

GDK 172.8+174.7 *Pinus nigra* Arn.:228.7.18:120:161.38 (497.12)

## BIOKEMIJSKE ANALIZE (API ZYM TESTI) DOMINANTNIH PARAZITSKIH IN SAPROFITSKIH GLIV IGLIC ČRNEGA BORA (*Pinus nigra* Arn.)

Maja JURC<sup>\*</sup>, Nada GOGALA<sup>\*\*</sup>

### Izveček

Prispevek obravnava uporabo nekaterih biokemijskih analiz (API ZYM testov) pri pojasnjevanju vloge petih dominantnih endofitnih gliv (*Cyclaneusma niveum* (Pers.: Fr.) DiCosmo, Peredo & Minter, *Cenangium ferruginosum* Fr., *Phialophora hoffmannii* (Beyma) Schol-Schwarz, *Cyclaneusma minus* (Butin) DiCosmo, Peredo & Minter ter *Hormonema dematioides* Lagerberg & Melin), izoliranih iz iglic črnega bora. Ugotovljena je podobnost intracelularne in ekstarcelularne encimske aktivnosti analiziranih gliv. Pri vseh glivah je ugotovljena lipolitska aktivnost. Biokemijske analize podgobja lahko le delno nakažejo, v katero prehranjevalno skupino uvrščamo glivo (parazit, šibek parazit, saprofit).

Ključne besede: endofitne glive, črni bor (*Pinus nigra* Arn.), encimi, latentna okužba, patogenost

## BIOCHEMICAL ANALYSIS (API ZYM TESTS) OF DOMINANT PATHOGENIC AND SAPROPHYTIC FUNGI OF AUSTRIAN PINE NEEDLES (*Pinus nigra* Arn.)

### Abstract

The article deals with the use of some biochemical analysis (API ZYM tests) in the explanation of the characteristics of five dominant endophytic fungi (*Cyclaneusma niveum* (Pers.: Fr.) DiCosmo, Peredo & Minter, *Cenangium ferruginosum* Fr., *Phialophora hoffmannii* (Beyma) Schol-Schwarz, *Cyclaneusma minus* (Butin) DiCosmo, Peredo & Minter and *Hormonema dematioides* Lagerberg & Melin), which were isolated from healthy needles of Austrian pine. The similarity between intracellular and extracellular enzymatic activity was established. All analysed fungi showed lipolytic activity. It is suggested that biochemical analyses of fungal mycelium only partially indicate the broad trophic group in which the fungus can be classified (parasite, weak parasite, saprophyte).

Key words: endophytic fungi, Austrian pine (*Pinus nigra* Arn.), enzymes, latent infection, pathogenicity

\* dr., dipl. ing. gozd., Gozdarski inštitut Slovenije, Večna pot 2, 1000 Ljubljana, SLO

\*\* prof., dr., dipl. biol., Biotehniška fakulteta oddelek za biologijo, Jamnikarjeva 111, 1000 Ljubljana, SLO

## VSEBINA

1	UVOD.....	37
2	PREDSTAVITEV IN OPIS OBJEKTA RAZISKAVE TER OPIS RAZISKOVALNIH METOD .....	39
3	METODE DELA.....	39
4	REZULTATI.....	41
5	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	45
6	POVZETEK.....	46
	SUMMARY .....	47
	ZAHVALA.....	48
	VIRI .....	49

## 1 UVOD

Črni bor porašča v Sloveniji več kot 20.000 ha Krasa, kjer so ga pričeli saditi in sejati na ekstremna in degradirana rastišča že pred več kot 100 leti. Naravno se pojavlja redko in na majhnih površinah.

Na Krasu se uspešno pomlajuje na opuščeni travnikih, vendar predstavljajo njegovi sestoji le prehodno obliko med travišči in grmišči in naravnim hrastovo-gabrovim gozdom. Njegova neprilagojenost rastišču se kaže v neuspešnem pomlajevanju starih sestojev, kjer v pomladku prevladujejo avtohtoni listavci pa tudi v občasni gradacijah škodljivcev in epifitocijah boleznih (ŠKULJ 1988). Pri proučevanju boleznih črnega bora na Krasu ugotavljamo splošno razširjenost sušice najmlajših borovih poganjkov (*Sphaeropsis sapinea* Dyko & Sutton), leta 1986 pa je skoraj celotni areal črnega bora na Krasu prizadela epifitocija sušice borovih vej (*Cenangium ferruginosum* Fr.) (JURC, D. 1986).

Vitalnost in zdravstveno stanje črnega bora pri nas sta glede na rastišče zelo različna. Lastnosti rastišča ne pojasnjujejo te razlike v zadostni meri, zato menimo, da je razlaga tega pojava mogoča le s širokim vpogledom v življenjsko skupnost drevesa, katere integralni del so tudi endofitne glive, ki smo jih uporabili v teh raziskavah.

V skupino endofitnih gliv (gr. *endon*: notri, notranji; gr. *phyton*: rastlina) so vključeni vsi organizmi, ki v določeni fazi svojega razvojnega cikla lahko naselijo notranja tkiva rastline brez povzročanja vidnih poškodb gostitelja (PETRINI 1986).

