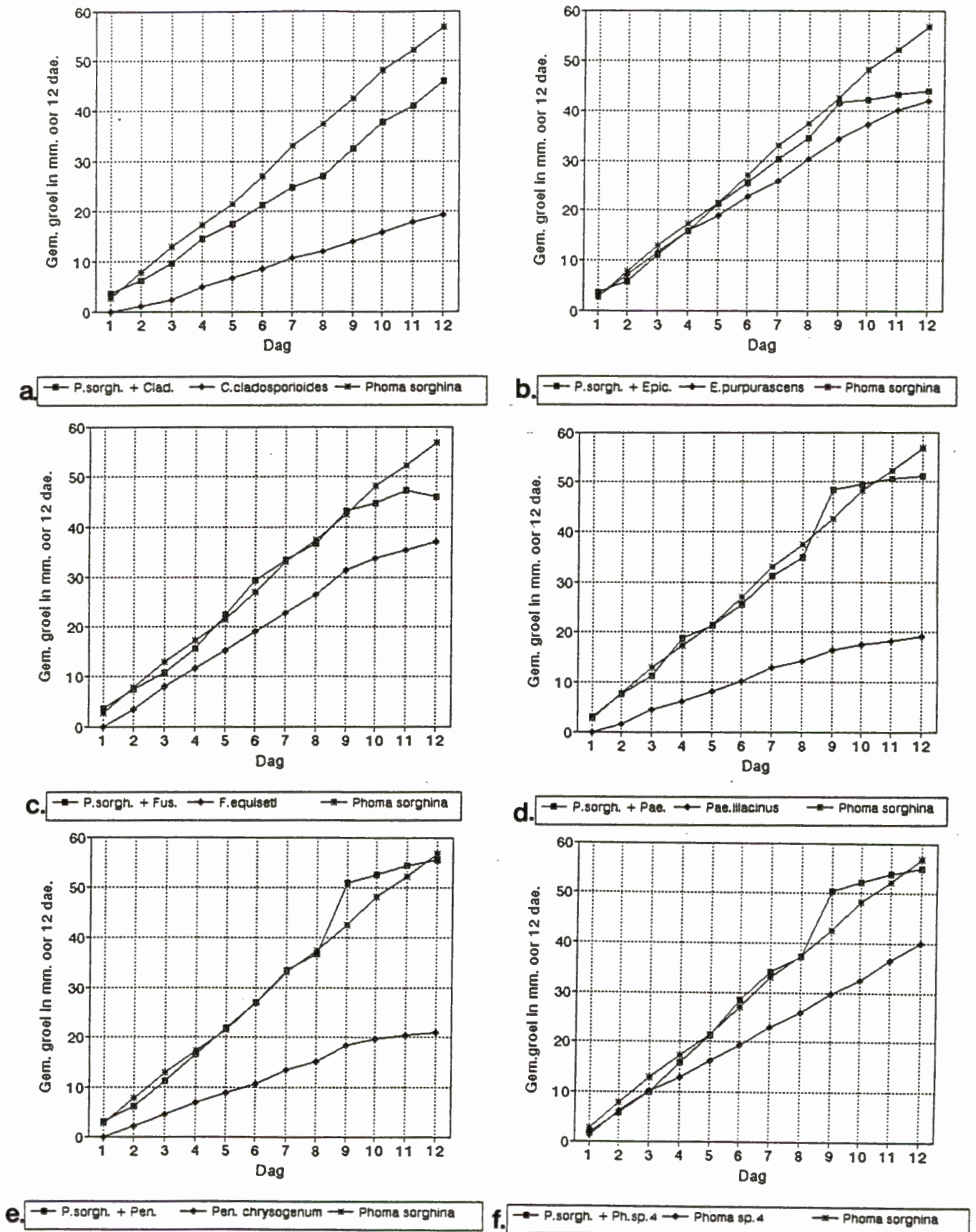


Fig.4: Gemiddelde groei van *Phoma sorghina* teenoor die onderskeie endofiete in mm. oor 12 dae op sorghum-agar. (a) *Cladosporium cladosporioides*, (b) *Epicoccum purpurascens*, (c) *Fusarium equiseti*, (d) *Paecilomyces lilacinus*, (e) *Penicillium chrysogenum*, (f) *Phoma* sp.4.

Tabel 7: Rangordes van die antagonistiese effek van die verskillende endofitiese fungusse ten opsigte van die gemiddelde groei na 12 dae (in mm.) teenoor *Phoma sorghina* op sorghum-agar. (Homogene groepe aangetoon deur a en b). * = $P > 0.01, < 0.05$

Fungusse	Gemiddelde groei na 12 dae (mm.)	Homogene groepe
<i>E.purpurascens</i>	44.0 *	a
<i>F.equiseti</i>	46.0 *	a b
<i>C.cladosporioides</i>	49.6 *	a b
<i>Pae.lilacinus</i>	51.2 *	a b
<i>Phoma sp.4</i>	55.0 *	a b
<i>Pen.chrysogenum</i>	55.6 *	a b
<i>Phoma sorghina</i>	56.8	b

E.purpurascens verskil betekenisvol van *Phoma sorghina* (Tabel 7).

In Figuur 5(a-f) word die groei van die patogeen, *M.phaseolina* teenoor die onderskeie endofiete op koringstrooi gegee. Al ses die endofiete, naamlik *C.cladosporioides*, *E.purpurascens*, *F.equiseti*, *Paecilomyces lilacinus*, *Penicillium chrysogenum* en *Phoma* sp.4 rem die groei van die patogeen in 'n hoë mate (meer as 20mm). In hierdie geval word *M.phaseolina* die meeste deur *Paecilomyces lilacinus* (Figuur 5d) gerem, omdat daar vanaf dag 2 'n afplatting in die groeikromme voorkom. Die remmingseffekte van *Paecilomyces lilacinus* (hoogste) en *E.purpurascens*, *Phoma* sp.4 en *Penicillium chrysogenum* is betekenisvol (Tabel 8).

Teenoor *Phoma sorghina* (Figuur 6a-f) is dit ook gevind dat al die endofiete naamlik *C.cladosporioides*, *E.purpurascens*, *F.equiseti*, *Paecilomyces lilacinus*, *Penicillium chrysogenum* en *Phoma* sp.4 die groei van die patogeen in 'n groot mate inhibeer (20mm en meer). In hierdie geval is dit *E.purpurascens* (Figuur 6b) wat die grootste mate van antagonisme teenoor *Phoma sorghina* toon, deurdat daar 'n afplatting in die groeikromme voorkom vanaf dag 2. Die betekenisvolheid van hierdie gegewens blyk duidelik uit Tabel 9. Groepe a, b en c het 'n betekenisvolle remming op groep d (die patogeen, *Phoma sorghina*).

Om 'n aanduiding te kry van die totale effek van die endofiete teenoor *M.phaseolina*, word die resultate saamgevat in figuur 7, waar die gemiddelde groei op die verskillende groeimediums verstrekkend word. Uit Tabel 10 is dit duidelik dat al die endofiete 'n betekenisvolle effek op die groei van *M.phaseolina* gehad het. *Paecilomyces lilacinus*, en *E.purpurascens* het egter die grootste remmende effek op die groei van *M.phaseolina* op al drie die groeimediums (ADA, SA en koringstrooi) gehad. In Tabel 11 word die groeimedius in

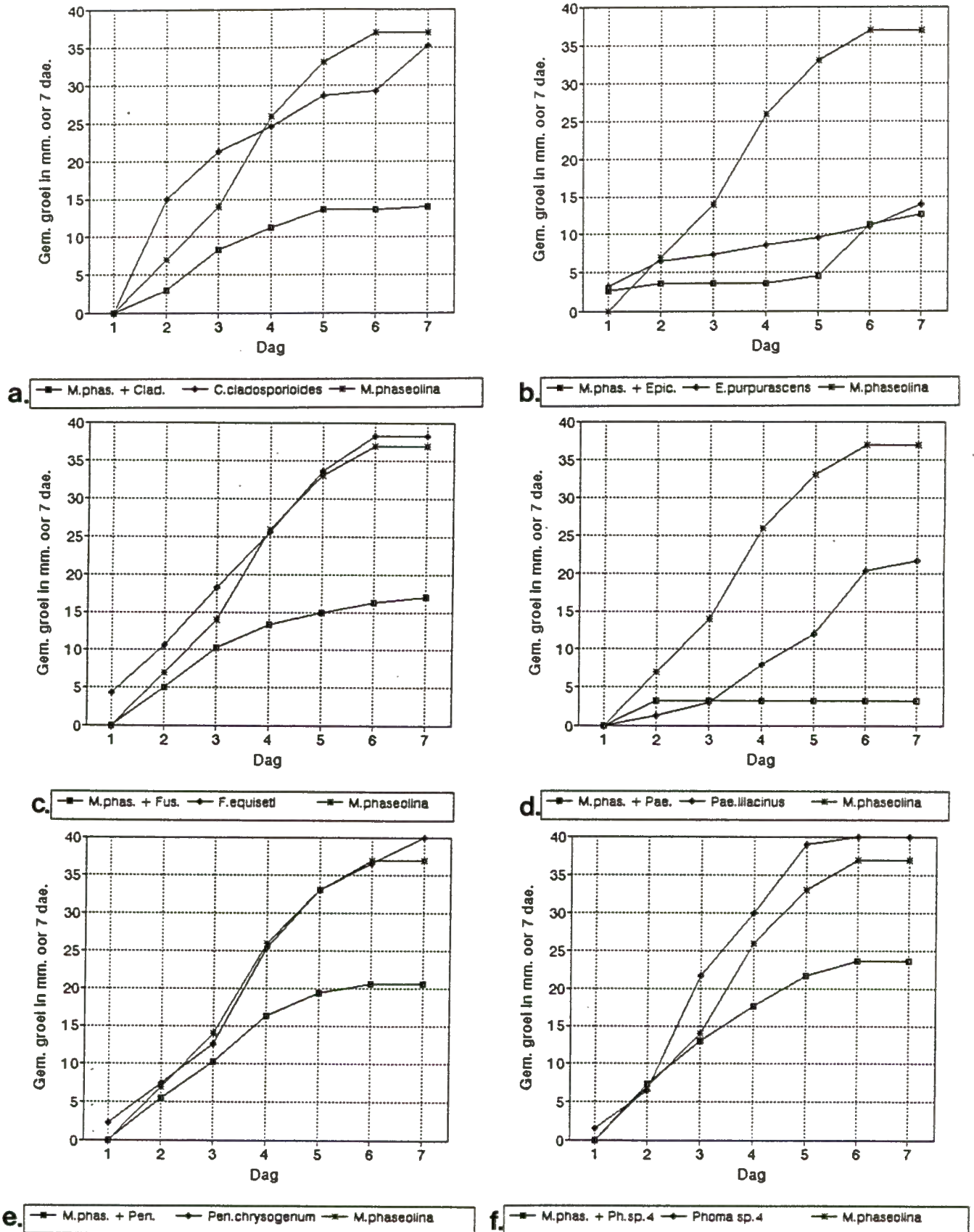


Fig.5: Gemiddelde groei van *Macrophomina phaseolina* teenoor die onderskeie endofiete in mm. oor 7 dae op koringstrooi. (a) *Cladosporium cladosporioides*, (b) *Epicoccum purpurascens*, (c) *Fusarium equiseti*, (d) *Paecilomyces lilacinus*, (e) *Penicillium chrysogenum*, (f) *Phoma sp.4*.

