

ANNA ŻÓŁCIAK, JUSTYNA BOHACZ

Ligninolityczne właściwości izolatów *Heterobasidion parviporum* w hodowli na drewnie świerka*

Ligninolytic activity of *Heterobasidion parviporum* isolates in cultivation on Norway spruce wood

ABSTRACT

Żółciak A., Bohacz J. 2016. Ligninolityczne właściwości izolatów *Heterobasidion parviporum* w hodowli na drewnie świerka. Sylwan 160 (12): 1027-1036.

The aim of this preliminary study was to assess the activity of laccase, diverse peroxidases as well as the level of micromolecular compounds in *Heterobasidion parviporum* isolates grown on pieces of Norway spruce wood (sapwood and heartwood) during 50 days of incubation under the laboratory conditions. *H. parviporum* isolates secreted extracellular enzymes: laccase, manganese peroxidase (MnP), lignin peroxidase (LiP) and versatile peroxidase (VP). Hydroxy- and methoxyphenols were also released during this process. The above-mentioned enzymes showed low activity in mycelium grown on both sapwood and heartwood. The activity of laccase ranged from 0 to 0.513 mU/mg protein on sapwood, and from 0 to 0.106 mU/mg protein – on heartwood. MnP activity of *H. parviporum* isolates ranged from 0.024 to 0.667 mU/mg protein on sapwood, and from 0.038 to 1.585 mU/mg protein – on heartwood. LiP activity was small and ranged from 0 to 1.281 mU/mg protein on sapwood, and from 0.013 to 0.166 mU/mg protein – on heartwood. Activity of VP oxidizing manganese ions was low. It ranged from 0 to 3.063 mU/mg protein on sapwood, and from 0.059 to 3.054 mU/mg protein – on heartwood. The activity of VP oxidizing guaiacol ranged from 0.006 to 1.490 mU /mg protein on sapwood and from 0.038 to 1.147 mU /mg protein – on heartwood. The hydroxyphenols produced by *H. parviporum* isolates ranged from 15.037 to 110.149 mg of protocatechuic acid/ml on sapwood, and from 11.236 to 27.220 mg of protocatechuic acid/ml – on heartwood. Methoxyphenols produced by *H. parviporum* isolates ranged from 3.393 to 24.253 mg of vanillic acid/ml on sapwood, and from 4.955 to 12.005 mg of vanillic acid/ml – on heartwood.

KEY WORDS

laccase, manganese peroxidase, lignin peroxidase, versatile peroxidase, hydroxy-, methoxyphenols, sapwood, heartwood, Norway spruce wood

ADDRESSES

Anna Żółciak ⁽¹⁾ – e-mail: A.Zolciak@ibles.waw.pl

Justyna Bohacz ⁽²⁾ – e-mail: justyna.bohacz@up.lublin.pl

⁽¹⁾ Zakład Ochrony Lasu, Instytut Badawczy Leśnictwa; Sękocin Stary, ul. Braci Leśniej 3, 05-090 Raszyn

⁽²⁾ Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie; ul. St. Leszczyńskiego 7, 20-069 Lublin

*Badania zrealizowano w ramach dotacji na naukę przyznanej przez MNiSW – projekt 240 311.

Wstęp

Huba korzeni powodowana przez grzyby rodzaju *Heterobasidion* zaliczana jest do najgroźniejszych chorób, jakie występują w drzewostanach iglastych w Europie [Woodward i in. 1998]. Choroba rozprzestrzenia się poprzez zarodniki, które w drzewostanach gospodarczych kolonizują powierzchnie świeżo ściętych pniaków (infekcja pierwotna) oraz poprzez kontakty korzeni pniaków zakażonych z korzeniami zdrowymi drzew (infekcja wtórna) [Korhonen, Stenlid 1998; Stenlid, Redfern 1998]. W polskich lasach stwierdzono występowanie trzech gatunków *Heterobasidion*: na sośnie – *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref, na świerku – *H. parviporum* Niemelä et. Korhonen i na jodle – *H. abietinum* Niemelä et. Korhonen [Żółciak 1992; Łakomy, Werner 2003; Łakomy i in. 2007]. Największe szkody są powodowane przez *H. annosum* w drzewostanach sosnowych i *H. parviporum* w drzewostanach świerkowych [Sierota 2001].