Pri raziskavah endofitnih gliv so pričeli uporabljati biokemijske analize v začetku osemdesetih let. Pretežno so raziskave potekale v dveh smereh: taksonomske raziskave glivnih vrst in ekofiziološke raziskave, ki so imele namen pojasniti vlogo endofitov v rastlinah.

Encimske analize so se pokazale kot uspešna metoda diferenciacije posameznih vrst gliv v podvrste, soje in tipe (SIEPMANN, ZYCHA 1968; MICALES in sod. 1986; KURTZMAN 1987; PETRINI in sod. 1990; SIEBER in sod. 1991; CHRISTENSEN in sod. 1993; LEUCHTMANN 1994; LECOURS in sod. 1994).

Glede na ugotovitve raziskav, da nekatere saprofitne glive izkoriščajo za vir ogljika več različnih snovi, vključno s celulozo in ligninom (HANKIN, ANAGNOSTAKIS 1975; CARROLL, PETRINI 1983), glivni partner v ektomikorizni mutualistični simbiozi pa kaže omejeno sposobnost dekompozicije kompleksnih substratov, so raziskovalci endofitov sklepali, da bi biokemijske raziskave endofitov lahko pomenile ključ za razlago njihovega pomena pri rastlinah.

Iglice iglavcev vsebujejo visok odstotek polisaharidov (predvsem celuloze) in lignina (MILLAR 1974). Raziskave so bile usmerjene predvsem v ugotavljanje sposobnosti endofitnih gliv, da razgradijo te in nekatere druge snovi (CARROLL, PETRINI 1983; SIEBER 1989; SIEBER-CANAVESI in sod. 1991; PETRINI in sod. 1992). Skoraj vsi analizirani endofiti kažejo lipolitsko aktivnost, ki omogoča glivi, da razkroji kutikularno voščeno plast. Splošna toleranca na galovo kislino pomeni prilagojenost endofitov na fenolne snovi, ki so ponavadi prisotne v živih iglicah. Vse glive, ki imajo lipolitsko aktivnost in so tolerantne na galovo kislino, imajo biokemijske značilnosti, povezane s penetracijo v iglice in dolgotrajno latentno rezistenco v živih iglicah.

Endofite glede na encimsko aktivnost v grobem razdelimo v dve skupini. V prvi so glive, ki lahko razgradijo celulozo. Uvrščamo jih med latentne patogene, ki so sposobne prodreti v žive rastlinske celice ali v dekompozitorje, ki naselijo odpadle iglice. V drugo skupino spadajo glive, ki imajo omejene sposobnosti razgradnje celuloze. Nekatere kažejo rahlo aktivnost razgrajevanja ksilana ali pektina ali zelo rahlo celulolitsko aktivnost. Sklepajo, da te vrste niso sposobne penetracije v žive celice.

API ZYM teste so začeli uporabljati za analize encimske aktivnosti gram-negativnih anaerobnih bakterij (HUMBLE in sod. 1977, cit. po SATYANARAYANA in sod. 1985). V osemdesetih letih so ugotovili (SATYANARAYANA in sod. 1985), da so ti testi uporabni v analizah ekstracelularnih in intracelularnih encimov nekaterih skupin gliv. Danes uporabljajo API ZYM teste za rutinske analize glivne encimske aktivnosti tudi pri raziskavah endofitov (SIEBER in sod. 1991, JAIN in sod. 1991, PETRINI in sod. 1992, HALMSCHLAGER 1993). Najnovejše raziskave rodu *Trametes* (MSWAKA 1994) kažejo, da se API ZYM testi lahko uporabijo kot taksonomska metoda za ločevanje posameznih vrst.

## 2 PREDSTAVITEV IN OPIS OBJEKTA RAZISKAVE TER OPIS RAZISKOVALNIH METOD

Vzorci iglic smo nabirali s spodnjih vej 15-60 let starih dreves črnega bora marca, junija in oktobra, od marca 1993 do januarja 1995, skupaj šest vzorčenj na osmih lokacijah (šest alohtonih rastišč : Kobjeglava /y=54 08800, x=50 75700 po Gaus-Krügerju/, Vipava /y=54 19706, x=50 78672/, Veliko Trebeljevo /y=54 80100, x=50 96250/, Benko /y=54 60450, x=50 83500/, Krnica /y=54 06250, x=50 90300/, Konjska dolina /y=54 60250, x=50 85300/; dve avtohtoni rastišči: Smolnik /y=54 34300, x=51 42100/, Dolina Krvavice /y=54 60700, x=50 84750/).

## 3 METODE DELA

### *Metoda izolacije endofitov:*

V laboratoriju smo zbrane (1-8 let stare) iglice sortirali po letnikih in iz vsakega letnega segmenta veje izbrali po štiri pare zdravih in nepoškodovanih iglic, jih 30 min. spirali pod tekočo vodo, sterilno razrezali vsako iglico na 3 mm (ali 5 mm) dolge segmente (iz baze, sredine in vrha iglice), jih površinsko sterilizirali (prilagojena metoda po BARKLUND, ROWE 1981; BERNSTEIN, CARROLL 1977; CABRAL in sod. 1993) in položili v petrijevke na hranilno podlago (sladni, ječmenov in krompirjev agar). V vsako petrijevko smo položili 12 segmentov ter jih gojili na sobni temperaturi. Če se trosišča niso oblikovala, smo glive stimulirali z uporabo črnih UV-luč (JOHNSTON, BOOTH 1983). Rast gliv iz segmentov smo nadzorovali v prvih treh tednih dnevno, v naslednjih treh mesecih pa tedensko. Po treh mesecih smo sterilne kulture shranili pri + 4°C in jih občasno nadzorovali. Identifikacijo taksonov gliv smo opravili na osnovi značilnosti laboratorijskih kultur, morfologije trosišč in trosov, če so se le-ti oblikovali.