Tabel 8: Rangordes van die antagonistiese effek van die verskillende endofitiese fungusse ten opsigte van die gemiddelde groei na 12 dae (in mm.) teenoor *Macrophomina phaseolina* op koringstrooi. (Homogene groepe aangetoon deur a, b en c). ** = $P < 0.01$

Fungusse	Gemiddelde groei na 12 dae (mm.)		Homogene groepe		
<i>Pae.lilacinus</i>	8.0	**	a		
<i>E.purpurascens</i>	12.7	**	a	b	
<i>Phoma sp.4</i>	18.3	**	a	b	
<i>Pen.chrysogenum</i>	24.0	**	a	b	c
<i>C.cladosporioides</i>	26.7	**		b	c
<i>F.equiseti</i>	28.7	**		b	c
<i>M.phaseolina</i>	37.0				c

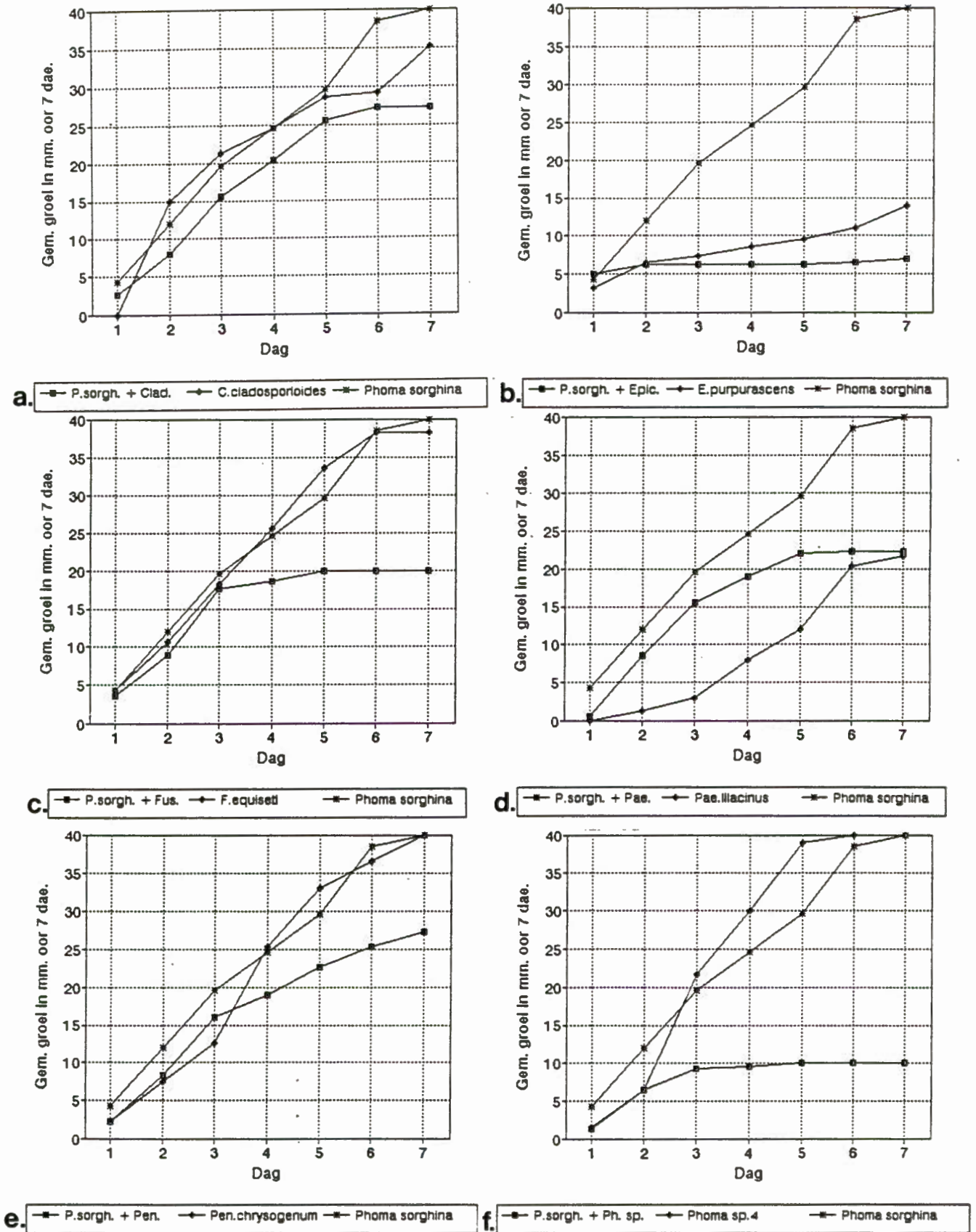


Fig.6: Gemiddelde groei van *Phoma sorghina* teenoor die onderskeie endofiete in mm. 7 dae op koringstrooi. (a) *Cladosporium cladosporioides*, (b) *Epicoccum purpurascens*, (c) *Fusarium equiseti*, (d) *Paecilomyces lilacinus*, (e) *Penicillium chrysogenum*, (f) *Phoma sp.4*.

Tabel 9: Rangordes van die antagonistiese effek van die verskillende endofitiese fungusse ten opsigte van die gemiddelde groei (in mm.) na 12 dae teenoor *Phoma sorghina* op koringstrooi. (Homogene groepe aangetoon deur a, b en c). ** = $P < 0.01$

Fungusse	Gemiddelde groei na 12 dae (mm.)		Homogene groepe			
<i>E.purpurascens</i>	7.0	**	a			
<i>Phoma</i> sp.4	10.0	**	a	b		
<i>F.equiseti</i>	20.0	**		b	c	
<i>Pae.lilacinus</i>	22.3	**			c	
<i>C.cladosporioides</i>	27.3	**			c	
<i>Pen.chrysogenum</i>	27.3	**			c	
<i>Phoma sorghina</i>	40.0					d

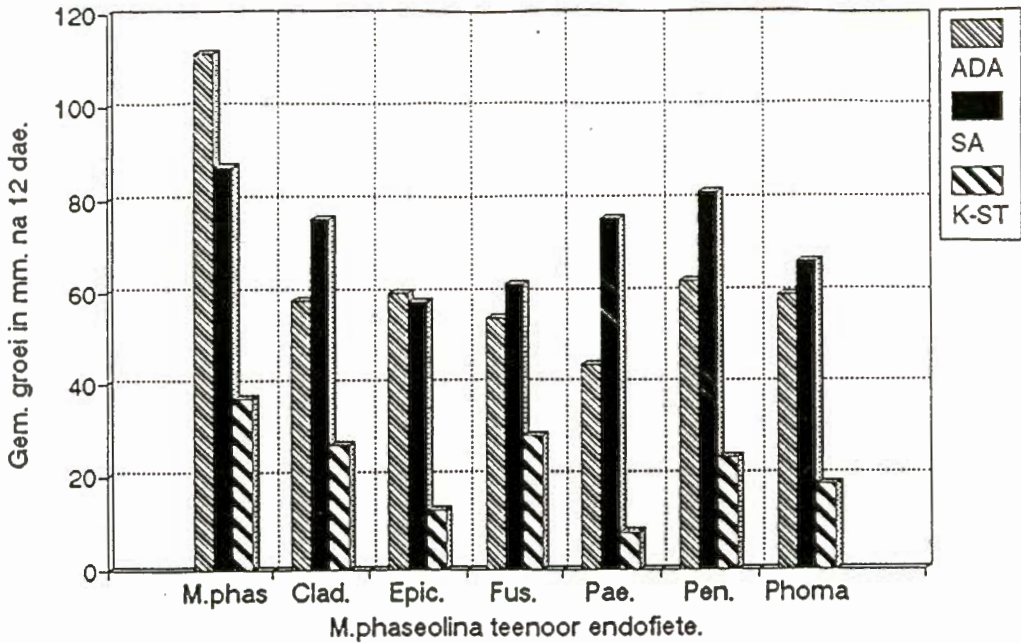


Fig.7: Gemiddelde groei van *Macrophomina phaseolina* alleen en teenoor *Cladosporium cladosporioides*, *Epicoccum purpurascens*, *Fusarium equiseti*, *Paecilomyces lilacinus*, *Penicillium chrysogenum* en *Phoma* sp.4, op aartappel-dekstrose-agar (ADA), sorghum-agar (SA) en koringstrooi (K-ST) by 24 °C.

Tabel 10: Samevattende rangorde van die antagonistiese effek van die verskillende endofitiese fungusse ten opsigte van die gemiddelde groei (mm) na 12 dae teenoor *M.phaseolina* op ADA, SA en koringstrooi. (Gemiddelde waardes van al die mediums saam). Homogene groepe aangetoon deur a, b en c.
** = $P < 0.01$

Fungusse	Gemiddelde groei (mm) na 12 dae.	Homogene groepe
<i>Pae.lilacinus</i>	48.00 **	a
<i>E.purpurascens</i>	48.31 **	a
<i>F.equiseti</i>	51.23 **	a b
<i>Phoma</i> sp.4	52.54 **	a b
<i>C.cladosporioides</i>	57.77 **	a b
<i>Pen.chrysogenum</i>	60.85 **	b
<i>M.phaseolina</i>	84.92	c

Tabel 11: Rangorde van die drie verskillende groeimediums naamlik ADA, SA en koringstrooi ten opsigte van antagonisme wat daarop voorkom. (Homogene groepe aangetoon deur a, b en c). $P > 0.05$

Groeimedium	Gemiddelde groei na 12 dae (mm.)	Homogene groepe		
Koringstrooi	22.19	a		
ADA	64.20		b	
SA	72.40			c

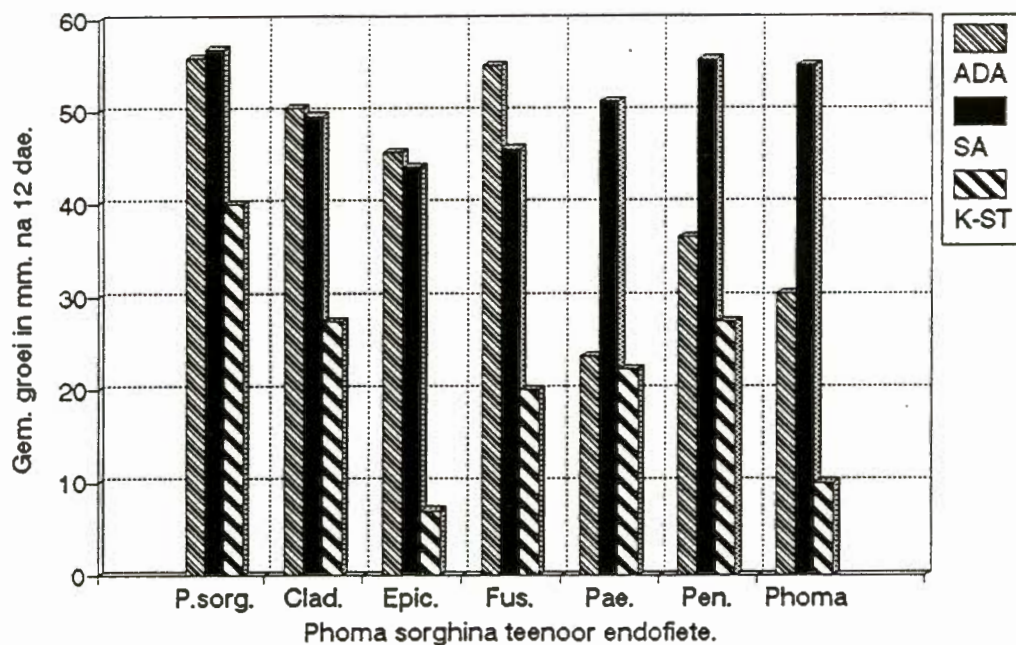


Fig.8: Gemiddelde groei van *Phoma sorghina* alleen en teenoor *Cladosporium cladosporioides*, *Epicoccum purpurascens*, *Fusarium equiseti*, *Paecilomyces lilacinus*, *Penicillium chrysogenum* en *Phoma* sp.4, op aartappeldekstrose-agar (ADA), sorghum-agar (SA) en koringstrooi (K-ST) by 24 °C.

Tabel 12: Samevattende rangorde van die antagonistiese effek van die verskillende endofitiese fungusse ten opsigte van die gemiddelde groei (mm) na 12 dae teenoor *P.sorghina* op ADA, SA en koringstrooi. (Gemiddelde waardes van al die mediums saam). (a, b en c stel die homogene groepe voor).
** = $P < 0.01$

Fungusse	Gemiddelde daag= likse groei (mm)	Homogene groepe	
<i>Pae.lilacinus</i>	33.92 **	a	
<i>Phoma sp.4</i>	35.15 **	a	
<i>E.purpurascens</i>	36.10 **	a	
<i>Pen.chrysogenum</i>	41.69 **	a	b
<i>C.cladosporioides</i>	43.38 **	a	b
<i>F.equiseti</i>	43.46 **	a	b
<i>Phoma sorghina</i>	52.54		b

Tabel 13: Rangorde van die drie verskillende groeime-
dioms naamlik ADA, SA en koringstrooi ten opsigte
van die antagonisme wat daarop voorkom. (Homoge=
ne groepe aangetoon deur a, b en c) $P > 0.05$

Groeimedium	Gemiddelde daag= likse groei (mm)	Homogene groepe	
Koringstrooi	22.00	a	
ADA	42.46		b
SA	50.66		c

homogene groepe (aangedui deur a, b en c) verdeel. Dit is duidelik dat dit noodsaaklik is om antagonismetoetse op verskillende groeimediums te doen omdat die mate van antagonisme op elkeen verskil (Tabel 11).

