

Aktywność enzymatyczna grzybów mikoryzowych. II.

R. PACHLEWSKI*, E. CHRUSCIAK**

* Zakład Gleboznawstwa i Nawożenia IBL — Sękocin

** Instytut Gleboznawstwa SGGW — AR, Warszawa

Pachlewski R., Chruściak E.: (* Department of Soil Science and Fertilization, Sękocin; ** Institute of Soil Science of the Warsaw Agricultural University, Warszawa, Rakowiecka 26/30, Poland). *Enzymatic activity of mycorrhizal fungi. II*. Acta Mycol. 16 (1): 97-103, 1980.

An attempt has been made to evaluate the participation of mycorrhizal fungi in the process of degradation of some aromatic compounds. 24 strains of ectomycorrhizal fungi, 1 ectendomycorrhizal strain and 11 nonmycorrhizal strains which decomposed wood were investigated. The observations were aimed at showing the synthesis by these fungi of laccase, peroxidase and tyrosinase. None of these fungi synthesized peroxidase.

WSTĘP

Istnieje pogląd, że grzyby mikoryzowe nie biorą udziału w rozkładzie ligniny (Harley 1959). Ich ograniczone możliwości wykorzystywania także innych wielkocząsteczkowych związków (Mélin 1953) są wyrazem przystosowania do symbiotycznego współżycia z roślinami wyższymi. Pełny cykl rozwojowy tej grupy grzybów warunkowany jest ogniwem mikoryzowym. Przy braku gospodarza mogą one jednak egzystować saprofitycznie; pozostając w fazie wegetatywnej pokrywają swoje zapotrzebowanie na źródło węgla i energii kosztem materii organicznej gleby.

Schemat rozkładu ligniny zaproponowany przez Trojanowskiego (1973) wskazuje na udział w nim oksydaz, a szczególnie w pierwszym okresie demetylacji peroksydazy i lakazy. Autor stawia hipotezę, że oba enzymy mogą pełnić analogiczne funkcje i wzajemnie się zastępować. Oksydazy te, utleniając różne związki fenolowe, są czynne także zapewne w procesie humifikacji, mineralizacji próchnicy i lignifikacji (Trojanowski 1964). Na podkreślenie zasługuje fakt, iż lakaza od-

znacza się stosunkowo małą specyfiką (F ä h r a e u s, L j u n g g r e n 1961; F ä h r a e u s 1961) i utlenienia szeregu związków aromatycznych takich jak katechol, hydrochinon, gwajakol i jego pochodne, p-krezol. Przy licznych doniesieniach dokumentujących syntezę oksydaz polifenolowych przez grzyby z innych grup ekologicznych (B a v e n d a m m 1928; H e n d e r s o n 1960; L y r 1956, 1957/58; M a l m s t r ö m 1958; T r o j a n o w s k i 1966), prace związane w tym aspekcie z grzybami mikoryzowymi są nieliczne (L u n d e b e r g 1970).

Celem naszych doświadczeń była próba ujawnienia syntezy enzymów biorących udział w rozkładzie wybranych związków aromatycznych przez grzyby mikoryzowe reprezentowane pod względem systematycznym przez różne rodzaje, gatunki i szczepy.

MATERIAŁ I METODY

Szczepy grzybów. Obserwacjami objęto 24 szczepy grzybów ektomikoryzowych (tab. 1), 1 szczep ektendomikoryzowy i porównawczo 11 szczepów niemikoryzowych odznaczających się zdolnością rozkładu drewna. Izolaty grzybów mikoryzowych oraz *Clitocybe nebularis*, *C. infundibuliformis*, *Collybia butyracea*, *C. velutipes*, *Hypholoma fasciculare*, *Marasmius graminum* i *Pholiota squarrosa* pochodziły z kolekcji Pracowni Biologii Gleb Leśnych IBL w Sękocinie. Szczepy *Armillaria mellea* i *Phlebia gigantea* otrzymano z Pracowni Fitopatologii IBL.

Oznaczenia enzymatyczne. Doświadczenia szły w kierunku ujawnienia zdolności do wytwarzania peroksydazy, pozakomórkowej lakazy (oksydazy p-dwufenolowej) i tyrozynazy (oksydazy o-dwufenolowej). W oznaczeniach posłużono się głównie metodą L y r a (1957/58).