Vse izolirane glive smo shranili kot posušene čiste kulture v Mikoteki in herbariju Gozdarskega inštituta Slovenije, ki je del Herbarija LJU. Žive kulture so shranjene v okviru iste zbirke na gojiščih pri + 4°C (JURC, M. in sod. 1994). Referenčno gradivo je shranjeno tudi v herbariju in zbirki živih kultur na International Mycological Institute, Egham, Surrey, Velika Britanija ter v Mikrobiološki zbirki Kemijskega inštituta v Ljubljani.

Podatke o izolatih gliv, ki smo jih uporabili za analize encimske aktivnosti prikazuje preglednica 1.

Preglednica 1: Izolati endofitnih gliv, uporabljenih v analizah encimske aktivnosti  
Table 1: Isolates of endophytic fungi used in analysis of enzymatic activity

Vrsta glive	Izolat v živi kolekciji GIS	Nahajališče	Substrat (iglica)	Datum vzorčenja
<i>Cyclaneusma niveum</i>	-	Vel. Trebeljevo	3 leta, srednji segment	21.6.1994
<i>Cyclaneusma minus</i>	LJUFu3-021	Smolnik	4 leta, srednji segment	7.3.1994
<i>Genangium ferruginosum</i>	-	Benko	4 leta, vršni segment	29.6.1994
<i>Phialophora hoffmannii</i>	-	Smolnik	4 leta, vršni segment	1.7.1994
<i>Hormonema dematioides</i>	LJUFu3-053	Vipava	2 leta, vršni segment	9.3.1994

#### Metoda analize intracelularnih in ekstracelularnih encimov micelijev z API ZYM testi

API ZYM test (API System S.A., La Balme les Grottes, 38390 Montalieu-Vercieu, France) je semikvantitativna metoda, ki omogoča hkratno in hitro meritev aktivnosti 19 encimov z uporabo majhnih količin ekstrakta glivnega micelija (za analize intracelularnih encimov) in glivnega eksudata (za analize ekstracelularnih encimov). Substrati so v nosilnem traku, ki omogoča stik med encimom in substratom. Vzorec ekstrakta ali eksudata vnesemo v okna nosilnih trakov, kjer reagira s substratom štiri ure pri 25°C. Encimske aktivnosti vzorca se pokažejo po dodajanju ustreznih indikatorjev.

#### Priprava in analiza glivnega vzorca

Iz rastne cone čistih kultur petih najpomembnejših endofitov smo sterilno izrezali s plutovrtom 3 mm velike inokulate, jih prenesli v epruvete  $\Phi = 9$  mm ter gojili v 15 ml tekoče hranilne podlage (5% sladni ekstrakt) 14 dni v temi pri 25°C. Vsebine epruvet smo prefiltrirali skozi filter papir Whatman No.1 in tekočo hranilno podlago uporabili za analizo ekstracelularnih encimov. Micelije gliv smo trikrat sprali z destilirano vodo (s pomočjo vodne-vakumske črpalke), jim dodali 3 ml fosfatno-solnega pufra (8g NaCl; 0,2g KCl; 1,14g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,24g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 800 ml destilirane H<sub>2</sub>O; pH = 7,4 umerjena s HCl, mešanica sterilizirana z avtoklaviranjem na 15 p.s.i. 20 min.). Glivni micelij smo macerirali

pri + 4°C v tarilnici. V vsako okno nosilnega traku smo vnesli 2 kapljici (65 µl) vzorca ter opravili analizo intracelularnih encimov po navodilih proizvajalca.

Za analizo ekstracelularnih encimov smo uporabili vzorec tekočega sladnega agarja, v katerem smo gojili micelij gliv (metoda povzeta po MSWAKA 1994, SATYANARAYANA in sod. 1985).

## 4 REZULTATI

Iz iglic smo v celotnem delovnem obdobju izolirali skupaj 99 različnih taksonov glivnih endofitov. Določili smo 56 vrst, 30 taksonov smo določili do nivoja rodu, ostalih 13 pa do višjih taksonomskih kategorij. 12 različnih izolatov je bilo sterilnih (ne glede na stimulacijo sporulacije), tako da teh vrst ni bilo mogoče določiti. Dominantne vrste, ki se pojavljajo v več kot 4% glede na vse izolate, so bile: *Cyclaneusma niveum* (Pers.: Fr.) DiCosmo, Peredo & Minter (17,2%), *Cenangium ferruginosum* Fr. (15,4%), *Phialophora hoffmannii* (Beyma) Schol-Schwarz (7,8%), *Cyclaneusma minus* (Butin) DiCosmo, Peredo & Minter (5,2%), *Lophodermium conigenum* (Brunaud) Hilitz. (4,5%) ter *Hormonema dematioides* Lagerberg & Melin (4,2%). Okuženost celotnega vzorca je bila 39% (2187 izolatov na 5592 segmentov).