In figuur 8 word die groei van die *Phoma sorghina* teenoor die endofiete, *C.cladosporioides*, *E.purpurascens*, *F.equiseti*, *Paecilomyces lilacinus*, *Penicillium chrysogenum*, en *Phoma* sp.4 respektiewelik op al drie die groeimediums (ADA, SA en koringstrooi) as samevatting gegee. Hieruit kan afgelei word dat *Paecilomyces lilacinus*, *Phoma* sp.4 en *E.purpurascens* die grootste antagonistiese effek op die groei van *Phoma sorghina* gehad het (Tabel 12). Ook uit hierdie antagonismetoets is dit duidelik dat dit noodsaaklik is om verskillende groeimediums te gebruik (Tabel 13).

Die verskil in antagonisme wat op die drie groeimediums voorkom, kan moontlik toegeskryf word aan die samestelling van die voedingmediums. So byvoorbeeld bevat ADA, aartappelpekstrak en dekstrose, terwyl SA slegs sorghummeel en sout bevat. Die luggedroogde koringstrooi waarop die fungusse gekweek is, het ook nie 'n hoë voedingswaarde nie. ADA is waarskynlik die rykste voedingsmedium deurdat dit ook stysel en dekstrose bevat wat aan die fungusse beskikbaar gestel word. Moontlik speel hierdie organiese voedingstowwe 'n belangrike rol om antagonisme *in vitro* te beïnvloed.

Bogenoemde voedingstowwe mag moontlik noodsaaklik wees vir die groei van sommige fungusse. Indien dit by albei antagoniste die geval is, kan 'n tweede moontlike rede vir die verskil in antagonisme tussen die patogeen en endofiet, kompetisie wees vir hierdie beskikbare voedingstowwe. 'n Derde moontlike rede is dat daar stowwe deur die fungusse gevorm word, wat 'n antibiotiese effek het en groeiëremming kan veroorsaak.

4.3 Kwantitatiewe bepaling van die persentasie kolonisasie van sorghumsade deur die patogene en endofiete alleen en in kombinasie.

Om die persentasie kolonisasie van sorghumsade deur die onderskeie endofiete en patogene te bepaal, is daar van die metode van Martyn & Stack (1988) gebruikgemaak. Die metode is gewysig deur gesteriliseerde vermikuliet, in plaas van grond, in gesteriliseerde Petri-bakkies te plaas en die totale hoeveelheid vermikuliet is met gesteriliseerde gedistilleerde water aangeklam. In elk van hierdie bakkies is die vermikuliet met *M.phaseolina*, *Phoma sorghina*, *C.cladosporioides*, *E.purpurascens*, *F.equiseti*, *Paecilomyces lilacinus*, *Penicillium chrysogenum* en *Phoma* sp.4 geïnfesteer (kontroles). Hierna is tien oppervlak gesteriliseerde sade (volgens die metode van Riesen, 1985) in elke Petri-bakkie geplaas, en vir drie dae by 24°C geïnkubeer. Na die inkubasieperiode is die sade na gesteriliseerde ADA oorgeplaas vir die bepaling van die persentasie kolonisasie deur die fungusse.

Vir die toets met *M.phaseolina* is gesteriliseerde Petri-bakkies met gesteriliseerde vermikuliet gevul. Die vermikuliet in elk van die bakkies, is met *M.phaseolina* en respektiewelik ook met *C.cladosporioides*, *E.purpurascens*, *F.equiseti*, *Paecilomyces lilacinus*, *Penicillium chrysogenum* en *Phoma* sp.4 in verskillende Petri-bakkies geïnfesteer. Tien oppervlak gesteriliseerde sade (volgens die metode van Riesen, 1985), is ook hier in elke bakkie geplaas en vir drie dae by 24°C geïnkubeer. Na die inkubasieperiode is die fungusse na ADA oorgeplaas vir die bepaling van die persentasie kolonisasie deur die fungusse. Daar is drie herhalings van elke kombinasie gebruik.

Vir die toets met *Phoma sorghina* was die prosedure soortgelyk as die bogenoemde.

4.3.1 Resultate en Bespreking.

Tabel 14: Persentasie kolonisasie van sorghumsade soos bepaal deur her-isolasie van die patoogen, *M. phaseolina* en endofiete alleen en in kombinasie.

Fungusse	Persentasie kolonisasie (%)		
	Gesamentlik in die vermikuliet		
	Alleen	Endofiet	Patogeen
<i>M. phaseolina</i>	100		
<i>Cladosporium</i>	100	100	80
<i>Epicoccum</i>	100	100	20
<i>Fusarium</i>	100	70	30
<i>Paecilomyces</i>	100	100	20
<i>Penicillium</i>	100	70	60
<i>Phoma</i> sp.4	100	100	70

Tabel 15: Persentasie kolonisasie van sorghumsade soos bepaal deur herisolasië van *Phoma sorghina* en endofiete alleen en in kombinasie.

Fungusse	Persentasie kolonisasie (%)		
	Gesamentlik in die vermikuliet		
	Alleen	Endofiet	Patogeen
<i>P. sorghina</i>	100		
<i>Cladosporium</i>	100	30	90
<i>Epicoccum</i>	100	80	60
<i>Fusarium</i>	100	90	20
<i>Paecilomyces</i>	100	100	0
<i>Penicillium</i>	100	100	20
<i>Phoma</i> sp.4	100	50	60

In Tabel 14 word die persentasie kolonisasie van sorghumsade deur *Macrophomina phaseolina* en die endofiete gegee. Dit is bevind dat die saad in die kontroles, dit wil sê waar die vermikuliet afsonderlik met die fungusse geïnfesteer is, 100% gekoloniseer was. Waar die vermikuliet met die

patogeen en endofiet geïnfesteer is, en daar dus sprake van kompetisie kan wees, blyk dit dat die endofiete goed kan kompeteer met die patogeen. By saad wat in vermikuliet met die fungus kombinasies geplaas is, toon *C.cladosporioides*, *F.equiseti*, *Paecilomyces lilacinus*, *Penicillium chrysogenum* en *Phoma* sp.4, 'n hoër persentasie kolonisasie as die patogeen. In die geval van *E.purpurascens*, *F.equiseti* en *Paecilomyces lilacinus* toon laasgenoemde fungusse die hoogste persentasie kolonisasie as *M.phaseolina*, wat daarop dui dat die fungus 'n remmende inwerking op *M.phaseolina* onder hierdie omstandighede gehad het.

In Tabel 15 word die resultate van die persentasie kolonisasie van die sorghumsade deur *Phoma sorghina* en die endofiete gegee. Weereens is 100% kolonisasie by die kontroles verkry. Waar die vermikuliet met die patogeen en endofiete geïnfesteer is, toon die volgende fungusse die grootste persentasie kolonisasie: *E.purpurascens*, *F.equiseti*, *Paecilomyces lilacinus* en *Penicillium chrysogenum*. In die geval van *C.cladosporioides* en *Phoma* sp.4 toon *Phoma sorghina* egter 'n hoër persentasie kolonisasie as die twee endofiete.

Die afleiding kan gemaak word dat meeste van die endofiete instaat is tot kompetisie. Hiervan is die hoë persentasie kolonisasie deur die endofiete 'n aanduiding.

5. HERINFEKSIE VAN PLANTE MET ENDOFIETE

5.1 Doel

Voordat antagonisme tussen die endofiete en patogene *in vivo* vasgestel kan word, moet daar eers geslaag word om plante kunsmatig met die endofiete te infekteer. Voordat die sorghumplante met die patogene geïnfekteer word moet die endofiete reeds in die plante gevestig wees.

5.2 Metode

5.2.1 Kweking van steriele sorghumplante.

Om die vestiging van endofitiese fungusse in sorghumplante te bestudeer, is dit nodig om enige saadgedraagde fungusse te elimineer. Dit is gedoen deur die sorghumsade vooraf oppervlakkig te steriliseer volgens die metode van Riesen (1985), en die sade is ook vir een min in warmwater by 55°C behandel (Van der Byl, 1928) om die moontlike teenwoordigheid van inwendige fungusse uit te skakel. Deur isolasies uit die gesteriliseerde saad te maak, is bepaal dat die plante steriel was.

5.2.2 Kunsmatige infeksie van sorghumplante met endofiete.

Twee metodes om plante kunsmatig te infekteer, is op die proef gestel.

Metode 1: Oppervlakgesteriliseerde sade is in Petri-bakkies (60mm deursnee) geplaas en met 'n spoorsuspensie van die endofiet bedek, en vir 24 h by 24°C geïnkubeer. Na die inkubasieperiode is die geïnkuleerde saad in stoomgesteriliseerde kompos geplant. Deur hierdie prosedure te volg is daar gepoog om plante so fungusvry as moontlik te kweek.

Metode 2: Sorghumsade is vooraf gesteriliseer en in stoomgesteriliseerde kompos geplant. Elke pot is met 'n klokglas bedek. Een week en twee weke oue plante is met 'n spoor=

suspensie van die betrokke endofiet met 'n handsproei apparaat gespuit (Tabel 16). Konidium getalle in die suspensie, is met behulp van 'n hemasitometer bepaal. Nadat die plante nog 'n week gelaat is, is 'n ondersoek gedoen om te bepaal of infeksie plaasgevind het. Dit is gedoen deur isolasies uit verskillende oppervlakgesteëliseerde plantdele (volgens die metode van Riesen, 1985) naamlik die blaarpunt, sentrale gedeelte van die blaarlamina, blaarskede, stam en wortel te maak.

In albei gevalle is die potte in gerandomiseerde blokontwerp met drie herhalings in die glashuis geplaas.

5.3 Resultate en Bespreking.

Tabel 16: Konidiumsuspensie van endofiete uitgedruk in aantal spore per ml.

Endofiet	Konidiumsuspensie (spore/ml)
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	1.96×10^3
<i>Epicoccum purpurascens</i>	1×10
<i>Fusarium equiseti</i>	1×10
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	8×10^2
<i>Penicillium chrysogenum</i>	1.93×10^3
<i>Phoma</i> sp.4	Onbepaalbaar

Uit die resultate van metode 1, is dit duidelik dat hierdie metode minder doeltreffend is (Fig.9). Waar die saad met *C.cladosporioides*, *E.purpurascens* en *Phoma* sp.4 geïnokuleer is, is 'n baie lae persentasie van hierdie endofiete weer geïsoleer. Slegs waar die saad met *F.equiseti*, *Paecilomyces lilacinus*, en *Penicillium chrysogenum* geïnokuleer was, is hierdie fungusse weer geïsoleer en wel in 'n lae persentasie naamlik 14.29%, 42.8% en 21.43% respektiewelik.