W celu wykrycia lakazy i peroksydazy grzyby hodowano w ciągu 5-10 dni w temp. 25°C na płytkach Petriego z podłożem o składzie:

malt-ekstrakt	20 g
glukoza	20 g
pepton	1 g
α -naftol	50 mg
agar	18 g
woda destylowana	1000 ml, pH 4,5-5,0

O możliwości syntezy tych enzymów wnioskowano na podstawie pojawienia się ciemnoniebieskiego zabarwienia podłoża pod grzybnią i wokół niej, będącego wynikiem utlenienia α -naftolu. W celu odróżnienia lakazy od peroksydazy (oba enzymy dają produkty utleniania identycznej barwy), szczepy wykazujące pozytywną reakcję, przeszczepiano na podłoże o składzie jak wyżej, lecz bez α -naftolu, stałe i płynne. Po 5-10

dniach inkubacji w temp. 25°C wyjmowano kultury grzybów wraz z podłożem z płytek i na odwrotną stronę hodowli wprowadzano roztwór 0,1% benzydyny w buforze octanowym o pH 4,4. W przypadku tworzenia egzolakazy pojawiało się niebieskie zabarwienie. Następnie powierzchnię pożywki pokrywano dodatkowo roztworem 2% wody utlenionej. Przy pozytywnej peroksydazie niebieskie zabarwienie, dzięki utlenieniu benzydyny, winno ulec intensyfikacji. Z hodowli na pożywkę płynnej pobierano około 5 ml przesącza, dodawano kilka kropli 1% wody utlenionej i kilka kropli 2% wodnego roztworu p-fenylenodwuaminy. W przypadku syntezy peroksydazy przez grzyb winno pojawić się ciemnoniebieskie zabarwienie.

Dla stwierdzenia tyrozynazy do malt-agaru dodawano 2 g/l tyrozyny. Kryterium działalności tyrozynazy było pojawienie się wokół grzybni czerwono-brunatnego pigmentu będącego wynikiem utlenienia tyrozyny. Ponieważ tyrozynaza jest endoenzymem, efekt jej działania ujawnia się dopiero po spowodowaniu autolizy grzybni — w tym celu grzybnię traktowano 0,1% HgCl₂.

Kierując się pracą B a v e n d a m m a (1928) wszystkie testowane szczepy grzybów inkubowano ponadto na malt-agarze z dodatkiem taniny w ilości 1 g na litr. Związek ten obok kwasu galusowego jest substratem, który może być utleniany przez wszystkie trzy brane pod uwagę enzymy. Produkt utlenienia przyjmuje ciemnobrązowe zabarwienie, identyczne pod wpływem działania wszystkich enzymów. Nie można zatem tą metodą wyróżnić poszczególnych biokatalizatorów. Test może odgrywać tylko rolę uzupełniającą.

WYNIKI

Spśród przebadanych 24 szczepów grzybów ektomikoryzowych, reprezentujących 18 gatunków, 5 szczepów należących do 2 gatunków — *Cenococcum graniforme* i *Hebeloma mesophaeum* — syntetyzowało lakazę wydzielaną pozakomórkowo. Szczepy niemikoryzowe odznaczały się także zdolnością wytwarzania tego enzymu, przy czym największą aktywność wykazywały *Armillaria mellea* i *Pholiota squarrosa* (tab. 1). Produkcję lakazy przez *C. graniforme* sygnalizował także L u n d e b e r g (1970).

Żaden z użytych do doświadczeń izolatów nie wytwarzał peroksydazy. Z cytowanych przez L y r a (1957/58) grzybów wywołujących białą bądź brunatną zgniliznę drewna poddaliśmy testowi 4 gatunki. Wyniki pod względem pozytywnej reakcji na agarze z taniną oraz zdolności wytwarzania lakazy przy braku aktywności peroksydazy, z wyjątkiem *A. mellea*, są zbieżne. Natomiast w warunkach naszych doświadczeń

Tabela 1 — Table 1

Aktywność enzymatyczna grzybów mikoryzowych i rozkładających drewno
Enzymatic activity of mycorrhizal and decaying wood fungi