### *Analiza intracelularnih encimov micelijev z API ZYM testi*

Analiza intracelularnih encimov kaže na relativno visoko stopnjo sorodnosti petih endofitnih gliv. Osem encimov (alkalna fosfataza, esteraza /C4/, esteraza-lipaza /C8/, levcin aminopeptidaza, valin aminopeptidaza, kislja fosfataza, fosfoamidaza, β-glukozidaza) vsebuje vseh pet analiziranih gliv. Štirih encimov (tripsin, himotripsin, β-glukuronidaza, α-fukozidaza) iste glive ne vsebujejo (preglednica 2).

Preglednica 2: Aktivnost intracelularnih encimov endofitnih gliv  
Table 2: Intracellular enzymatic activity of endophytic fungi

Analizirani encimi	Substrat	Intracelularna encimska aktivnost gliv				
		CF	CN	CM	PF	HD
1. Kontrola		-	-	-	-	-
2. alkalna fosfataza (EC 3.1.3.1)*	2-naftil fosfat	1	2	4	2	5
3. esteraza (C4) (EC 3.1)	2-naftil butirat	1	1	1	1	1
4. esteraza - lipaza (C8) (EC 3.1.1.3)	2-naftil kaprilat	1	1	1	1	1
5. esteraza - lipaza (C14) (EC 3.1)	2-naftil miristat	1	/	+	+	/
6. levcin aminopeptidaza (EC 3.4.11.1)	L-leucil-2-naftilamid	1	3	3	2	5
7. valin aminopeptidaza (EC 3.4)	L-valil-2-naftilamid	1	1	1	1	1
8. cistin aminopeptidaza (EC 3.4)	L-cistinil-2-naftilamid	-	-	1	-	1
9. tripsin (EC 3.4.21.4)	N-benzoil-DL-arginin-2-naftilamid	-	-	-	-	-
10. himotripsin (EC 3.4.21.1)	N-benzoil-DL-fenilalanin-2-naftilamid	-	-	-	-	-
11. kista fosfataza (EC 3.1.3.2)	2-naftil fosfat	4	2	4	3	3
12. fosfoamidaza (EC 3.9.1.1)	naftol-AS-BI-fosfodiamid	1	1	3	1	1
13. $\alpha$ -galaktozidaza (EC 3.2.1.22)	6-Br-2-naftil-aD-galaktopiranozid	-	-	1	-	1
14. $\beta$ -galaktozidaza (EC 3.2.1.23)	2-naftil-bD-galaktopiranozid	1	/	1	1	1
15. $\beta$ -glukuronidaza (EC 3.2.1.31)	naphtol-AS-BI-bD-glukuronat	-	-	-	-	-
16. $\alpha$ -glukozidaza (EC 3.2.1.20)	2-naftil-aD-glukopiranozid	-	-	1	1	2
17. $\beta$ -glukozidaza (EC 3.2.1.21)	6-Br-2-naftil-bD-glukopiranozid	1	1	1	1	1
18. $\beta$ -glukozaminidaza (EC 3.2)	1-naftil-N-acetil-bD-glukozamid	-	1	1	1	1
19. $\alpha$ -manozidaza (EC 3.2.1.24)	6-Br-2-naftil-aD-manopiranosid	-	+	1	1	1
20. $\alpha$ -fukozidaza (EC 3.2.1.51)	2-naftil-aL-fukopiranozid	-	-	-	-	-

CF-Cenangium ferruginosum; CN-Cyclaneusma niveum; CM-Cylyneusma minus; PH-Phialophora hoffmannii; HD-Hormonema dematioides

1-5 jasno razvidna reakcija (1 = 5 nanomolov, 2 = 10 nanomolov, 3 = 20 nanomolov, 4 = 30 nanomolov, 5 = 40 nanomolov hidroliziranega substrata), + komaj opazna reakcija, / dvomljiva reakcija, - ni reakcije

\*(EC 3.1.3.1) - standardne oznake v encimski nomenklaturi (Enzyme Nomenclature 1978)



### *Analiza ekstracelularnih encimov micelijev z API ZYM testi*

Analiza ekstracelularnih encimov kaže na sorodnost v encimski aktivnosti endofitov in podobnost z aktivnostjo intracelularnih encimov. Vse analizirane glive izločajo šest encimov (alkalna fosfataza, esteraza /C4/, esteraza lipaza /C8/, esteraza lipaza /C14/, kislina fosfataza, fosfoamidaza), enega pa ne izločajo ( $\beta$ -glukuronidaza) (preglednica 3). Večja encimska aktivnost kot v glivnih eksudatih je zabeležena v miceliju (preglednici 2, 3).

API ZYM testi so testi za encime iz skupine hidrolaz, ki cepijo vezi npr. amidov, estrov, glikozidov. Vključujejo teste na proteinaze (EC 3.4), ki hidrolizirajo proteine z cepitvijo peptidnih vezi; na lipaze (EC 3.1), ki hidrolizirajo maščobe (estre) s cepitvijo estrskih vezi in na glikozidaze (EC 3.2), ki hidrolizirajo glikozidne vezi škroba, glikogena, sladkorjev, celuloze, hitina, pektina, ksilana in drugih snovi (SALISBURY, ROSS 1991).