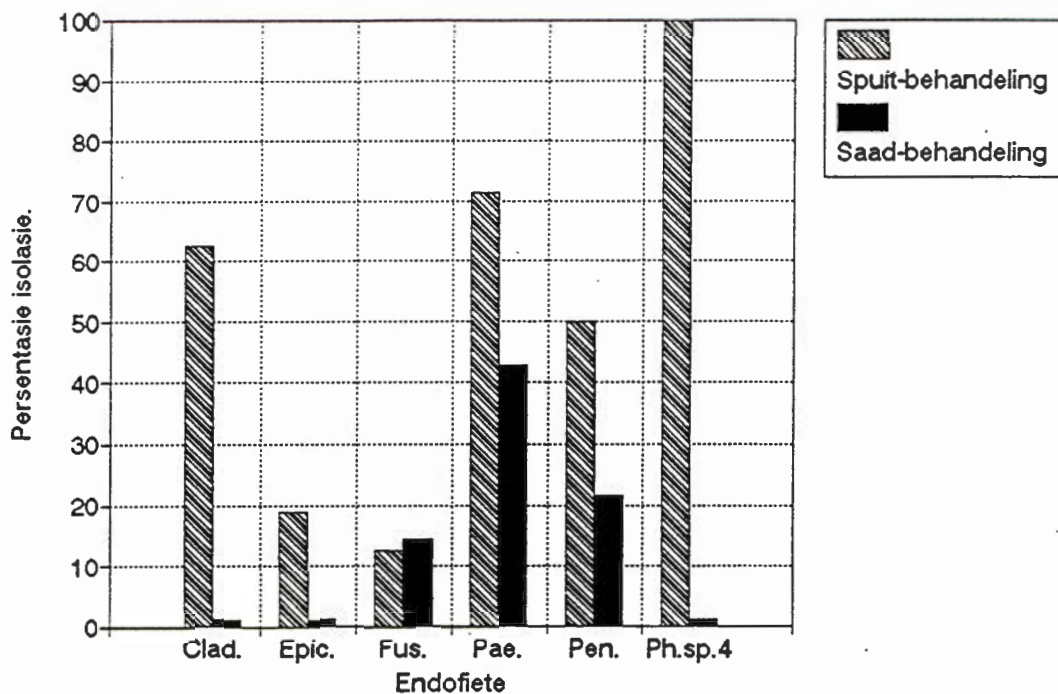


Fig.9: Isolasië uit 4 weke oue sorghumplante. Die behandelingsluit in, spuit-behandeling van die plante met 'n spoorsuspensie van, en saad-behandeling met 'n spoorsuspensie van die endofiete, *Cladosporium cladosporioides*, *Epicoccum purpurascens*, *Fusarium equiseti*, *Paecilomyces lilacinus*, *Penicillium chrysogenum* en *Phoma* sp.4.

Daar is gevind dat die metode waar die plante met 'n spoorsuspensie van die endofiet gespuit is, meer geslaagd was (Figuur 9). Met hierdie metode is al die endofitiese fungusse in 'n mindere of meerdere mate weer her-geïsoleer. Die lae her-isolاسies van *E.purpurascens* en *F.equiseti*, kan moontlik toegeskryf word aan ander voorvereistes naamlik oppervlaktemperatuur, humiditeit asook oppervlakvoeding wat deur hierdie fungusse benodig word vir suksesvolle infeksie (Dickonson, 1976).

Dit is dus moontlik dat die blaaroppervlak meer nutriënte beskikbaar stel vir die funguspopulasies, wat eers as epifitiese mikro-organismes op die oppervlakke van die bo-grondse plantdele leef, voordat binnedringing plaasvind (Fokkema, 1976).

5.4 Bepaling van die aanwesigheid van endofitiese fungusse in die plantmateriaal.

5.4.1 Metode

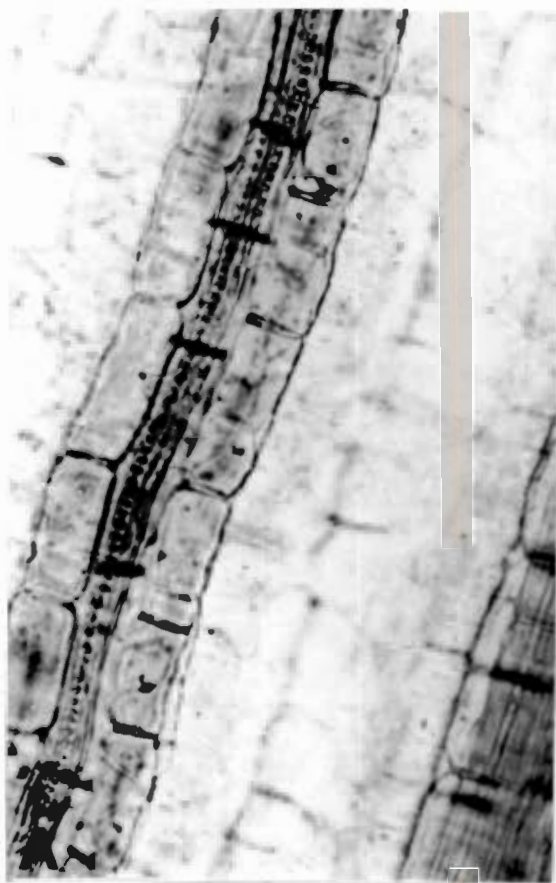
Om die endofiete in die blaarweefsel op te spoor, is die chloraalhidraat-verhelderings metode (Dhingra & Sinclair 1986) gebruik. Van die blare van die plante is versamel, en een gedeelte van 'n blaar is vir verheldering gebruik terwyl die ander deel na oppervlaksterilisasie (soos voorheen bespreek), uitgeplaat is om die identiteit van die fungus te bepaal. Die blare is in 'n versadigde chloraalhidraat-oplossing (250g/100ml) vir 4 tot 5 dae geplaas. Hierna is die materiaal in 0.1% katoenblou met laktofenol geplaas en vir 2 tot 3 min verhit (nie kookpunt nie), met gesteriliseerde gedistilleerde water gewas, in 1% suur-fuchsin geplaas, daarna afgespoel met 50% etanol en in chloraalhidraat-oplossing gemonteer.

5.4.2 Resultate en Bespreking

In Plaat 3 word ligmikrograwe van die geïnfecteerde en ongeïnfecteerde blare gegee. Alhoewel die fungusse in elke geval uit die blare geïsoleer is en ook in die verhelderde blare gevind is, word slegs enkele voorbeelde in Plaat 3 gegee.

Die fungus dring die plant moontlik binne deur die epidermis en/of huidmondjies, en groei willekeurig deur die plantweefsel. In geen van die gevalle waar die fungusse na verheldering in die blare gevind is nie, was daar letsels op die blare nie. Dit bevestig die endofitiese aard van hierdie fungusse.

Plaat 3: Endofitiese fungusse in die plantweefsel. (A) Ongeïnfekteerde plant, (B) *Cladosporium cladosporioides*, (C) *Penicillium chrysogenum* en (D) *Paecilomyces*. H = hifes



6. CHLOROFILFUOESSENSIE-BEPALINGS

In lewende chlorofilhoudende plantselle, vorm chlorofil 'n kompleks met proteïne om deel uit te maak van 'n energie-versameling- en verspreidingsstelsel in die chloroplaste. Omdat chlorofil 'n rooi fluoressensie uitstraal as dit deur sigbare lig geëksiteer word, varieer die intensiteit van fluoressensie-uitstraling as veranderinge in die fotosisteam voorkom (Smillie & Hetherington, 1983).

'n Deel van die lig wat op 'n plant val, word deur fotosintetiese pigmente geabsorbeer, en elektroniese eksitasie-energie word geskep. Die grootste gedeelte van hierdie energie (85% onder optimale toestande) word in fotosintese gebruik. Die oorblywende energie word as hitte verloor, of uitgestraal as fluoressensie (Papageorgiou, 1975). Chlorofilfluoressensie het dus waarde om die rol van enige uit- en inwendige buite-invloede op die fotosinteseproses te kwantifiseer.

Smillie en Hetherington (1983) het aangedui dat chlorofilfluoressensie gebruik kan word om sellulêre prosesse wat verskil van fotosintese, te ondersoek en sodoende die reaksie van die plant te bepaal wanneer dit aan byvoorbeeld omgewingstremming blootgestel word. Die rede waarom chlorofil as 'n intrinsieke membraanpeiling gebruik kan word om stresgeïnduseerde sellulêre beserings waar te neem, is as volg: Die oorsprong van chlorofilfluoressensie *in vivo* is vanaf fotosisteam II wat verbind is met die suurstof-evoluerende reaksie van fotosintese, om 'n kompleks te vorm. Hierdie kompleks is baie onderhewig aan sellulêre versteurings. Met die aanvang van sellulêre versteurings, is daar 'n groot waarskynlikheid dat dit gepaard sal gaan met veranderinge in chlorofilfluoressensie-uitstraling.

Wanneer 'n plant wat in die donker was, aan lig blootgestel word, neem fotosintese nie onmiddelik teen maksimum tempo in aanvang nie. Voordat 'n stabiele toestand bereik word gaan die fotosintese-apparaat deur verskeie oorgangsfases. Gedurende die fase van ligabsorpsie en energie transduksie, word 'n klein gedeelte van lig weer uitgestraal vanaf die chlorofil, wat geassosieer is met die reaksiesentrums in die chloroplas. Hierdie lig word weer uitgestraal in die vorm van chlorofilfluoressensie. In 'n daaropvolgende oorgangsperiode na die donker-fase, vind vinnige veranderinge in die intensiteit van chlorofilfluoressensie plaas (Papageorgiou, 1975). Deur meting van laasgenoemde kan heelwat inligting oor verskeie aspekte van die proses ingewin word.

In Fig. 10 word die tipiese faseveranderinge in fluoressensie-uitstralings grafies voorgestel. Gedurende die eerste paar sekondes na illuminasie (van plantdele wat in die donker gehou was), is daar 'n vinnige verhogingsfase vanaf 'n inisiëlevlak (O) na die maksimum fluoressensievlak, P (ook na verwys as F_m). Nadat die maksimum vlak bereik is, daal fluoressensie (r_2 -helling) na 'n stabiele stadium (S) (Shaw, et.al. 1985). Indien induksie gevestig is, dit wil sê as die blaar lank genoeg in die donker was om opvallende uitputting van metaboliete en donker de-aktivering van ensieme te toon, neig fluoressensie kinetika om meer kompleks te word en 'n M-piek te gee. Na die M-piek bereik is, is daar 'n stadige afname na 'n terminale stabiele vlak (T). Hierdie komplekse kinetika is verwant aan die veranderinge in die fotosintetiese funksie en die strukturele integriteit van die tilakoïed-membraansisteem van die chloroplas (Papageorgiou, 1975).

Wanneer donker-aangepaste fotosinterende selle belig word, is die eerste vinnige styging in fluoressensie na piek I wat onafhanklik is van die fisikochemiese prosesse in die tilakoïedmembraan. Daar is 'n daling na D waarna 'n verdere

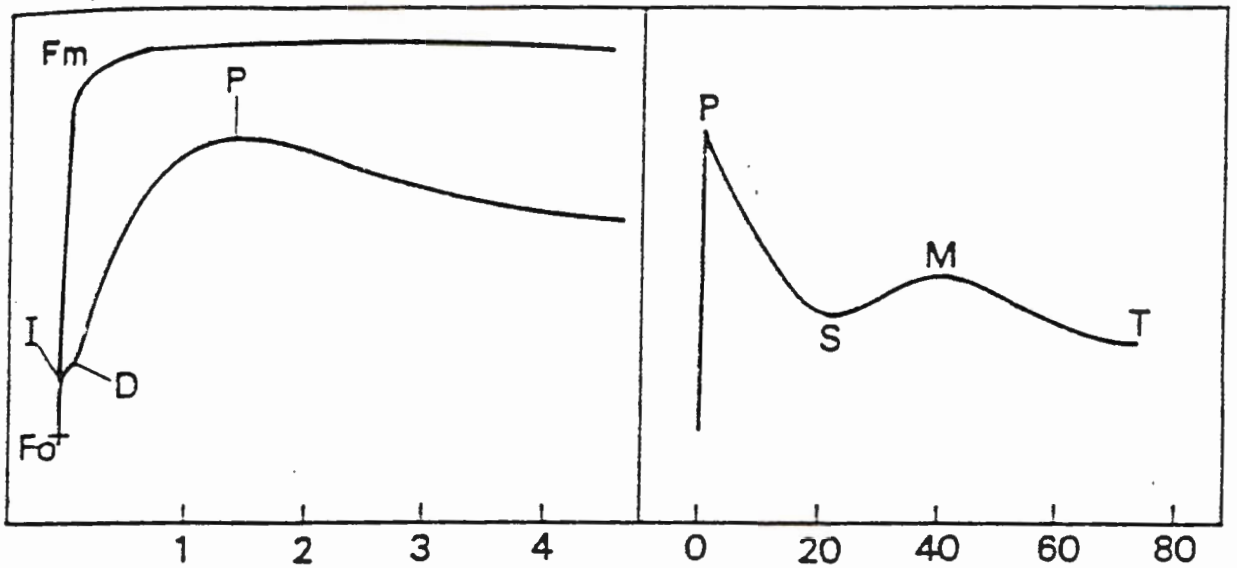


Fig. 10: Tipiese krommes van fluoressensie-metings om die skematiese voorstelling van die vinnige (links) en stadige (regs) fluoressensie kinetika, gedurende 'n donker- na lig-fase aan te toon, en toon ook die OI, DP, S, M, T terminologie.

styging P plaasvind. Sonder om in te gaan op die reaksiekinetika van die proses word dit gestel dat die verhouding $OI/OP=IP$ 'n aanduiding is van die fotosintese effektiwiteit (Papagiorgiou, 1975). Enige iets wat 'n remmende effek op die fotosintese effektiwiteit mag hê word hierdeur gereflekteer.