Gatunek Species	Nr lub sym- bol szcze- pu No. or sym- bol of strain	Test mi- koryzowy z sosną ekto- -ektendomi- koryza Mycorrhizal test with pine ecto- -ectendo- mycorrhizal	Reakcja na agarze z taniną Reaction on tannin agar	Lakaza Laccase	Peroksy- daza Peroxidase	Tyrozyna- naza Tyrosinase
1	2	3	4	5	6	7
<i>Amanita citrina</i> (Schff.) S. F. Gray	0583 0587	+ -- + --	-- --	-- --	-- --	-- --
<i>A. muscaria</i> (L. ex Fr.) Hooker	1/182	+ --	+	--	--	+
<i>A. verna</i> (Bull. ex Fr.) Pers. ex Vitt	0141	+ --	--	--	--	--
<i>Armillaria mellea</i> (Vahl.) Karst.		-- --	++	++	--	--
<i>Boletus edulis</i> Bull. ex Fr.	1239	+ --	--	--	--	--
<i>Cenococcum graniforme</i> (Sow.) Ferd. et Winge	3543 4931 4947 4952	+ -- nie te- stowano (not tested)	+ + + +	+ + + +	-- -- -- --	-- -- -- --
<i>Clitocybe infundibuli- formis</i> (Schff. ex Fr.) Quél.	1872	-- --	--	--	--	--
<i>C. nebularis</i> (Fr. ex Batsch.) Quél.	0982 1017 1020	-- -- -- -- -- --	+ + +	+ + +	-- -- --	-- -- --
<i>Collybia butyracea</i> (Bull. ex Fr.) Quél	1840	-- --	+	+	--	--
<i>C. velutipes</i> (Curt. ex Fr.) Quél.	1097	-- --	+	+	--	--
<i>Coltricia perennis</i> (L. ex Fr.) Murr.	1196	+ --	--	--	--	--
<i>Hebeloma mesophaeum</i> (Pers. ex Fr.) Quél	3037	+ --	+	+	--	--
<i>Hypholoma fasciculare</i> (Huds. ex Fr.) Kum.	1668	-- --	++	+	--	--
Izolat z ektendomikory- zy sosny —	MrgX	-- +	±	--	--	+

1	2	3	4	5	6	7
<i>Lactarius quietus</i> Fr.	1377	+ -	-	-	-	-
<i>Marasmius graminum</i> (Libert) Berk.	1105	- -	+	+	-	-
<i>Phlebia gigantea</i> (Fr.) Donk		nie te- stowano (not tested)	+	+	-	-
<i>Pholiota squarrosa</i> (Pers. ex Fr.) Kum.	1101	- -	++	++	-	-
<i>Rhizopogon luteolus</i> Fr.	0211	+ -	-	-	-	-
<i>Russula emetica</i> Fr.	2981	+ -	-	-	-	-
<i>Suillus bovinus</i> (L. ex Fr.) O. Kuntze	1941	+ -	±	-	-	±
<i>S. flavidus</i> (Fr.) Sing.	0164	+ -	-	-	-	-
<i>S. granulatus</i> (L. ex Fr.) O. Kuntze	1445	+ -	-	-	-	-
<i>S. luteus</i> (L. ex Fr.) S. F. Gray	0112 1155	+ -	-	-	-	-
<i>Tricholoma albobrunne- um</i> (Pers. ex Fr.) Kum.	1951	+ -	-	-	-	-
<i>T. flavovirens</i> (Pers. ex Fr.) Lund.	2183	+ -	-	-	-	-
<i>T. imbricatum</i> (Fr. ex Fr.) Kum.	1962	+ -	-	-	-	-
<i>T. pessundatum</i> (Fr.) Quél	2870	+ -	-	-	-	-

++ bardzo znaczna aktywność (very considerable activity); + reakcja pozytywna (positive reaction);

± słaba aktywność (poor activity); - brak reakcji (not reaction)

szczepy *A. mellea*, *Hypholoma fasciculare* i *Pholiota squarrosa* nie wykazały zdolności syntezy tyrozynazy. Z kolei stwierdziliśmy produkcję tyrozynazy przez 4 szczepy mikoryzowe — *Amanita muscaria*, izolat z ektendomikoryzy sosny MrgX oraz, w mniejszym stopniu, *Hebeloma mesophaeum* i *Suillus bovinus*. W tym ostatnim przypadku dyfuzja brązowego pigmentu do większości podłoży utrudniała prawidłowe odczytanie testu.

Z naszych wcześniejszych badań (Pachlewski, Chruściak 1979) wynika, iż zarówno *Hebeloma mesophaeum* jak *Cenococcum graniforme*, *Suillus bovinus* i szczep MrgX należą do grzybów o stosunkowo znacznej aktywności enzymatycznej (udział w rozkładzie asparaginy, mocznika, skrobi, pektyny) w porównaniu z innymi grzybami symbiotycznymi, co potwierdzają uzyskane w niniejszej pracy wyniki.

Szerokie rozpowszechnienie w glebie *Cenococcum graniforme*, o cha-

rakterze niemal ubikwistycznym, pozwala przypuszczać, że reprezentanci tego gatunku mogą współuczestniczyć w procesach, w których czynna jest lakaza.