Vse analizirane glive vsebujejo esteraze intracelularno (oznake v preglednicah 2 in 3: 2,3,4,11) in ekstracelularno (2,3,4,5,11). Intracelularne aktivnosti esteraz so intenzivnejše kot ekstracelularne. Posebno je zanimiva intracelularna in ekstracelularna aktivnost nespecifične C4 esteraze (3) in C8 esteraze-lipaze (4) v vseh analiziranih endofitih.

Pri vseh analiziranih glivah so intracelularno aktivne peptidaze (6,7). Ekstracelularna aktivnost peptidaz (6,7,8,9,10) je pri analiziranih glivah redkeje ugotovljena. Zanimiva je ekstracelularna prisotnost tripsinu (9) in himotripsinu podobnih encimov (10), to pa so encimi, ki so tipični za živali.

Vse analizirane glive vsebujejo intracelularno in ekstracelularno fosfoamidazo (12), ki cepi fosforo-dušikove vezi.

Glikozidaze so prisotne posamično intracelularno (13,14,16,17,18,19) in ekstracelularno (13,14,16,17,18,19,20) v vseh analiziranih glivah. Encim  $\beta$ -glukozidaza (17) je prisoten intracelularno pri vseh analiziranih glivah, ekstracelularno pa samo pri dveh (*Cyclaneusma niveum* in *Phialophora hoffmannii*).

Preglednica 3: Aktivnost ekstracelularnih encimov endofitnih gliv  
Table 3: Extracellular enzymatic activity of endophytic fungi

Analizirani encimi	Substrat	Ekstracelularna encimska aktivnost gliv				
		CF	CN	CM	PH	HD
1. Kontrola		-	-	-	-	-
2. alkalna fosfataza (EC 3.1.3.1)*	2-naftil fosfat	1	1	1	1	1
3. esteraza (C4) (EC 3.1)	2-naftil butirat	1	1	1	1	1
4. esteraza - lipaza (C8) (EC 3.1.1.3)	2-naftil kaprilat	1	1	1	1	1
5. esteraza - lipaza (C14) (EC 3.1)	2-naftil miristat	1	1	1	1	1
6. levcin aminopeptidaza (EC 3.4.11.1)	L-leucil-2-naftilamid	1	1	1	1	-
7. valin aminopeptidaza (EC 3.4)	L-valil-2-naftilamid	1	-	1	1	-
8. cistin aminopeptidaza (EC 3.4)	L-cistinil-2-naftilamid	1	-	-	-	-
9. tripsin (EC 3.4.21.4)	N-benzoil-DL-arginin-2-naftilamid	1	1	-	-	-
10. himotripsin (EC 3.4.21.1)	N-benzoil-DL-fenilalanin-2-naftilamid	1	2	-	-	1
11. kisl. fosfataza (EC 3.1.3.2)	2-naftil fosfat	5	2	3	1	1
12. fosfoamidaza (EC 3.9.1.1)	naftol-AS-BI-fosfodiamid	5	1	3	1	1
13. $\alpha$ -galaktozidaza (EC 3.2.1.22)	6-Br-2-naftil-aD-galaktopiranozid	+	-	-	/	-
14. $\beta$ -galaktozidaza (EC 3.2.1.23)	2-naftil-bD-galaktopiranozid	2	-	-	/	1
15. $\beta$ -glukuronidaza (EC 3.2.1.31)	naphtol-AS-BI-bD-glukuronat	-	-	-	-	-
16. $\alpha$ -glukozidaza (EC 3.2.1.20)	2-naftil-aD-glukopiranozid	+	1	-	-	-
17. $\beta$ -glukozidaza (EC 3.2.1.21)	6-Br-2-naftil-bD-glukopiranozid	+	1	-	1	-
18. $\beta$ -glukozaminidaza (EC 3.2)	1-naftil-N-acetil-bD-glukozamid	+	-	/	1	1
19. $\alpha$ -manozidaza (EC 3.2.1.24)	6-Br-2-naftil-aD-manopiranosid	/	/	/	/	/
20. $\alpha$ -fukozidaza (EC 3.2.1.51)	2-naftil-aL-fukopiranozid	+	-	/	/	-

CF-Cenangium ferruginosum; CN-Cyclaneusma niveum; CM-Cyclaneusma minus; PH-Phialophora hoffmannii; HD-Hormonema dematioides

1-5 jasno razvidna reakcija (1 = 5 nanomolov, 2 = 10 nanomolov, 3 = 20 nanomolov, 4 = 30 nanomolov, 5 = 40 nanomolov hidroliziranega substrata), + komaj opazna reakcija, / dvomljiva reakcija, - ni reakcije

\*(EC 3.1.3.1) - standardne oznake v encimski nomenklaturi (Enzyme Nomenclature 1978)

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

Analiza ekstracelularnih in intracelularnih encimov kaže na sorodnost petih analiziranih endofitov, izoliranih iz iglic črnega bora. Podobna encimska aktivnost vseh petih testiranih vrst je verjetno povezana s specializiranostjo endofitnih gliv na isto ekološko nišo. Večja encimska aktivnost je zabeležena v notranjosti micelija kot v njegovem eksudatu. Posebno je zanimiva intracelularna in ekstracelularna aktivnost nespecifične C5 esteraze in C8 esteraze v vseh analiziranih endofitih. Menijo (SIEBER in sod. 1991), da so ti encimi pomembni pri prodiranju gliv v kutikularno plast povrhnjice iglic gostitelja. Sklepamo lahko, da kažejo naši izolati endofitnih gliv biokemijske lastnosti, povezane s prodiranjem v kutikularne plasti povrhnjice živih iglic in dolgotrajno naseljenostjo v živih iglicah.