Indien fotosintese chemies geïnhibeer word deur byvoegings van verbindings wat die intersisteam elektronvloei tussen fotosisteam II en I inhibeer, word kromme Fm gekry wat beteken dat chlorofilfluoressensie vinnig styg na 'n hoë vlak. Dit is in teenstelling met die daling na vlak S wat by ongeïnhibeerde elektronvloei plaasvind. Die vinnige fluoressensie styging, OP, val saam met die verhoging in die elektronvloei deur fotosisteam II as gevolg van 'n geleidelike afname van intersisteam intermedieëre verbindings. Die verval, PS (fluoressensie-blussing), en die geleidelike fluoressensie verandering SMT, reflekteer die proses waarin die ultrastruktuur van die tilakoïedmembraan fundamenteel van belang is (Papageorgiou, 1975).

Volgens Ahmad (1983) word die tempo van fotosintese in garsblare verminder wanneer dit met bruinroes, *Puccinia hordei*, geïnfekteer is. Hierdie vermindering is nie as gevolg van die vermindering van koolstofdiksied fiksering per chloroplast nie, maar word toegeskryf aan 'n afname in die aantal funksionele chloroplaste. Ander oorsake vir hierdie vermindering kan ook verhoogde fungusrespirasie, verhoogde gasheerrespirasie en inhibering van die ligreaksies van fotosintese wees.

6.1 Doel

Chlorofilfluoressensie-toetse is uitgevoer om die effek wat die endofiete op die plant en op die patogeen kan hê, vas te stel. Hierdie metode is gebruik omdat enige veranderinge in die plant se metabolisme op 'n vroeë stadium vasgestel kan word.

6.2 Metodes

6.2.1 Infeksiemetode.

Nadat die plant met die endofiet geïnokuleer is, soos in die vorige hoofstuk verwys is, is die plante onderskeidelik met die patogeen, *Macrophomina phaseolina* en *Phoma sorghina* geïnfekteer. Voordat die plante met *M.phaseolina* geïnokuleer is, is die plante aan waterspanning onderwerp. Hierdie plante het elke tweede dag 250ml water gekry in vergelyking met die aanvanklike hoeveelheid van 500ml. Die inokulasie het geskied deur 'n vertikale sny van 10mm in die stam te maak, 'n klein hoeveelheid miselium van die patogeen daarin te plaas en die wond met petroleumjellie te bedek (Ilyas & Sinclair, 1974). Elke pot het ook Kalksteenammoniumnitraat (KAN), 2.5g l⁻¹ ontvang.

6.2.2 Fluoressensie-bepalings.

Om die effek van die endofiete alleen en in kombinasie met die patogeen in die plant te bepaal, is chlorofilfluoressensie-bepalings op die plante gedoen. Ongeïnfecteerde plante is ook getoets, en met geïnfecteerde plante vergelyk.

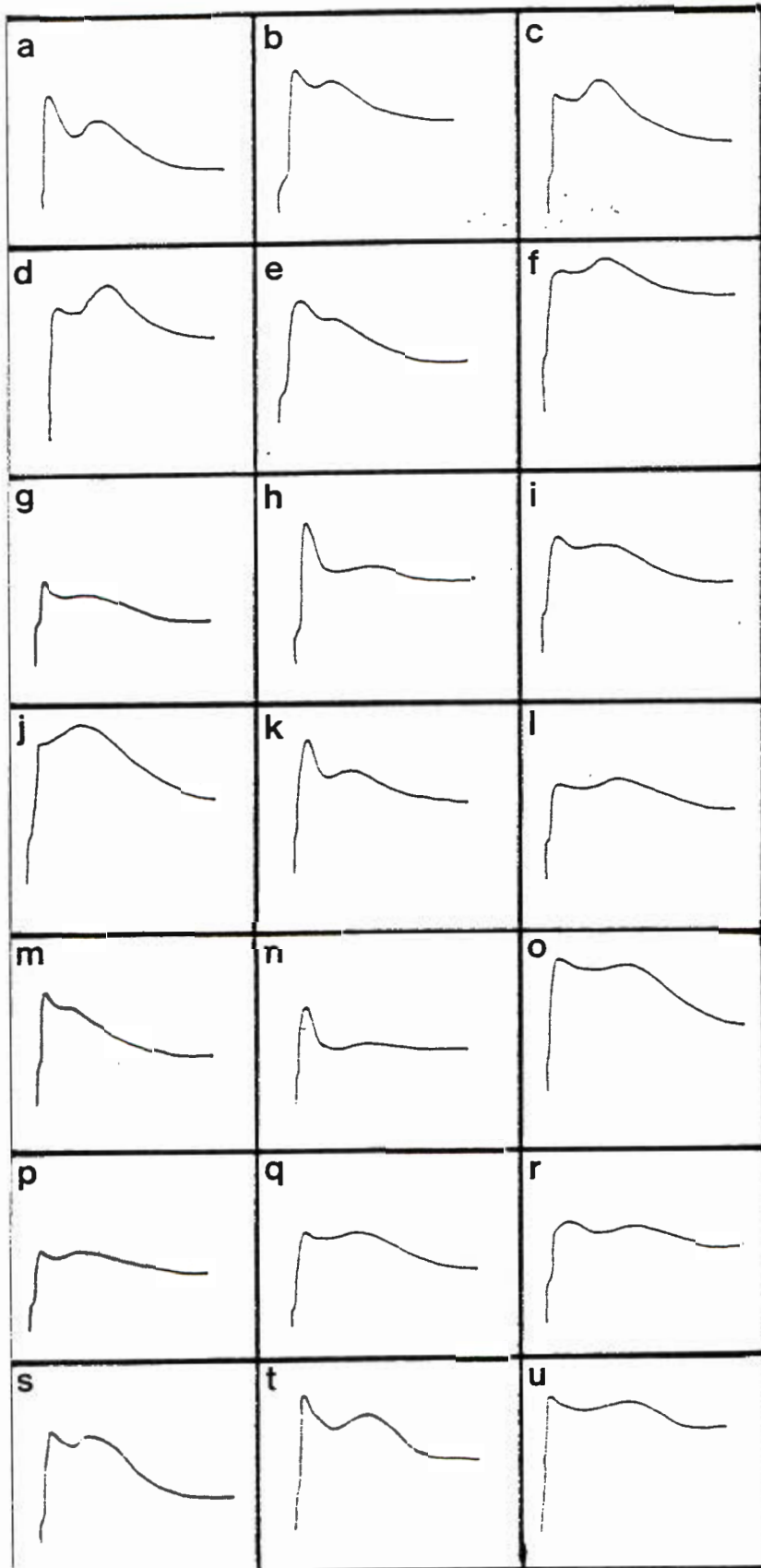
Fluoressensie-bepalings is met behulp van die fluorometer (Richard Branker Model SF-10) uitgevoer. Die mate van fluoressensie is na 4 weke op verskillende endofiet-, patogeen-, endofiet/patogeen-geïnfecteerde sorghumplante sowel as ongeïnfecteerde plante bepaal. Drie fluoressensielesings is van elke herhaling geneem, en die gemiddelde I:P-verhouding, r₂-S-, en M-waardes is in die bepaling in ag geneem (Mennega, 1990). Fluoressensie metings is op een blaar op drie ver-

skillende plekke gemeet, naamlik die blaarbasis, middelste gedeelte van die blaar en die blaarpunt.

Voordat fluoressensie bepaal is, is die plant vir 30 min in die donker geplaas, waarna 'n blaar blootgestel is aan lig vanaf 'n sonde, en die relatiewe fluoressensie oor tyd (2 min) is deur 'n registreertoestel uitgedruk.

Fig. 11: Chlorofilfluoressensiekrommes wat 'n aanduiding gee van die fisiologiese toestand van die plant. Die volgende krommes is verkry: (a) ongeïnfekteerde plant, (b) *Macrophomina phaseolina*, (c) *Phoma sorghina*, (d) *Phoma* sp.4 en *Phoma sorghina*, (e) *Phoma* sp.4 en *M.phaseolina*, (f) *Phoma* sp.4, (g) *Penicillium chrysogenum* en *Phoma sorghina*, (h) *Penicillium chrysogenum* en *M.phaseolina*, (i) *Penicillium chrysogenum*, (j) *Paecilomyces lilacinus* en *Phoma sorghina*, (k) *Paecilomyces lilacinus* en *M.phaseolina*, (l) *Paecilomyces lilacinus*, (m) *Fusarium equiseti* en *Phoma sorghina*, (n) *F.equiseti* en *M.phaseolina*, (o) *F.equiseti*, (p) *Epicoccum purpurascens* en *Phoma sorghina*, (q) *E.purpurascens* en *M.phaseolina*, (r) *E.purpurascens*, (s) *Cladosporium cladosporioides* en *Phoma sorghina*, (t) *C.cladosporioides* en *M.phaseolina*, en (u) *C.cladosporioides*.

6.3. Resultate.



Tabel 17: Gemiddelde I/P-, r_2 -, S- en M-waardes van die endofiet geïnfecteerde plante, in vergelyking met die ongeïnfecteerde plante (kontrole) en die plante wat net met *Macrophomina phaseolina* en *Phoma sorghina* geïnfecteer is.

Fungus	I/P-verhouding*			r_2 -waardes*			S-waardes*			M-waardes*		
Kontrole	0.31	0.2	0.31	1.28	2.5	2.0	23.5	16.0	22.0	30.0	22.3	29.0
<i>C. cladosporioides</i>	0.46	0.4	0.3	2.74	1.8	3.3	30.8	31.0	30.0	33.5	35.3	37.3
<i>E. purpurascens</i>	0.3	0.42	0.12	1.52	1.14	0.8	25.5	17.0	22.0	27.3	23.3	32.2
<i>F. equiseti</i>	0.32	0.3	0.4	0.94	0.5	3.8	38.0	20.3	23.3	40.3	24.0	32.0
<i>Pae. lilacinus</i>	0.2	0.2	0.73	1.21	1.6	0.73	19.7	32.3	10.2	21.8	34.0	16.0
<i>Pen. chrysogenum</i>	0.5	0.5	0.4	1.96	1.34	2.2	30.2	19.0	12.2	33.7	20.0	20.0
<i>Phoma</i> sp.4	0.41	0.5	0.3	1.97	2.01	2.3	29.5	29.3	17.0	31.5	35.5	24.0
<i>M. phaseolina</i>	0.20	0.2	0.23	2.6	3.0	6.1	30.0	26.0	27.2	33.5	32.2	36.0
<i>Phoma sorghina</i>	0.11	0.13	0.2	2.6	1.2	2.1	15.5	18.2	13.0	17.7	23.0	21.0

*Kyk figuur 10.

Tabel 18: Gemiddelde I/P-, r_2 -, S- en M-waardes van die plante wat met *Macrophomina phaseolina* en die onderskeie endofiete geïnfecteer is, in vergelyking met die ongeïnfecteerde plante (kontrole).

Fungusse	I/P-verhouding*			r_2 (helling)*			S-waarde*			M-waarde*		
Kontrole	0.31	0.2	0.31	1.28	2.5	2.0	23.5	16.0	22.0	30.0	22.3	29.0
<i>C.cladosporioides</i>	0.3	0.6	0.5	3.31	9.6	4.1	26.8	36.0	17.5	31.5	45.3	28.5
<i>E.purpurascens</i>	0.12	0.23	0.3	2.5	5.3	1.0	22.2	18.3	23.3	26.0	26.2	32.2
<i>F.equiseti</i>	0.2	0.34	0.3	3.6	3.0	3.33	19.7	23.0	10.7	20.3	32.0	24.2
<i>Pae.lilacinus</i>	0.2	0.4	0.7	3.92	4.0	8.0	25.3	27.3	40.0	29.0	44.0	48.3
<i>Pen.chrysogenum</i>	0.1	0.3	0.4	3.53	5.0	4.0	24.3	26.3	26.3	30.3	38.3	36.7
<i>Phoma</i> sp.4	0.23	0.2	0.23	1.31	3.0	1.6	12.5	20.0	10.0	13.0	23.0	19.8

*Kyk figuur 10.