Grzyby *Heterobasidion* spp. wydzielają szereg enzymów rozkładających celulozę i pektyny w warunkach *in vitro*, m.in. celulazę [Asiegbu i in. 1998]. Stwierdzono także wydzielanie przez te gatunki lakazy i peroksydazy na różnych podłożach [Asiegbu i in. 1994; Korhonen, Stenlid 1998]. Badania nad aktywnością enzymatyczną tych ważnych dla gospodarki leśnej patogenów nie są wystarczające, szczególnie po wyróżnieniu początkowo grup intersterylnych, a następnie trzech gatunków [Korhonen 1978].

Celem badań było oznaczenie aktywności lakazy, peroksydazy manganozależnej, ligninowej i „versatile” dla izolatów *H. parviporum* w hodowli na drewnie świerka. Badano także wydzielanie fenoli w czasie degradacji ligniny przez te izolaty.

Materiał i metody

Materiał do badań stanowiły 3 izolaty *H. parviporum* (oznaczone jako Hp_1 , Hp_2 i Hp_3) pochodzące z kolekcji grzybów Instytutu Badawczego Leśnictwa. Produkcja enzymów z klasy oksydoreduktaz przez badane izolaty *H. parviporum* prowadzona była w szalkach Petriego, na 2-procentowej pożywce maltozowo-agarowej. Źródło węgla i energii dla grzybów stanowiły próbki drewna świerka (drewno bielu i drewno twardzieli) o wymiarach 0,4×0,8×4 cm wyłożone na pożywce (po pięć sztuk w szalce). Hodowle grzybów na drewnie bielu i drewnie twardzieli prowadzono przez 50 dni w temperaturze 28°C. Do ekstrakcji enzymów zastosowano wodę destylowaną, opierając się na doniesieniach Singh i in. [2003], którzy stwierdzili, że aktywne enzymy degradujące ligninocelulozę mogą być uzyskane przy zastosowaniu wody jako ekstrahenta. W tym celu rozdrobioną powierzchniową warstwę drewna bielu i twardzieli wraz z grzybnią rozcierano w wodzie destylowanej z korundem aż do uzyskania jednolitej masy, a następnie sączono przez bibułę filtracyjną Miracloth i wirowano przez 5 min przy 6000 obr./min. W otrzymanym po 10, 20, 30, 40 i 50 dniach hodowli supernatancie oznaczano aktywność enzymów oraz stężenie związków niskocząsteczkowych (w 3 powtórzeniach). Supernatant wykonywano z próbek pozyskiwanych w danych odstępach czasowych.

W przypadku enzymów jednostkę aktywności enzymatycznej definiowano jako ilość enzymu utleniającego 1 μmol substratu na minutę. Aktywność badanych enzymów wyrażono w jednostkach aktywności właściwej (mU/mg białka).

Aktywność enzymów w supernatancie oznaczano spektrofotometrycznie. Aktywność lakazy oznaczano według metody Leonowicza i Grzywnowicza [1981]. Szczegółową metodykę przedstawiono w publikacji Żółciak i in. [2008]. Aktywność peroksydazy manganozależnej (MnP) określano przez utlenianie 1 mM MnSO₄ (Mn²⁺ jako substrat) w 50 mM buforze malonowym o pH 4,5 i w obecności 0,2 mM H₂O₂, a następnie oznaczenie kompleksu Mn³⁺ – kwas malonowy

($\epsilon_{270\text{nm}}=11,59 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) zgodnie z metodyką opisaną przez Wariishiiego i in. [1992]. Aktywność peroksydazy ligninowej (LiP) określano według Tiena i Kirka [1988] wobec 20 mM alkoholu weratrylowego ($\epsilon_{310\text{nm}}=9,300 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) w 40 mM buforze winianowym pH 3,0 w obecności 0,4 mM H_2O_2 . Aktywność peroksydazy „versatile” (VP) była oznaczana według Sugano i in. [2006] poprzez utlenianie 0,25 mM gwajakolu ($\epsilon_{465\text{nm}}=12,100 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) w 0,1 M buforze winianowym o pH 2,5, w obecności 0,2 mM H_2O_2 , a także poprzez tworzenie kompleksu Mn^{3+} – kwas winowy ($\epsilon_{238\text{nm}}=6,00 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) wobec 0,1 mM MnSO_4 w 0,1 M buforze winianowym o pH 5,0 i 0,2 mM H_2O_2 .

