

Aktywność enzymatyczna grzybów mikoryzowych

ROMAN PACHLEWSKI, ELŻBIETA CHRUŚCIAK

Zakład Gleboznawstwa i Nawożenia
Instytut Badawczy Leśnictwa, Warszawa-Sękocin

Pachlewski R., Chruściak E.: (Forestry Research Institute, Warszawa-Sękocin, Poland). *Enzymatic activity of mycorrhizal fungi*. Acta Mycol. 15 (1): 3-9, 1979.

The investigations included assays of enzymatic activity of ectomycorrhizal fungi from the genera: *Amanita*, *Cenococcum*, *Coltricia*, *Hebeloma*, *Lactarius*, *Rhizopogon*, *Russula*, *Suillus*, *Tricholoma* and the pine ectendomycorrhizal strain MrgX. Among the 22 investigated strains of fungi 18 could decompose starch, 14 urea, 11 asparagine, 7 protein, 6 pectin and 3 cellulose. The most varied enzyme activities were found in *Amanita muscaria*, *A. verna*, *Hebeloma mesophaeum*, ectendomycorrhizal isolate MrgX, *Rhizopogon luteolus* and *Suillus bovinus*, the highest cellulolytic activity was shown by the ectendomycorrhizal strain.

WSTĘP

Aktywność enzymatyczna każdej grupy drobnoustrojów jest wyznacznikiem ich przynależności ekologicznej i powiązań symbiotycznych. Istnieją sugestie, iż grzyby mikoryzowe ewoluowały od saprofityzmu poprzez pasożytnictwo do symbiozy — współżycia mikoryzowego, osiągając w tym ostatnim wysoki stopień specjalizacji morfofizjologicznej. To przystosowanie dało swój wyraz między innymi we właściwościach enzymatycznych tych grzybów, zwłaszcza w zakresie syntezy enzymów biorących udział w rozkładzie bardziej złożonych związków typu celuloza czy lignina. Większość szczepów grzybów ektomikoryzowych wykorzystuje głównie cukry proste, względnie dwucukry (Harley 1959; Palmer, Hacskaýlo 1970), podczas gdy np. grzyby ektendomikoryzowe wytwarzają przypuszczalnie celulazę. Przystosowanie do symbiozy daje także w efekcie dużą wrażliwość tych grzybów na konkurencyjne działanie innych glebowych organizmów, podobnie jak ma to miejsce u obligatoryjnych patogenów.

Lundberg (1970) badał porównawczo wydzielanie niektórych egzoenzymów przez typowe grzyby mikoryzowe oraz grzyby rozkładające ściółkę. Jego doświadczenia potwierdziły znacznie niższą aktywność enzyma-

tyczną grzybów symbiotycznych, ujawniając jednocześnie ich różne właściwości w tym zakresie. I tak niektóre z nich, jak np. *Lactarius deliciosus*, *Tricholoma albobrunneum*, wytwarzają celulazę, proteinazę, pektynazę, *Rhizopogon luteolus* celulazę i proteinazę, *Cenococcum graniforme* — celulazę, pektynazę i laktazę. Wśród szczepów *Boletus (Xerocomus) subtomentosus* autor wyróżnił dwie rasy — jedną o niskiej aktywności enzymatycznej, drugą zbliżoną pod tym względem do gatunków rozkładających ściółkę.

Obserwacje L y r a (1960) szły także w kierunku identyfikacji enzymów grzybów mikoryzowych aktywnych w rozkładzie ściółki, a więc celulazy, amylazy, ksylanazy, pektynazy i proteinazy. Autor, przeprowadzając równoległe badania nad grzybami mikoryzowymi, patogenami rozkładającymi drewno oraz glebowymi grzybami saprofitycznymi z klasy *Basidiomycetes*, stwierdził w warunkach przeprowadzonych doświadczeń, że u grzybów ektomikoryzowych jak np. *Boletus (Suillus) luteus*, *B. (S.) variegatus*, *Amanita citrina* występuje pewna aktywność celulolityczna, amylolityczna, proteolityczna oraz zdolność do rozkładu ksylanu, przy jednoczesnym braku pektynazy. U grzybów tych stopień aktywności enzymatycznej był znacznie niższy niż u dwu pozostałych grup. Właściwość ta zresztą wahała się w zależności od składu pożywki — znacznie malała w obecności dużego stężenia rozpuszczalnych węglowodanów.