Tabel 19: Gemiddelde I/P-, r_2 -, S- en M-waardes van die plante wat geïnfecteer is in kombinasie van *Phoma sorghina* en die onderskeidelike endofiete, in vergelyking met die ongeïnfecteerde plant (kontrole).

Fungus	I/P-verhouding*			r_2 (helling)*			S-waarde*			M-waarde*		
Kontrole	0.31	0.2	0.31	1.28	2.5	2.0	2.33	16.0	22.0	30.0	22.3	29.0
<i>C. cladosporioides</i>	0.1	0.12	0.3	2.6	4.0	2.3	24.3	23.0	34.0	27.3	29.3	41.5
<i>E. purpurascens</i>	0.21	0.3	0.26	3.2	0.9	1.5	19.8	24.0	20.2	21.2	31.2	20.8
<i>F. equiseti</i>	0.2	0.3	0.22	2.55	3.2	2.3	20.3	25.0	13.5	23.2	34.0	20.8
<i>Pae. lilacinus</i>	0.12	0.15	0.3	2.2	10.0	1.34	29.0	29.0	20.5	30.5	35.2	28.5
<i>Pen. chrysogenum</i>	0.2	0.14	0.2	3.6	2.3	1.5	14.7	10.0	11.3	34.3	12.2	18.5
<i>Phoma</i> sp.4	0.21	0.24	0.4	2.4	1.4	4.0	28.7	18.3	25.2	34.3	24.0	35.8

*Kyk figuur 10

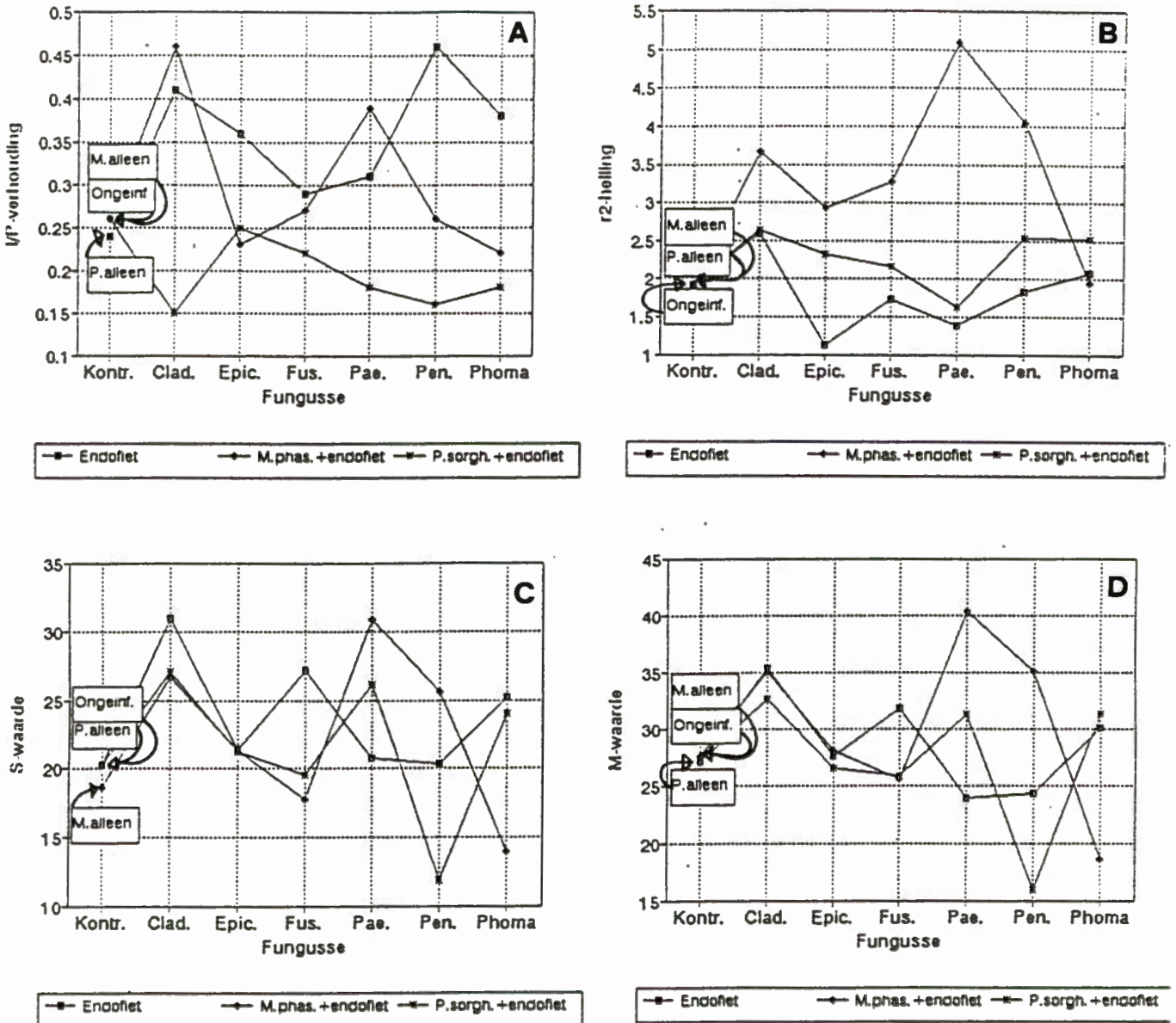


Fig.12: Gemiddelde waardes oor drie dae van ongeïnfekteerde plante, plante afsonderlik geïnfekteer met *Macrophomina phaseolina* en *Phoma sorghina*, plante geïnfekteer met die onderskeie endofiete afsonderlik en in kombinasie met die patogene respektiewelik. (a) I/P waardes, (b) r_2 -waardes, (c) S-waardes, (d) M-waardes.

Tabel 20: Samevatting effek van die endofiete op *Macrophoma phaseolina* (M) en *Phoma sorghina* (P), soos vasgestel deur chlorofilfluoressensie metings as 'n maatstaf van plantmetabolisme. (- negatiewe effek, + positiewe effek)

Endofiete	I/P		r ₂ -hel=ling		S		M-piek	
	M	P	M	P	M	P	M	P
<i>C.cladosporioides</i>	-	+	+	-	-	-	-	-
<i>E.purpurascens</i>	+	+	+	-	-	-	-	+
<i>F.equiseti</i>	-	+	+	-	+	+	+	+
<i>Pae.lilacinus</i>	-	+	-	+	-	-	-	-
<i>Pen.chrysogenum</i>	-	+	+	-	-	+	-	+
<i>Phoma sp.4</i>	+	-	+	-	+	-	+	-

6.4 Bespreking

Die resultate is statisties ontleed in 'n veelfaktor-variansie-analise, met behulp van die Statgraphics (Plus Ware) program.

6.4.1 I/P-verhouding

Die waardes van die I/P-verhouding word in figuur 12a weergegee. Waardes verkry van geïnfecteerde plante wat hoër is as dié van die kontrole plante, dui op beskadiging van die fotosintese-sisteem (Papageorgiou, 1975).

Die waardes waar plante met die endofiete alleen geïnfecteer is, verskil nie betekenisvol van mekaar nie ($P > 0.05$). *Cladosporium cladosporioides* en *Penicillium chrysogenum* toon egter 'n tendens om beskadiging van die fotosinteseproses te veroorsaak (Tabel 17). Ten opsigte van die herhalings en die waardes wat oor drie dae verkry is, was daar geen betekenisvolle verskille ($P > 0.05$) nie, wat 'n aanduiding is van die betroubaarheid van die bepaling oor tyd.

By die ongeïnfecteerde plant in vergelyking met die plant wat met *M.phaseolina* alleen geïnfecteer is, is daar geen betekenisvolle verskil nie, en die gemiddelde I/P-waarde van die geïnfecteerde plant is feitlik dieselfde as dié van die ongeïnfecteerde plant (Tabel 17). Dit wil dus voorkom asof *M.phaseolina* die plant se fotosintese proses op hierdie stadium nog nie beïnvloed het nie.

In die toets wat uitgevoer is met *M.phaseolina* in kombinasie met die onderskeie endofiete, is daar hoogs betekenisvolle verskille (Figuur 12a) tussen die endofiete verkry ($P < 0.01$). *C.cladosporioides*, *Fusarium equiseti* en *Paecilomyces lilacinus* het hoër I/P-waardes as dié van die ongeïnfecteerde plant, wat dui op beskadiging van die fotosinteseproses. *Epicoccum purpurascens*, *Penicillium chrysogenum* en *Phoma* sp.4 toon 'n tendens om die effek wat *M.phaseolina* op die

plant mag hê, teen te werk, alhoewel die gemiddelde I/P-waardes nie baie laer is as dié van die kontroleplant nie (Tabel 18; Figuur 12a). Oor 'n periode van drie dae is daar egter toenemende beskadiging van die plastokinoon-poel (PQ) waargeneem, wat dui op 'n verswakte fotosinteseproses. Laasgenoemde waarneming word gestaaf deur die hoogs betekenisvolle verskil in die I/P-waardes wat oor drie dae verkry is ($P < 0.01$). Die toename in die I/P-waardes word veral veroorsaak deur die kombinasie van *M.phaseolina* en *C.cladosporioides* en *Paecilomyces lilacinus* onderskeidelik, wat 'n toename in die I/P-waardes veroorsaak. Dit blyk dus dat die genoemde fungusse 'n sinergistiese effek op die siekteontwikkeling sou kon hê.

By plante wat net met *Phoma sorghina* geïnfecteer is, in vergelyking met die ongeïnfecteerde plant, is daar 'n betekenisvolle verskil ($P = 0.05$). Die effek wat hierdie verskil tot gevolg het, is 'n aanduiding dat *Phoma sorghina* die plant se fotosintese proses nie beskadig nie. Dit word bevestig deur die laer gemiddelde I/P-waarde van die geïnfecteerde plant in vergelyking met die hoër gemiddelde waarde van die ongeïnfecteerde plant (Tabel 17; Figuur 12a).

Waar *Phoma sorghina* in kombinasie met die onderskeie endofiete in die plant aanwesig is, kom daar 'n hoogs betekenisvolle verskil in die I/P-waardes voor ($P > 0.01; < 0.05$). Dit is veral *C.cladosporioides* en *Penicillium chrysogenum* wat 'n beskermende effek op die fotosintese proses het en *E.purpurascens*, *F.equiseti* en *Paecilomyces lilacinus* dra hiertoe by. Daar is ook 'n hoogs betekenisvolle ($P < 0.01$) verskil in die I/P-waardes wat oor drie dae verkry is en dit kan moontlik toegeskryf word aan die groter nadelige effek wat *Phoma* sp.4 op die fotosinteseproses het (Tabel 19; Figuur 12a).

6.4.2 r_2 -waardes (PS-Helling)

Die afname PS (Figuur 10b) dui op 'n toename in fotochemiese verbruiking van die beskikbare elektroniese eksitasie, ten koste van die deeltjie wat uitgestraal word as fluoressensie. Dit dui dus op die blussing van fluoressensie. Indien die r_2 -waardes van die geïnfecteerde plante laer is as dié van die ongeïnfecteerde plant (kontrole), dui dit op beskerming van die plant (Papageorgiou, 1975).

Uit die resultate (Figuur 12b ; Tabel 17) blyk dit dat die endofiete geen betekenisvolle effek op die fotosinteseproses gehad het nie ($P > 0.05$). *E.purpurascens*, *F.equiseti*, *Paecilomyces lilacinus* en *Penicillium chrysogenum* toon 'n tendens om 'n beskermende effek op die plant te hê, alhoewel nie statisties betekenisvol nie. Geen beskerming word deur *C.cladosporioides* en *Phoma* sp.4 gegee nie. Daar is ook geen betekenisvolle verskil in die r_2 -waardes oor 'n periode van drie dae nie ($P > 0.05$), en dui dus op die betroubaarheid van die resultate.

By die plante wat met *M.phaseolina* alleen geïnfecteer is, in vergelyking met die ongeïnfecteerde plante, is die gemiddelde r_2 -waarde hoër as dié van die ongeïnfecteerde plante wat op belemmering dui van fluoressensie-blussing dui. Geen betekenisvolle verskil kom voor nie ($P > 0.05$), maar *M.phaseolina* toon 'n tendens om 'n nadelige effek op die fluoressensie-blussing te hê (Tabel 17; Figuur 12b).