Zawartość fenoli oznaczano według metody Leonowicza i in. [1968] w modyfikacji Malarczyk [1984]. Szczegółową metodykę przedstawiono w publikacji Żółciak i in. [2012]. Stężenie białka określano według Lowry’ego [1954] w modyfikacji Scharlete i Pollacka [1973].

W celu określenia istotności statystycznej otrzymanych wyników zastosowano nieparametryczny test Kruskala-Wallisa oraz test U Manna-Whitneya. Obliczenia wykonano za pomocą programu Statistica 10 (StatSoft, Inc.).

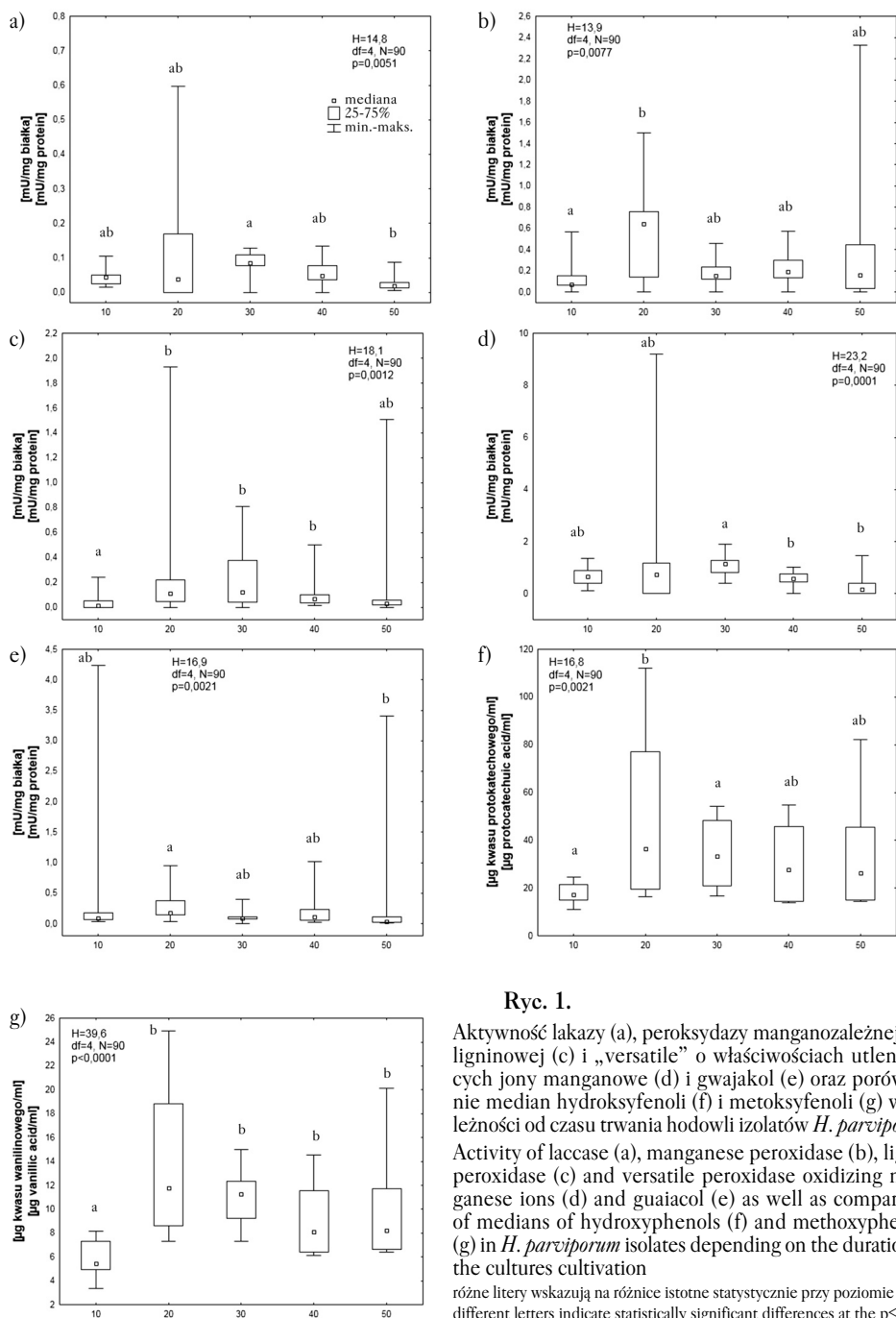
Wyniki

Izolaty *H. parviporum* charakteryzowały się nieznaczną aktywnością lakazy i to zarówno w przypadku grzybni rosnących na drewnie bielu, jak i na drewnie twardzieli. Aktywność tego enzymu kształtowała się w granicach 0-0,513 mU/mg białka w hodowli na drewnie bielu i 0-0,106 mU/mg białka na drewnie twardzieli. Stwierdzono brak aktywności lakazy w przypadku izolatu Hp_2 40. dnia hodowli na drewnie bielu oraz dla izolatu Hp_1 20. dnia na drewnie twardzieli. Izolat Hp_1 wykazał najwyższą aktywność tego enzymu na drewnie bielu (0,106 mU/mg białka) 30. dnia hodowli, natomiast Hp_3 (0,513 mU/mg białka) 20. dnia hodowli na drewnie twardzieli. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic między wartościami aktywności lakazy dla izolatów *H. parviporum*, jak również w drewnie bielu i drewnie twardzieli. Istotne statystycznie różnice między medianami aktywności lakazy stwierdzono w próbkach ocenionych 10. i 50. dnia hodowli izolatów *H. parviporum* (ryc. 1a).