Z uwagi na występujące różnice w biosyntezie enzymów u różnych gatunków grzybów mikoryzowych i ich szczepów (H a c s k a y l o 1973; L y r a 1960; M e l i n 1953), postanowiono przebadać tę właściwość poddając testowi szereg szczepów o określonych cechach mikoryzogenych (P a c h l e w s k i, P a c h l e w s k a 1971, 1974).

MATERIAL I METODY

Obserwacjami objęto grzyby ektomikoryzowe (tab. 1) z rodzajów *Amanita*, *Cenococcum*, *Coltricia*, *Hebeloma*, *Lactarius*, *Rhizopogon*, *Russula*, *Suillus*, *Tricholoma* oraz szczep ektendomikoryzowy MrgX. Wszystkie szczepy pochodziły z kolekcji Pracowni Mikrobiologii Leśnej IBL w Jeziorach (obecnie Pracownia Biologii Gleb Leśnych IBL w Sękocinie k. Warszawy).

Poddano próbie rozkładu przez te grzyby w warunkach laboratoryjnych skrobię, pektynę, celulozę, asparaginę, białko i mocznik.

Zdolności amylolityczne określano zmodyfikowaną metodą wg K a s a t k i n e j (1969). Modyfikacja polegała na użyciu tylko jednej warstwy (zamiast dwu) podłoża o składzie:

skrobia rozpuszczalna — 1%

agar — 2%

woda wodociągowa — 1000 ml

Podłoże rozlewano do płytek Petriego, inokulowano grzybnią poszczegół-

nych gatunków i inkubowano 5-10 dni w temperaturze 25°C. Rozkład skrobi ujawniano zalewając podłoże 0,01 N roztworem jodu. Wokół kolonii i pod koloniami wytwarzającymi amylazę tworzyły się na granatowym tle pożywki bezbarwne strefy.

Rozkład pektyny badano wg procedury opisanej przez Wierbinę i Cysurę (1969).

W celu wstępnej oceny zdolności celulolitycznych grzyby hodowano na podłożu wg Dubosa o składzie:

NaNO₃ — 0,05 g,
 KH₂PO₄ — 1 g,
 MgSO₄ — 0,5 g,
 KCl — 0,5 g,
 FeSO₄ — 0,01 g,
 woda destylowana — 1000 ml.

Paski bibuły filtracyjnej jako jedyne źródło węgla wkładano do probówek i wylewano do każdej po 5 ml w/w. roztworu. Po inokulacji hodowle inkubowano 4 tygodnie w temperaturze 25°C. Te ze szczepów, które wykazywały zdolność wzrostu na bibule, traktowano jako potencjalnie zdolne do jej rozkładu. W dalszym ciągu przeszczepiano je na podłoża o składzie:

I wariant	II wariant
MgSO ₄ — 0,5 g	MgSO ₄ — 0,5 g
KH ₂ PO ₄ — 1 g	KH ₂ PO ₄ — 1 g
cytrynian żelaza 1% — 0,5 ml	cytrynian żelaza 1% — 0,5 ml
ZnSO ₄ (1:500) — 0,5 ml	ZnSO ₄ (1:500) — 0,5 ml
tiamina — 50 µg	tiamina — 50 µg
d-celobioza — 5 g	sól sodowa karboksymetylocelulozy — 10 g
agar — 20 g	
woda destylowana — 1000 ml	woda destylowana — 1000 ml

Grzyby hodowano na obu podłożach w ciągu 14 dni w temperaturze 25°C; oceniając na pożywce z celobiozą intensywność wzrostu, natomiast na podłożu z karboksymetylocelulozą określano zawartość cukrów redukujących metodą kolorymetryczną (Mejbaum-Katzenllengen, Mochacka 1968).

Dezaminację asparaginy określano na podłożu wg Girard i Rougieux (1967).