Encim  $\beta$ -glukozidaza sodeluje pri razgradnji celuloze prek celobioze v glukozo (HUDSON 1986). Zanimivo je, da analizirane endofitne glive, ki živijo v navidez zdravih iglicah, vsebujejo encim, ki je značilen za saprofitne glive. HUDSON (1986) navaja tudi podatek, da trohnenje lesa ('mehka trohnoba' - oblika bele trohnobe lesa) povzročajo glive iz skupine Ascomycotina npr. *Chaetomium* in *Ceratocystis* ter glive iz skupine Deuteromycotina npr. *Alternaria* in *Phialophora*. Vrste vseh omenjenih rodov smo izolirali iz iglic kot endofitne glive, rod *Phialophora* z vrsto *Phialophora hoffmannii* pa spada v tretjo najpogosteje izolirano endofitno vrsto.

Populacija endofitov, ki naseljujejo zelene, navidez zdrave iglice, predstavlja uravnovešeno skupnost določenih vrst do trenutka, ko se spremenijo metabolne razmere v iglici (na primer staranje iglic). Starajoča se tkiva porjavelih iglic, ki so še na vejicah, naseli nova skupnost gliv, ki je sestavljena večinoma iz saprofitnih vrst. Endofitna skupnost je podvržena nenehnemu sukcesijskemu razvojnemu spreminjanju. V enem ali dveh mesecih po odpadu iglic prejšnjo skupnost popolnoma nadomesti populacija glivnih saprofitov, značilnih za opad. V iglicah torej poteka nenehno spreminjanje glivnih populacij v odvisnosti od biokemijskih in fizioloških procesov v njej. Iglice v prvi, endofitni fazi, naseljujejo nepatogene vrste ali vrste, ki so sicer opisane kot patogene, v iglici pa živijo latentno in ne kažejo patogenih lastnosti. Z analizami nekaterih biokemijskih aktivnosti (npr. encimske aktivnosti) posameznih endofitov lahko le v grobem

ugotovimo, v katero prehranjevalno skupino uvrščamo določeno vrsto (saprofit, latentni parazit, parazit).

## 6 POVZETEK

Črni bor raste pri nas na majhnih in redkih naravnih rastiščih, široko pa je razširjen kot alohtona drevesna vrsta na Krasu. Njegova vitalnost in zdravstveno stanje sta glede na rastišče zelo različna in odvisna tudi od prisotnosti parazitskih in endofitnih gliv v iglicah. Raziskovali smo endofitno glivno populacijo v iglicah črnega bora.

Vzorci iglic smo nabirali iz spodnjih vej 15-60 let starih dreves črnega bora marca, junija in oktobra, od marca 1993 do januarja 1995, skupaj šest vzorčenj na osmih lokacijah (šest alohtonih rastišč : Kobjeglava, Vipava, Veliko Trebeljevo, Benko, Krnica, Konjska dolina; dve avtohtoni rastišči: Smolnik, Dolina Krvavice).

Iz iglic smo v celotnem delovnem obdobju izolirali skupaj 99 različnih taksonov glivnih endofitov. Določili smo 56 vrst, 30 taksonov smo določili do nivoja rodu, ostalih 13 pa do višjih taksonomskih kategorij. 12 različnih izolatov je bilo sterilnih (ne glede na stimulacijo sporulacije), tako da teh vrst ni bilo mogoče določiti. Dominantne vrste, ki se pojavljajo v več kot 4% glede na vse izolate, so bile: *Cyclaneusma niveum* (Pers.: Fr.) DiCosmo, Peredo & Minter (17,2%), *Cenangium ferruginosum* Fr. (15,4%), *Phialophora hoffmannii* (Beyma) Schol-Schwarz (7,8%), *Cyclaneusma minus* (Butin) DiCosmo, Peredo & Minter (5,2%), *Lophodermium conigenum* (Brunaud) Hilitz. (4,5%) ter *Hormonema dematioides* Lagerberg & Melin (4,2%). Okuženost celotnega vzorca je bila 39% (2187 izolatov na 5592 segmentov).