Met *M.phaseolina* in kombinasie met die onderskeie endofiete, is daar geen betekenisvolle veranderinge (Figuur 12b) in die r_2 -waardes nie ($P > 0.05$). Nie een van die endofiete het dus hier 'n voordelige effek gehad nie. Inteendeel het *M.phaseolina* in kombinasie met *Paecilomyces lilacinus* 'n baie nadelige effek op die plant (Figuur 12b en Tabel 18). Die betroubaarheid van die gegewens word gestaaf deurdat

geen betekenisvolle effek in die gemiddelde r_2 -waarde oor 'n periode van 3 dae verkry is nie ($P > 0.05$).

Geen betekenisvolle verskil ($P > 0.05$) kom voor waar die plant met *Phoma sorghina* alleen geïnfecteer is, in vergelyking met die ongeïnfecteerde plant (Tabel 17; Figuur 12b). Die r_2 -waardes van geïnfecteerde plant toon 'n geringe styging bo dié van die ongeïnfecteerde plant, en dui dus op 'n tendens om 'n nadelige effek op fluoressensie-blussing te hê.

Waar *Phoma sorghina* in kombinasie met die onderskeie endofiete in die plant aanwesig was (Tabel 19), is geen betekenisvolle verskil in die r_2 -waardes gevind nie ($P > 0.05$). *Paecilomyces lilacinus* toon 'n tendens om 'n beskermende effek te hê, (Figuur 12b). Geen betekenisvolle verskil kom tussen die r_2 -waardes voor wat oor drie dae verkry is nie ($P > 0.05$), en dit dui op die betroubaarheid van die gegewens.

6.4.3 S-waardes.

Wanneer die waardes van die geïnfecteerde plante hoër is as dié van die ongeïnfecteerde plante dui dit op beskadiging van die Fo-energieverspreiding tussen fotosisteam II (PS II) en fotosisteam I (PS I) (Papageorgiou, 1975).

Geen betekenisvolle verskil kom by die effek wat endofiete op die plant het, voor nie ($P > 0.05$). Al die endofiete het 'n nadelige effek op die energiever spreiding tussen PS II en PS I. Dit is veral *C.cladosporioides* wat 'n baie nadelige effek op die energiever spreiding het (Figuur 12c). 'n Betekenisvolle verskil kom in die waardes voor wat oor drie dae verkry is ($P > 0.01; < 0.05$). 'n Afname in die S-waardes kom na drie dae voor, wat veral by *C.cladosporioides*, *E.purpurascens*, *Penicillium chrysogenum* en *Phoma sp.4* verkry is (Tabel 17; Figuur 12c).

Waar die plant met *M.phaseolina* alleen geïnfecteer is, in vergelyking met die ongeïnfecteerde plant, dui die hoër gemiddelde waarde van *M.phaseolina* op beskadiging van die energieverbreiding-sisteem (Tabel 17; Figuur 12c). Die betekenisvolle verskil ($P > 0.01$) tussen plante wat net met *M.phaseolina* geïnfecteer is en die ongeïnfecteerde plante, dui dus op 'n nadelige effek van *M.phaseolina* op die energieverbreiding (Tabel 17).

M.phaseolina in kombinasie met die onderskeie endofiete toon hoogs betekenisvolle verskil ($P < 0.01$). Uit die resultate blyk dit dat *F.equiseti* en *Phoma* sp.4 die verspreiding van Fo-energie bevoordeel, terwyl *C.cladosporioides*, *E.purpurascens*, *Paecilomyces lilacinus* en *Penicillium chrysogenum* 'n nadelige effek daarop het (Tabel 18; Figuur 12c). Geen betekenisvolle verskille kom oor die drie dae voor nie ($P > 0.05$), en dui op die betroubaarheid van die gegewens.

By die plante wat net met *Phoma sorghina* geïnfecteer is, in vergelyking met die ongeïnfecteerde plant, dui die kleiner gemiddelde waarde van *Phoma sorghina* nie op 'n nadelige effek nie. Geen betekenisvolle verskil kom voor nie ($P > 0.05$), en dit blyk dat *Phoma sorghina* die energie verspreiding nie nadelig beïnvloed nie (Tabel 17; Figuur 12c).

Ook in die kombinasie van *Phoma sorghina* en die onderskeie endofiete kom daar 'n hoogs betekenisvolle verskil voor ($P < 0.01$). *Penicillium chrysogenum* verskil betekenisvol laer van die ongeïnfecteerde plante en hoogs betekenisvol laer van *C.cladosporioides*. Verder blyk dit dat *F.equiseti* en *Penicillium chrysogenum* 'n beskermende effek op die plant het. Die Fo-energieverspreiding word nadelig beïnvloed deur *C.cladosporioides*, *E.purpurascens*, *Paecilomyces lilacinus* en *Phoma* sp.4 (Tabel 19; Figuur 12c). Die betroubaarheid van die gegewens word gestaaf deurdat geen betekenisvolle verskil in die S-waardes oor drie dae voorkom nie ($P > 0.05$).

6.4.4 M-piekwaardes.

Indien die M-piekwaardes van die geïnfecteerde plante hoër is as dié van die ongeïnfecteerde plant (kontrole), dui dit op behoud van die membraan-integriteit van die chloroplaste. (Papageorgiou, 1975).

Geen betekenisvolle verskille (Figuur 12d) kom tussen die waardes van plante wat met endofiete geïnfecteer is, voor nie ($P > 0.05$). *C.cladosporioides*, *E.purpurascens*, *F.equiseti* en *Phoma* sp.4 toon 'n tendens om membraan-integriteit te bevoordeel, terwyl *Paecilomyces lilacinus* en *Penicillium chrysogenum* die membraan-integriteit van die chloroplaste benadeel (Tabel 17). Geen betekenisvolle verskil kom tydens die drie dae voor nie ($P > 0.05$), en dui op die betroubaarheid van die gegewens.

Plante wat net met *M.phaseolina* geïnfecteer is, in vergelyking met die ongeïnfecteerde plante, toon geen betekenisvolle verskil nie ($P > 0.05$), maar toon 'n tendens om die membraan-integriteit van die chloroplaste te beskerm. Die hoër gemiddelde waarde van *M.phaseolina* is 'n verder aanduiding hiervan (Tabel 17; Figuur 12d).

Hoogs betekenisvolle verskille kom voor by die kombinasie van *M.phaseolina* en die onderskeie endofiete in die plante ($P < 0.01$). Uit die resultate (Tabel 18; Figuur 12d) blyk dit dat *C.cladosporioides*, *E.purpurascens*, *Paecilomyces lilacinus* en *Penicillium chrysogenum* die membraan-integriteit benadeel. *F.equiseti* en *Phoma* sp.4 toon 'n tendens om die membraan-integriteit van die plant in die teenwoordigheid van die patoogeen, te beskerm (Tabel 18; Figuur 12d). Tydens die drie dae is daar 'n betekenisvolle verskil in die M-piekwaardes ($P = 0.01$), en dui daarop dat die gegewens nie noodwendig weer herhaalbaar is nie.

Geen betekenisvolle verskil ($P > 0.05$) kom ook voor waar die plant net met *Phoma sorghina* geïnfekteer is, in vergelyking met die ongeïnfecteerde plant nie. Die laer gemiddelde (Figuur 12d; Tabel 19) waarde waar *Phoma sorghina* aanwesig is dui op beskadiging van die membraan-integriteit van die chloroplaste.

Phoma sorghina en die onderskeie endofiete in kombinasie toon 'n hoogs betekenisvolle verskil in die M-piekwaardes ($P < 0.01$). *E.purpurascens*, *F.equiseti* en *Penicillium chrysogenum* beskerm membraan-integriteit, terwyl *C.cladosporioides*, *Paecilomyces lilacinus* en *Phoma* sp.4 'n nadelige effek op die membraan-integriteit het (Tabel 19; Figuur 12d). Geen betekenisvolle verskil kom in die M-piekwaardes voor tydens die drie dae nie ($P > 0.05$), en dui op die betroubaarheid van die gegewens.

7. SAMEVATTENDE BESPREKING

Dit is duidelik dat daar nog talle onbeantwoorde vrae is ten opsigte van die rol van endofitiese fungusse in die plant. Die verskeidenheid fungusse wat uit die plant geïsoleer is, is heelwat minder as byvoorbeeld uit koringplante wat in Switserland deur Riesen (1985) ondersoek is. Dit mag wees dat klimaatsfaktore, en veral humiditeit en blaaroppervlak vogtigheid, hierin 'n groot rol speel soos aangedui deur Dickonson (1976). Die doel van die ondersoek was egter nie om 'n volledige ontleding te doen van plante wat in 'n verskeidenheid omstandighede groei nie. Daarom is slegs enkele fungusse gekies om basiese beginsels te evalueer. *C.cladosporioides*, *E.purpurascens*, *F.equiseti*, *Paecilomyces lilacinus*, *Penicillium chrysogenum* en *Phoma* sp.4, is verteenwoordigend van die mees antagonistiese endofiete wat uit die sorghumplante geïsoleer is. Die patogene *M.phaseolina* en *Phoma sorghina* is ook uiteenlopend van aard en nie noodwendig onder alle omstandighede sterk patogene nie. *M.phaseolina* veroorsaak hoofsaaklik siekte by plante wat aan spanningstoestande onderwerp word.

Die isolasie van fungusse wat as endofiete getipeer kan word volgens die definisie van Siegel et.al. (1987), (waarvolgens ware endofiete nie uitwendige vrugliggame op die plantoppervlak vorm nie, en nie-ware endofiete wel uitwendige miselium en/of spore kan vorm), kan probleme lewer aangesien betreklik drastiese prosedures gebruik word vir sterilisasie. Dit mag wees dat sommige fungusse deur die proses in die plant doodgemaak word. Die feit dat daar egter in geslaag is om die plante weer met die fungusse te infekteer, dui egter daarop dat die fungusse wel as endofiete beskou kan word. Na analogie van fillosfeer fungusbepalings (Elad, 1990), moet egter aanvaar word dat daar onder verskillende omgewingstoestande ander organismes aanwesig kan wees, omdat die

samestelling van die mikro-organismes beïnvloed word deur byvoorbeeld blaareksudate, wissellende omgewingstemperature, atmosferiese gasse, lugbesoedeling en wind (Elad, 1990). Die organismes wat wel gevind is, kan egter as betreklik tipies van fillosfeer organismes beskou word. Die aanwesigheid van soveel *Phoma* sp. isolate en enkele *Fusarium* sp. isolate, dui egter daarop dat endofitiese fungusse as groep, nie in plantsiektestudies ignoreer kan word nie.

Die *in vitro* toetse vir antagonisme het die potensiaal van die enkele endofitiese fungusse vir die groeiremming van *M. phaseolina* en *Phoma sorghina* geïllustreer. Die keuse van 'n medium vir sulke toetse sal egter wyer getoets moet word, as op die verskillende resultate met verskillende groeime-diums gelet word. Uit hierdie resultate blyk dit dat verskillende antagoniste, verskillende voedingstowwe benodig. Die *in vitro* antagonistiese potensiaal van die fungusse wat wel getoets is was egter verrassend. Die antagonistiese vermoë van die bekende saprotrofe fungusse op koringstrooi as medium, behoort verder ondersoek te word omdat dit ook implikasies het vir saprofitiese oorlewing van fungusse in die grond. Elad (1990) het ook aangetoon dat saprotrofe fungusse 'n belangrike rol speel in die vermindering van blaarsiektes.

Hierdie kompetisievermoë van die saprotrofe fungusse, het ook verder geblyk uit die effekte wat dit op die saadkolonisatie-vermoë van die patogene gehad het. Uit die *in vitro* toetse kan die afleiding gemaak word, dat *Paecilomyces lilacinus* en *Epicoccum purpurascens* die grootste potensiaal as antagoniste gehad het. Een van die oogmerke met die saadkolonisatie-toetse was om te bepaal of die endofiete deur die saad in die plant gevestig word. Dit het geblyk dat so 'n infeksietode slegs in die geval van *Paecilomyces lilacinus* en *Penicillium chrysogenum*, geïnfecteerde plante gelewer het (Figuur 9). Die spuit van konidiums op

plantoppervlakke en die skepping van 'n vogtige omgewing daarna, vir 'n periode, is waarskynlik die prosedure wat meeste met die natuurlike ooreenstem (Dickonson, 1976). Beter resultate is ook met laasgenoemde metode verkry. Hiervan is die hoë persentasie infeksie wat met *C.claddosporioides*, *Paecilomyces lilacinus*, *Penicillium chrysogenum* en *Phoma* sp.4 verkry is, 'n bevestiging.