Jako kryterium rozkładu białka przyjęto upłynnienie żelatyny. Test na ureazę wykonywano na zmodyfikowanym podłożu wg Christensena:

glukoza — 1 g,
 NaCl — 5 g,
 KH₂PO₄ — 2 g,
 woda destylowana — 1000 ml.

Podłoże rozlewano po 10 ml do probówek, dodając po sterylizacji termicznej aseptycznie po 1 ml 20% wodnego roztworu mocznika, przesączonego przez sączek bakteriologiczny Schotta G5. Wskaźnikiem wytworzonego amoniaku był 0,1% roztwór wodny błękitu bromotymolowego; w obecności amoniaku pożywka zmieniała barwę z żółtej na niebieską.

WYNIKI I DISKUSJA

Wśród przebadanych 22 izolatów grzybów, reprezentujących 10 rodzajów (w tym 18 gatunków), 18 szczepów odznaczało się zdolnością rozkładu skrobi, 14 mocznika, 11 asparaginy, 7 białka, 6 pektyny (tab. 1); 6 szczepów wykazywało wzrost na bibule celulozowej oraz na celobiozie będącej produktem rozkładu celulozy. Pełny rozkład do glukozy ujawniono w przypadku 3 szczepów (tab. 1).

Najbardziej wszechstronną aktywność enzymatyczną wykazały następujące grzyby: izolat z ektendomikoryzy sosny MrgX oraz grzyby ektomikoryzowe *Suillus bovinus*, *Hebeloma mesophaeum*, *Amanita muscaria*, *A. verna*, *Rhizopogon luteolus*.

Wyniki te korespondują z właściwościami mikoryzogennymi tych szczepów ujawnionymi w teście mikoryzowym w czystych kulturach (Pachlewski, Pachlewska 1971, 1974).

Pewne odniesienie dla części naszych wyników może stanowić praca Palmera i HacsKaylo (1970). Wynika z niej, iż skrobia, znacznie gorsze źródło węgla niż glukoza, była jednak utylizowana przez wszystkie użyte do doświadczeń szczepy. W naszych badaniach właściwości amyliolityczne wykazywała większość gatunków.

Istniejące w literaturze dane co do możliwości wykorzystania pektyny przez grzyby mikoryzowe są dosyć kontrowersyjne — nie zostały potwierdzone przez Lyra (1960), natomiast cytowani już Palmer i HacsKaylo (1970) stwierdzili, iż pektyna była dobrym źródłem C dla 6 badanych przez nich gatunków. Autorzy ci podkreślają, że blaszka środkowa ścian komórkowych jest naturalnym siedliskiem tej grupy grzybów, stąd wytwarzanie pektynazy nie powinno być zaskakujące. Niemniej badacze ci uważają, iż substrat ten nigdy nie jest wykorzystywany przez grzyby ektomikoryzowe jako źródło węgla wewnątrz korzenia. W naszych obserwacjach aktywność w rozkładzie pektyny wykazały: szczep ektendomikoryzowy MrgX, a także grzyby ektomikoryzowe: *Amanita muscaria*, *Cenococcum graniforme*, *Suillus bovinus*, *S. luteus*.

Największą aktywność celulolityczną ujawniono u wspomnianego wyżej szczepu MrgX wyizolowanego z ektendomikoryzy sosny. Wskazywałoby to na zdolność tego grzyba do rozkładu związków będących komponentami ścian komórkowych, co tłumaczy mechanizm jego infekcji intracelularnej.

Tabela 1 — Table 1
 Aktywność enzymatyczna i celulozyjna badanych grzybów
 Enzymatic and cellulolytic activity of fungi