V okviru raziskav biokemijskih lastnosti dominantnih gliv (*C. niveum*, *C. ferruginosum*, *P. hoffmannii*, *C. minus*, *H. dematioides*) in pojasnjevanju njihove vloge v gostitelju smo opravili nekatere biokemijske analize z pomočjo API ZYM testov (API System S.A., La Balme les Grottes, 38390 Montalieu-Vercieu, France). To je semikvantitativna metoda, ki omogoča sočasno in hitro meritev aktivnosti 19 encimov z uporabo majhnih količin ekstrakta micelija glive (za analize intracelularnih encimov) in glivnega eksudata (za analize

ekstracelularnih encimov). API ZYM testi so testi za encime iz skupine hidrolaz, ki cepijo vezi amidov, estrov in glikozidov. Ugotovljena je podobnost intracelularne in ekstarcelularne encimske aktivnosti analiziranih gliv, kar razlagamo s specializiranostjo gliv na isto habitatno nišo. Večja encimska aktivnost kot v eksudatih je zabeležena v miceliju. Pri vseh glivah je ugotovljena lipolitska encimska aktivnost, ki je pomembna za penetracijo gliv v kutikularne plasti povrhnjice iglic gostitelja. Sklepamo lahko, da kažejo endofitne glive, katere smo izolirali, biokemijske lastnosti, povezane s sposobnostjo prodiranja v kutikularne plasti povrhnjice živih iglic in dolgotrajno naseljenostjo v živih iglicah. Menimo, da biokemijske analize lahko le delno nakažejo, v katero prehranjevalno skupino uvrščamo endofitno glivo (parazit, šibek parazit, saprofit).

## SUMMARY

Austrian pine grows on small and rare natural growing sites in Slovenia. It is widely distributed as allochthonous tree species on Kras of Slovensko Primorje. Its vitality and health status are very different regarding the growing site and relate also on the presence of parasitic and endophytic fungi in needles. Research of endophytic fungi population in the needles of Austrian pine is described. Samples of needles were gathered from the lower branches of 15-60 years old Austrian pine trees in March, June and October (from March 1993 till January 1995, altogether seven samplings), on eight locations (six allochthonous growing sites: Kobjeglava, Vipava, Veliko Trebeljevo, Benko, Krnica, Konjska dolina, two autochthonous growing sites: Smolnik, Dolina Krvavice).

Altogether 99 taxa of fungal endophytes were isolated. 56 species were determined, 30 taxa were determined to the level of the genus and 13 to the higher taxonomic units. 12 isolates remained sterile (regardless the stimulation of sporulation) so that these isolates could not be determined. The dominant species which appear in more than 4% of all isolations were: *Cyclaneusma niveum* (Pers. : Fr.) DiCosmo, Peredo & Minter (17,2%), *Cenangium ferruginosum* Fr. (15,4%), *Phialophora hoffmannii* (Beyma) Schol-Schwarz (7,8%), *Cyclaneusma minus* (Butin) DiCosmo, Peredo & Minter (5,2%), *Lophodermium conigenum* (Brunaud) Hilitz. (4,5%) and *Hormonema dematioides* Lagerberg & Melin (4,2%). The whole sample was infected 39% (2187 isolations from 5592 segments).

In the frame of research of biochemical characteristics of dominant fungi (*C. niveum*, *C. ferruginosum*, *P. hoffmannii*, *C. minus*, *H. dematioides*) and in attempt to clear their role in the host some biochemical analysis were done by API ZYM tests (API System S.A., La Balme les Grottes, 38390 Montalieu-Vercieu, France). This is semiquantitative method which enables the contemporary and quick measuring of 19 enzymes by using of small quantities of mycelium extract (for analyses extracellular enzymes). API ZYM tests are the tests for enzymes from the group of hydrolases which split the links of amides, esters and glykozides. The similarity of intracellular and extracellular enzymes activities of analysed fungi was found out what can be explained by specialisation of fungi on the same habitate niche. Higher enzymatic activity as in exudates is noticed in mycelium. In all fungi the lipolytic activity was found out which is important for the penetration of fungi in the cuticular epidermis strata of host's needles. The conclusion can be that our endophytic fungi show biochemical characteristics which show the ability of fungi for penetration into cuticular epidermis strata of alive needles and longlasting colonisation of alive needles. We mean that the biochemical analysis can only partly show in which group endophytic fungus (parasite, weak parasite, saprophyte) is ranged.

## ZAHVALA

*Delo je bilo opravljeno na Oddelku za ekološke in fiziološke raziskave gliv Univerze Cranfield, Velika Britanija, pod mentorstvom dr. N. MAGANA, kateremu se najlepše zahvaljujemo. Za koristne sugestije se zahvaljujemo tudi dr. A. MSWAKA iz iste univerze.*