Bavendamm (1928) uważa, że istnieje prosta zależność między reakcją grzybów utleniających taninę, a zdolnością do rozkładu ligniny. Późniejsze badania m.in. Henderson (1960) wykazały, że test Bavendamma upraszcza zagadnienie. Niemniej Lyr (1957/58) wyraża także pogląd, iż zdolnością do rozkładu ligniny odznaczają się grzyby wytwarzające lakazę i peroksydazę. Lakaza jest egzoenzymem i wg Lyr nie ma wątpliwości, że właśnie ten enzym jest głównie odpowiedzialny za pozytywny wynik testu Bavendamma. W naszych obserwacjach uwaga ta znajduje potwierdzenie.

Rola tyrozynazy sprowadza się do przemian związków fenolowych, które mogą m.in. pochodzić z rozkładu ligniny lub wydzielin korzeniowych. W konsekwencji stężenie tych związków utrzymuje się w koncentracjach nietoksycznych dla roślin. Trojanowski (1973) cytuje wyniki badań Eklund, z których wynika, że utlenienie przez drobnoustroje katecholu i tyrozyny ma wyraźnie korzystny wpływ na rozwój roślin dzięki stymulującemu działaniu chinonów powstałych z tych związków.

WNIOSKI

1. Symbioza grzybów z roślinami wyższymi ogranicza ich aktywność enzymatyczną. Nie mniej jednak, jak wykazały badania, nie można wykluczyć udziału tej grupy *Basidiomycetes* i *Ascomycetes* w przemianach związków organicznych zachodzących w glebie.

2. Synteza lakazy przez grzyby ektomikoryzowe jest cechą stosunkowo rzadką. Aktywne wytwarzanie tego enzymu stwierdzono u 4 szczepów *Cenococcum graniforme* i 1 izolatu *Hebeloma mesophaeum*.

3. *Amanita muscaria*, izolat z ektendomikoryzy sosny MrgX oraz, nieco mniej aktywnie, *Hebeloma mesophaeum* i *Suillus bovinus* wytwarzały w warunkach naszego doświadczenia tyrozynazę.

4. Żaden z objętych obserwacjami szczepów nie produkował peroksydazy.

LITERATURA

- Bavendamm W., 1928, Über das Vorkommen und den Nachweis von Oxydasen bei holzerstörenden Pilzen. Z. Pflanzenkrh. 38: 257.
 Fähræus G., Ljunggren H., 1961, Substrate specificity of a purified fungal laccase. Bioch. Bioph. Acta 46: 21-32.

- Fähraeus G., 1961, Monophenolase and polyphenolase activity of fungal laccase. *Bioch. Bioph. Acta* 54: 192-194.
- Harley J. L., 1959, *Biology of mycorrhiza*, London.
- Henderson M., 1960, Studies on the physiology of lignin decomposition by soil fungi, in *The ecology of soil fungi*: 286, Liverpool University Press.
- Leonowicz A., Trojanowski J., 1965, Exoenzymes in fungi degrading lignin. *Acta Microb. Polon.* 14: 55-61.
- Lundeborg G., 1970, Utilisation of various nitrogen sources in particular bound soil nitrogen by mycorrhizal fungi. *Studia Forestalia Suecica* 3.
- Lyr H., 1956, Untersuchungen über die Peroxydasen höheren Pilze. *Planta* 48: 239-265.
- Lyr H., 1957/58, Über den Nachweis von Oxydasen und Peroxydasen bei höheren Pilzen und die Bedeutung dieser Enzyme für die Bavendamm-Reaktion. *Planta* 50: 359-370.
- Malmström G., Fähraeus G., Mosbach R., 1958, Purification of laccase. *Bioch. Bioph. Acta* 28: 652-653.
- Melin E., 1953, Physiology of mycorrhizal relations in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 4: 325-345.
- Pachlewski R., Chruściak E., 1979, Aktywność enzymatyczna grzybów mikoryzowych. *Acta Mycol.* 15: 3-9.
- Trojanowski J., 1964, Roślinne oksydazy miedzioproteidowe. *Post. Bioch.* 10: 93-111.
- Trojanowski J., Leonowicz A., Hampel B., 1966, Exoenzymes in fungi degrading lignin. *Acta Microb. Polon.* 15: 17-22.
- Trojanowski J., 1973, *Przemiany substancji organicznych w glebie*. Warszawa, PWRiL.