Soos in die doelstelling voorgestel is, was die hele ondersoek daarop gemik om die hipotese te verifieer, dat nie-patogene fungusse wat uit plante geïsoleer word weer terug geplaas kan word. Hierin is geslaag. Die bepaling van die funksie van hierdie organismes in die plant en die moontlikheid vir die aanwending van die fungusse as biologiese beheeragense, kon nie volledig evalueer word nie. Die nut van chlorofilfluoressensie-bepalings as 'n sensitiewe metode om nadelige en/of voordelige effekte van fungusse in plante te bepaal, is egter aangetoon. Die enkele resultate van die ondersoek dui op 'n onontginde wyse om patogenese en ander fungus:gasheer verhoudings te bestudeer. Dit is duidelik dat daar komplekse interaksies ter sprake is. In Tabel 20 word 'n opsomming van die interaksies gegee. Alhoewel *in vitro* toetse, antagonisme tussen byvoorbeeld *Paecilomyces lilacinus* en *M.phaseolina* getoon het, is dit nie deur die fluoressensie-bepalings bevestig nie. *Phoma* sp.4 het egter in alle gevalle in plante saam met *M.phaseolina* 'n positiewe effek op verskillende aspekte van die fotosintese-reaksie, gehad. Wat ook opmerklik is, is die nadelige effekte wat endofiete in kombinasie met die patogene op die fotosintese-reaksies en ook op chloroplaste kan hê. Dit kan moontlik wees dat die endofiete nie by al die fisiologiese prosesse van die plant aangepas is nie, en gevolglik is die verdedigingsmeganismes van die plant ook teen die endofiete gemik. Dit kan moontlik 'n verklaring wees waarom die endofiet nie so 'n groot effek op die patogene gehad het nie. Dit regverdig waarskynlik verdere

ondersoek op 'n groter skaal. Omdat dit 'n nuwe ondersoekterrein is, mag dit ook wees dat die statistiese toets waarmee die resultate ontleed is, nie sensitief genoeg is vir hierdie soort biologiese bepalinge nie. Verdere ondersoeke sal nodig wees om te bepaal of die klein verskille wat wel waargeneem is, nie tog groter betekenis het nie. Bepalinge oor 'n langer periode mag ook tot ander gevolgtrekkings lei.

Die gebruik van fungusse as antagoniste in biologiese beheer is reeds aangetoon (Johnston & Booth, 1983). Met hierdie ondersoek is nog nie bewys of dit vir siektes van byvoorbeeld sorghum, 'n haalbare beheermaatregel sal wees nie, maar dit blyk dat die potensiaal vir die aanwending van endofitiese fungusse vir dié doel, verder ondersoek moet word.

BYLAAG A.

Die volgende twee groeimediums, naamlik aartappel-dekstrose-agar (ADA) en sorghum-agar (SA) is as volg saamgestel:

Aartappel-dekstrose-agar: (g l⁻¹)

Aartappelekstrak	- 4.0
Dekstrose	- 20.0
Agar	- 15.0
Water	- om een liter te maak
pH	- 5.6

Vir Sorghum-agar (g l⁻¹) is Hinds se Maltabella pap as basis gebruik, wat saamgestel is uit graansorghum en sout.

Maltabella meel	- 19
Agar	- 15
Water	- om een liter te maak

BRONNELYS

- AMHAD, I., FARRAR, J.F. & WHITBREAD, R. 1983. Photosynthesis and chloroplast functioning in leaves of barley infected with brown rust. *Physiological Plant Pathology*, 23:411-419.
- BACON, C.W. & SIEGEL, M.R. 1988. Endophyte parasitism of Tall Fescue. *Journal of Production Agriculture*, 1: 45-55.
- BLAKEMAN, J.P. 1988. Competitive antagonism of air-borne fungal pathogens. (In Burge, M.N., red. *Fungi in biological control systems*. Manchester : Manchester University Press. p.141-160)
- BLAKEMAN, J.P. & FOKKEMA, N.J. 1982. Potential for biological control of plant diseases on the phylloplane. *Annual Review of Phytopathology*, 20:167-192.
- BURGE, M.N. 1988. The scope of fungi in biological control. (In BURGE, M.N., red. *Fungi in biological control systems*. p.1-18)
- CLAY, K. 1987. Effects of endophytes on the seed and seedling biology of *Lolium perenne* and *Festuca arundinacea*. *Oecologia*, 73:358-362.
- DHINGRA, O.D. & SINCLAIR, J.B. 1986. *Basic plant pathology methods*. Florida : CRC Press, Inc. Boca Raton. 355 p.
- DICKONSON, C.H. 1976. Fungi on aerial surfaces of higher plants. (In Dickonson, C.H. & Preece, T.F., red. *Microbiology of aerial plant surfaces*. London : Academic Press.)

- DUBOS, B. & BULIT, J. 1981. Filamentous fungi as biocontrol agents on aerial plant surfaces. (In Blakeman, J.P., red. Microbial ecology of the phylloplane. London : Academic Press.)
- ELAD, Y. 1990. Reasons for the delay in development of biological control of foliar pathogens. *Phytoparasitica*, 18:99-105.
- ELLIS, M.B. & ELLIS, J.P. 1985. Microfungi on Land Plants- An Identification Handbook. London & Sydney : Croom Helm. 818 p.
- ELLIS, M.B. 1976. More Dematiaceous Hyphomycetes. Kew : Commonwealth Mycological Institute. 507 p.
- ELLIS, M.B. 1971. Dematiaceous Hyphomycetes. Kew : Commonwealth Mycological Institute. 608 p.
- FISHER, P.J. & PETRINI, O. 1984. Antibiotic activity of some endophytic fungi from ericaceous plants. *Botanica Helvetica*, 94:249-253.
- FOKKEMA, N.J. 1981. Fungal leaf saprophytes, beneficial or detrimental. (In Blakeman, J.P., red. Microbial ecology of the phylloplane. London : Academic Press.)
- FOKKEMA, N.J. 1976. Antagonism between fungal saprophytes and pathogens on aerial plant surfaces. (In Dickonson, C.H. & Preece, T.F., red. Microbiology of aerial plant surfaces. London : Academic Press.)
- FOWLER, J. & COHEN, L. 1990. Practical statistics for field biology. Philadelphia : Open University Press. 227 p.
- FRY, W.E. 1982. Principles of Plant Disease Management. Sydney : Academic Press. 378 p.

- HINTON, D.M. & BACON, C.W. 1984. The distribution and ultrastructure of the endophyte of toxic tall fescue. *Canadian Journal of Botany*, 63:36-42.
- ILYAS, M.B. & SINCLAIR, J.B. 1976. Effects of plant age upon development of necrosis and occurrence of intraxylem sclerotia in soybean infected with *Macrophomina phaseolina*. *Phytopathology*, 64:156-157.
- JOHNSTON, A. & BOOTH, C. 1983. Plant pathologist's pocket-book. Kew : Commonwealth Mycological Institute. 439 p.
- KINKEL, L.L. & ANDREWS, J.H. 1988. Disinfestation of leaves by hydrogen peroxide. *Transactions of the British Mycological Society*, 91:523-528.
- KUHLMAN, E.G. 1980. Hypovirulence and hyperparasitism. (In Horsfall, J.G. & Cowling, E.B., eds. *Plant disease. How plants defend themselves*, Vol.V. London : Academic Press. 534 p.)
- LeCLERK, E.L., LEONARD, W.H. & CLARK, A.G. 1962. Field plot technique. Second edition. Minnesota : Burgess Publishing Company. 373 p.
- LONG, C. 1961. *Biochemist's Handbook*. London : E & F.N. Span Lt.d. 1192 p.
- MARTYN, R.D. & STACK, J.P. 1988. Biological control of soilborne pathogens by antagonistic fungi. (In Baudion, A.B.A.M., red. *Laboratory exercises in plant pathology... student exercises*. Minnesota : APS Press.)
- MENNEGA, R., NEL, P.C. & LE COURT DE BILLOT, M.R. 1990. Chlorophyll fluorescence as a technique for detection of atrazine in soil. *Applied Plant Science*, 4:84-85.

- NELSON, P.E., TOUSSOUN, T.A. & MARASAS, W.F.O. 1983. *Fusarium species. An Illustrated Manual for Identification.* University Park and London : The Pennsylvania State University Press. 193 p.
- PAPAGEORGIOU, G. 1975. Chlorophyll fluorescence: An intrinsic probe of photosynthesis. (In Govindjee, red. *Bioenergetics of photosynthesis.* London : Academic Press.)
- RAPER, K.B. & FENNELL, D.I. 1965. *The genus Aspergillus.* Baltimore : The Williams & Wilkens Company. 686 p.
- RIESEN, T.K. & CLOSE, R.C. 1987. Endophytic fungi in propiconazole-treated and untreated barley leaves. *Mycologia*, 79:546-552.
- RIESEN, T. 1985. A comparison between four wheat cultivars with different resistance to *Pheosphaeria nodorum* (Müller) Hedjaroude. (In Riesen, T. & Sieber, T., red. *Endophytic fungi in winter wheat (Triticum aestivum L.).* Zurich : ADAG Administration & Druck AG. 190 p.)
- SCHLÖSSER, E.W. 1980. Preformed internal chemical defenses. (In Horsfall, J.G. & Cowling, E.B., reds. *Plant disease. How plants defend themselves, Vol.V.* London : Academic Press. 534 p.)
- SHAW, D.R., PEEPER, T.F. & NOFZIGER, D.L. 1985. Comparison of chlorophyll fluorescence and fresh weight as herbicide bioassay techniques. *Weed Science*, 33:29-33.
- SHROTRIA, P.K., SINGH, R. & AGARWAL, V.K. 1986. Screening for germplasm resistance to sorghum grain mould. *Sorghum Newsletter*, 29:10-12.

- SIEGEL, M.R., LATCH, G.C.M. & JOHNSON, M.C. 1987. Fungal endophytes of grasses. *Annual Review of Phytopathology*, 25:293-315.
- SINCLAIR, J.B. 1984. Root and stalk rots caused by *Macrophomina phaseolina* in Legumes and other crops. (In Mughogho, L.K., red. Sorghum root and stalk rots. A critical review. Proceedings of the Consultative Group Discussion on Research Needs and Strategies for Control of Sorghum Root and Stalk Rot Diseases. Bellagio. 267 p.)
- SINGH, D.P. & AGARWAL, V.K. 1986. Interaction between grain mold pathogens of sorghum. *Indian Journal of Plant Pathology*, 4:101-104.
- SMILLIE, R.M. & HETHERINGTON, S.E. 1990. Screening for stress tolerance by chlorophyll fluorescence. (In Hashimoto, Y., Kramer, P.J., Nonami, H. & Strain, B.R., eds. Measurement techniques in plant science. New York : Academic Press, Inc. 431 p.)
- SPEAKMAN, J.B. & KRÜGER, W. 1983. A comparison of methods to surface sterilize wheat seeds. *Transactions of the British Mycological Society*, 80:374-376.
- SUZUKI, H. 1980. Defenses triggered by previous invaders: fungi. (In Horsfall, J.G. & Cowling, E.B., eds. Plant disease. How plants defend themselves, Vol.V. London : Academic Press. 534 p.)
- VAN DER BYL, P.A. 1928. Plantsiektes - Hul oorsaak en bestryding. Kaapstad : Nasionale Pers Beperk. 404 p.
- WEINHOLD, A.R. & HANCOCK, J.G. 1980. Defense at the Perimeter: Extruded chemicals. (In Horsfall, J.G. & Cowling, E.B., eds. Plant Disease. How plants defend themselves, Vol.V. London : Academic Press. 534 p.)

WHITE, J.F. 1988. Endophyte-host associations in forage grasses. XI. A proposal concerning origin and evolution. *Mycologia*, 80:442-446.

WHITE, J.F. & COLE, G.T. 1986. Endophyte-host association in forage grasses. IV. The endophyte of *Festuca versuta* *Mycologia*, 78:102-107.