## VIRI

- BARKLUND, P./ROWE, J., 1981. *Gremmeniella abietina* (*Scleroderris lagerbergii*), a primary parasite in a Norway spruce die-back. Eur. J. For. Path., 11, 2, s. 97-108.
- BERNSTEIN, M.E./CARROLL, G.C., 1977. Internal fungi in old-growth Douglas fir foliage. Can. J. Bot., 55, 6, s. 644-653.
- CABRAL, D./STONE, J.K./CARROLL, G.C., 1993. The internal mycobiota of *Juncus* spp. : microscopic and cultural observations of infection patterns. Mycol. Res., 97, 3, s.367-376.
- CARROLL, G.C./PETRINI, O., 1983. Patterns of substrate utilization by some fungal endophytes from coniferous foliage. Mycologia, 75, 1, s. 53-63.
- CHRISTENSEN, M. J./LEUCHTMANN, A./ROWAN, D. D./TAPPER, B. A., 1993. Taxonomy of *Acremonium* endophytes of tall fescue (*Festuca arundinacea*), meadow fescue (*F. pratensis*) and perennial ryegrass (*Lolium perenne*). Mycol. Res., 97, 9, 1083-1092.
- JAIN, P. C./LACEY, J./STEVENS, L., 1991. Use of APY-Zym strips and 4-nitrophenyl substrates to detect and quantify hydrolytic enzymes in media and grain colonized with *Aspergillus*, *Eurotium* and *Penicillium* species. Mycol. Res., 95, 7, s. 834-842.
- JOHNSTON, A./BOOTH, C., 1983. Plant Pathologist's Pocketbook. Second Edition, Commonwealth Mycological Institute, UK, 439 s.
- JURC, D., 1986. The epiphytotic of *Cenangium ferruginosum* Fr. in Slovenia in 1986. 18th IUFRO World Congress, Ljubljana, 17-21.9.1986.
- JURC, M./BATIČ, F./JURC, D./KRAIGHER, H./SIRK, I./KRALJ, T., 1994. Mikoteka in herbarij Gozdarskega inštituta Slovenije. - Raziskovalna naloga, GIS, Ljubljana, 28 s., 64 pril.
- KURTZMAN, C.P., 1987. Impact of nucleic acid comparisons on the classification of fungi. Proc. Indian Acad. Sci. (Plant Sci.), 97, 3, s. 185-201.
- LECOURS, N./TOTI, L./SIEBER, T.N./PETRINI, O., 1994. Pectic enzyme patterns as a taxonomic tool for the characterization of *Gremmeniella* spp. isolates. Can. J. Bot., 72, s. 891-896.
- LEUCHTMANN, A., 1994. Isozyme relationships of *Acremonium* endophytes from twelve *Festuca* species. Mycol. Res., 98, 1, s. 25-33.
- HALMSCHLAGER, E., 1993. Enzymatische Tests mit Pilzkulturen. Institut für Forstentomologie, Forstpathologie und Forstschutz der Universität für Bodenkultur, Wien, 10 s. (tipkopolis).

- HANKIN, L./ANAGNOSTAKIS, S. L., 1975. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia*, 67, 3, s. 597-607.
- HUDSON, H. J., 1986. Fungal Biology. Contemporary Biology. A.J. Williams & M.A. Sleigh (Eds.), Edward Arnold, 298 s.
- MICALES, J. A./BONDE, M. R./PETERSON, G. L., 1986. The use of isozyme analysis in fungal taxonomy and genetics. *Mycotaxon*, 27, s. 405-449.
- MILLAR, C. S., 1974. Decomposition of coniferous leaf litter. Biology of plant litter decomposition. C. H. Dickinson & G. J. Pugh (eds). Academic Press, New York and London, s. 105-128.
- MSWAKA, A., 1994. Studies on *Trametes* species from the indigenous forests of Zimbabwe. PhD Thesis, Cranfield University, Biotechnology Centre, UK, s. 17-47 (tipkopsis).
- PETRINI, O., 1986. Taxonomy of endophytic fungi of aerial plant tissues. V: *Microbiology of the Phyllosphere*. N.J. Fokkema & J. van den Heuvel (eds). Cambridge University Press, Cambridge, England, s. 175-187.
- PETRINI, O./TOTI, L./PETRINI, L. E. /HEINIGER, U., 1990. *Gremmeniella abietina* and *G. laricina* in Europe : characterization and identification of isolates and laboratory strains by soluble protein electrophoresis. *Can. J. Bot.*, 68, 12, s. 2629-2635.
- PETRINI, O./SIEBER, T. N./TOTI, L./VIRET, O., 1992. Ecology, Metabolite Production, and Substrate Utilization in Endophytic Fungi. *Natural Toxins*, 1, s. 185-196.
- SALISBURY, F. B./ROSS, C. W., 1991. Plant physiology. Fourth edition, Wadsworth Publishing Company, Belmont, California, 682 s.
- SIEBER, T., 1989. Substratabbauvermögen endophytischer Pilze von Weizenkörnern. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 96, 6, s. 627-632.
- SIEBER-CANAVESI, F./PETRINI, O./SIEBER, T. N., 1991. Endophytic *Leptostroma* species on *Picea abies*, *Abies alba*, and *Abies balsamea*: a cultural, biochemical, and numerical study. *Mycologia*, 83, 1, s. 89-96.
- SIEBER, T. N./SIEBER-CANAVESI, F./DORWORTH, C. E., 1991. Endophytic fungi of red alder (*Alnus rubra*) leaves and twigs in British Columbia. *Can. J. Bot.*, 69, 2, s. 407-411.
- SIEPMANN, R./ZYCHA, H., 1968. Artdiagnose einiger holzerstörender Hymenomyzeten an Hand von Reinkulturen. *Nava Hedwigia*, 15, 2-4, s. 559-571.
- SATYANARAYANA, T./CHAVANT, L./MONTANT, C., 1985. Applicability of API ZYM for screening enzyme activity of thermophilic moulds. *Trans. Br. mycol. Soc.*, 85, 4, s. 727-730.



- ŠKULJ, M., 1988. Pomlajevanje in kalitev črnega bora (*Pinus nigra* Arn.) na slovenskem Krasu. Magistrska naloga. VTOZD za biologijo BF, Ljubljana, 139 s.
- Enzyme Nomenclature. Recommendations (1978) of Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry, Academic Press, Inc., 606 s.