Gatunek Species	Nr lub symbol No. or symbol	Aktywność enzymatyczna Enzymatic activity				Aktywność celulozyjna Cellulolytic activity		
		Rozkład — Decomposition of				Wzrost na Grown on	Rozkład do glukozy (steżenie µg/ml) Decomposi- tion to glu- cose (con- centration µg/ml)	
		skrobi starch	pektyny pectin	aspara- giny aspara- gine	białka protein			mocz- nika urica
<i>Amanita citrina</i> (Schff.) S. F. Gray	0583	+	—	—	+	—	—	0
<i>A. muscaria</i> (L. ex Fr.) Hooker	0587	+	+	—	+	—	—	0
<i>A. verna</i> (Bull. ex Fr.) Pers. ex Vitt.	1/182	+	—	—	+	±	+	—
<i>Cenococcum graniforme</i> (Sow.) Ferd. et Winge	0141	+	—	—	+	+	+	3,35
	3543	+	+	—	+	+	+	0
	4931	±	+	+	+	+	+	0
	1196	—	—	—	+	+	+	1,2
<i>Coltricia perennis</i> (L. ex Fr.) Murr.	3087	+	—	+	±	+	+	—
<i>Hebeloma mesophaeum</i> (Pers. ex Fr.) Quéf.	Mrg-X	+	—	—	—	+	+	4,25
Isolat z ektendomikoryzzy sosny Isolate of ectendomycorrhiza of pine	1377	—	—	—	—	—	—	0
<i>Lactarius quietus</i> Fr.	0211	+	+	+	+	+	+	0
<i>Rhizopogon luteolus</i> Fr.	2981	+	—	—	—	+	+	0
<i>Russula emetica</i> Fr.	1941	+	±	+	—	+	±	—
<i>Suillus bovinus</i> (L. ex Fr.) O. Kunze	0164	—	—	—	—	+	+	0
<i>S. flavidus</i> (Fr.) Sing.	0166	—	—	—	—	+	+	0
<i>S. granulatus</i> (L. ex Fr.) O. Kunze	1444	±	—	—	—	+	+	0
<i>S. luteus</i> (L. ex Fr.) S. F. Gray	0112	±	—	—	—	+	+	0
	1155	—	—	—	—	+	+	0
<i>Tricholoma albobrunneum</i> (Pers. ex Fr.) Kummer	1951	+	—	—	+	—	—	0
<i>T. flavovirens</i> (Pers. ex Fr.) Lund	0349	+	—	—	+	±	±	0
<i>T. imbricatum</i> (Fr. ex Fr.) Kummer	1962	+	—	—	±	—	—	0
<i>T. pessundatum</i> (Fr.) Quéf.	2870	+	—	—	—	—	—	0

Stopień rozkładu i charakter wzrostu: ++ bardzo intensywne; + intensywne; ± słaby; — brak; 0 — nie badano.
 Degree of decomposition and of growth: ++ very intensive; + intensive; ± poor; — none; 0 — not investigated.

Spośród 6 izolatów wykazujących dobry wzrost na bibule celulozowej tylko u 3 potwierdzono testem na karboksymetylocelulozie pełny rozkład do glukozy. Nie wszystkie drobnoustroje celulolityczne dysponują kompletem egzo- i endoenzymów biorących udział w rozkładzie tego związku. Wynik naszego doświadczenia może być też w pewnej mierze związany z okresem inkubacji grzybów — przy różnym tempie rozkładu 14-dniowy period mógł okazać się zbyt krótki.

Zdolność do rozkładu mocznika akcentowana jest w wielu pracach, m. in. w monografii Harleya (1959). W naszych doświadczeniach największą aktywność pod tym względem wykazał *Rhizopogon luteolus* oraz jeden ze szczepów *Suillus luteus*; drugi szczep tego gatunku nie wytwarzał ureazy.

Dezaminacja asparaginy u większości grzybów glebowych jest zjawiskiem bardzo rozpowszechnionym. Poddane przez nas testowi szczepy grzybów mikoryzowych wykazały różne właściwości w tym zakresie — tylko połowa szczepów rozkładała ten związek z wydzielaniem amoniaku.

Stosunkowo niewiele szczepów charakteryzowało się właściwościami proteolitycznymi. Najintensywniej proces ten był prowadzony przez *Rhizopogon luteolus*. Zagadnienie zdolności do proteolizy grzybów mikoryzowych podejmowali i potwierdzali w swych badaniach cytowani już Ludeberg (1970) i Lyr (1960).

Doświadczenia nasze, jak również przytoczone prace, wskazują jednoznacznie na wielką labilność, jaka istnieje w aktywności enzymatycznej omawianej grupy grzybów. Zmienność tę z jednej strony tłumaczą różne warunki przeprowadzanych eksperymentów, z drugiej różnice szczepowe, które mogą sugerować istnienie ras fizjologicznych u gatunków z grupy grzybów mikoryzowych.

Analiza uzyskanych wyników, na przykładzie gatunków *Amanita muscaria*, *Suillus bovinus* i *Rhizopogon luteolus*, nasuwa przypuszczenie o korelacji między aktywnością mikoryzową tych szczepów a zdolnością produkowania przez nie enzymów oraz regulatorów wzrostu — auksyny (IAA) i cytokinin (Pachlewski, Pachlewska 1974) jako ważnych czynników związków mikoryzowych zarówno w ich inicjacji, jak i w późniejszych fazach fizjologicznych współżycia mikoryzowego.

WNIOSKI

1. Wysoki stopień aktywności enzymatycznej szczepów *Amanita muscaria*, *A. verna*, *Suillus bovinus* i *Rhizopogon luteolus* koresponduje z ich właściwościami mikoryzogennymi, jako grzybów o dużej aktywności ekto-mikoryzowej.

2. Analiza enzymatyczna szczepu MrgX — odznaczającego się wśród badanych grzybów największą zdolnością celulolityczną — potwierdza jego aktywność i wirulencję w infekcji ektendomikoryzowej korzeni siewek sosny w szkółkach leśnych.

3. Grzyby ektomikoryzowe posiadają silnie zróżnicowane właściwości biosyntezy enzymów, przy czym większość z nich, w warunkach przeprowadzonych doświadczeń, wykazała duże możliwości produkowania amylazy i ureazy.

4. Stanowisko ekologiczne *Coltricia perennis* znajduje potwierdzenie w jej dość znacznej zdolności do rozkładu celulozy.

5. Stosunkowo bogaty garnitur enzymatyczny grzybów mikoryzowych, a w szczególności udział w nim, u niektórych szczepów enzymów celulolitycznych pozwala sądzić o roli tych grzybów nie tylko jako o przekaźnikach substancji pokarmowych roślinie—gospodarzowi w związkach mikoryzowych, ale również o udziale w rozkładzie materiału roślinnego w glebach leśnych.

LITERATURA

- Girard H., Rougieux R., 1967, Techniques de microbiologie agricole, Paris.
- Hacsckaylo E., 1973, Carbohydrate physiology of ectomycorrhizae. [In:] Ectomycorrhizae, p. 207-230, New York, London.
- Harley J. L., 1959, Biology of mycorrhiza, London.
- Kassatkina D., 1969, Identification of various hydrolases in microorganisms on solid media, Mikrobiologia 38: 41-47.
- Lundeberg G., 1970, Utilisation of various nitrogen sources in particular bound soil nitrogen, by mycorrhizal fungi, Studia Forestalia Suecica, 79, Stockholm.
- Lyr H., 1960, Zur Frage des Streuabbaues durch ektotrophe Mykorrhizapilze, Mykorrhiza — Internationales Mykorrhizasymposium, p. 123-145, Weimar.
- Mejbaum-Katzenellenbogen W., Mochnacka I., 1968, Kurs praktyczny z biochemii, Warszawa.
- Melin E., 1953, Physiology of Mycorrhizal relations in plants, Ann. Rev. Plant Physiol. 4: 225-246.
- Pachlewski R., Pachlewska J., 1971, Badania nad grzybami mikoryzowymi siewek sosny (*Pinus silvestris* L.) w szkółkach leśnych, Prace IBL, 395: 3-66.
- Pachlewski R., Pachlewska J., 1974, Studies on symbiotic properties of mycorrhizal fungi of pine (*Pinus silvestris* L.) with the aid of the method of mycorrhizal synthesis in pure cultures on agar, Forestry Research Institute, Warsaw.
- Palmer J. G., Hacsckaylo E., 1970, Ectomycorrhizal fungi in pure culture I. Growth on single carbon sources, Physiol. Plantarum 23: 1187-1197.
- Wierbina N. M., Cycura O. I., 1969, Uskoriennyj metod otbora producentov pektolitičeskich fermentov, Mikrobiologia 38: 372-375.