Izolaty *H. parviporum* odznaczały się niską aktywnością peroksydazy manganozależnej, ligninazy i peroksydazy „versatile” (VP). Aktywność peroksydazy manganozależnej w przypadku izolatów *H. parviporum* kształtowała się w przedziale 0,024-0,667 mU/mg białka w hodowli na drewnie bielu i 0,038-1,585 mU/mg białka w hodowli na drewnie twardzieli. Najwyższą aktywność tej peroksydazy oznaczono dla izolatu Hp_3 (0,667 mU/mg białka) 20. dnia inkubacji na drewnie bielu i dla izolatu Hp_1 (1,585 mU/mg białka) 50. dnia inkubacji na drewnie twardzieli.

Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic między wartościami aktywności MnP w odniesieniu do izolatów *H. parviporum*. Różnice istotne statystycznie odnotowano między medianami aktywności MnP w drewnie bielu i drewnie twardzieli (ryc. 2a) oraz w próbkach ocenionych 10. i 20. dnia hodowli grzybni *H. parviporum* (ryc. 1b).

Aktywność ligninazy w przypadku izolatów *H. parviporum* była niewielka i kształtowała się w przedziale 0-1,281 mU/mg białka w hodowli na drewnie bielu oraz 0,013-0,166 mU/mg białka w hodowli na drewnie twardzieli. Odnotowano brak wydzielania tej peroksydazy przez izolaty Hp_1 i Hp_3 10. dnia hodowli na drewnie bielu. Aktywność LiP dla izolatów *H. parviporum* była najwyższa 20. dnia inkubacji na drewnie bielu dla Hp_2 (1,281 mU/mg białka) i na drewnie twardzieli dla Hp_3 (0,166 mU/mg białka). Nie stwierdzono różnic istotnych statystycznie między wartościami aktywności LiP w odniesieniu do izolatów *H. parviporum*. Różnice istotne statystycznie między medianami aktywności LiP stwierdzono w drewnie bielu i drewnie twardzieli (ryc. 2b) oraz w próbkach ocenionych 10. i 20., 10. i 30., 10. i 40. dnia hodowli grzybni *H. parviporum* (ryc. 1c).

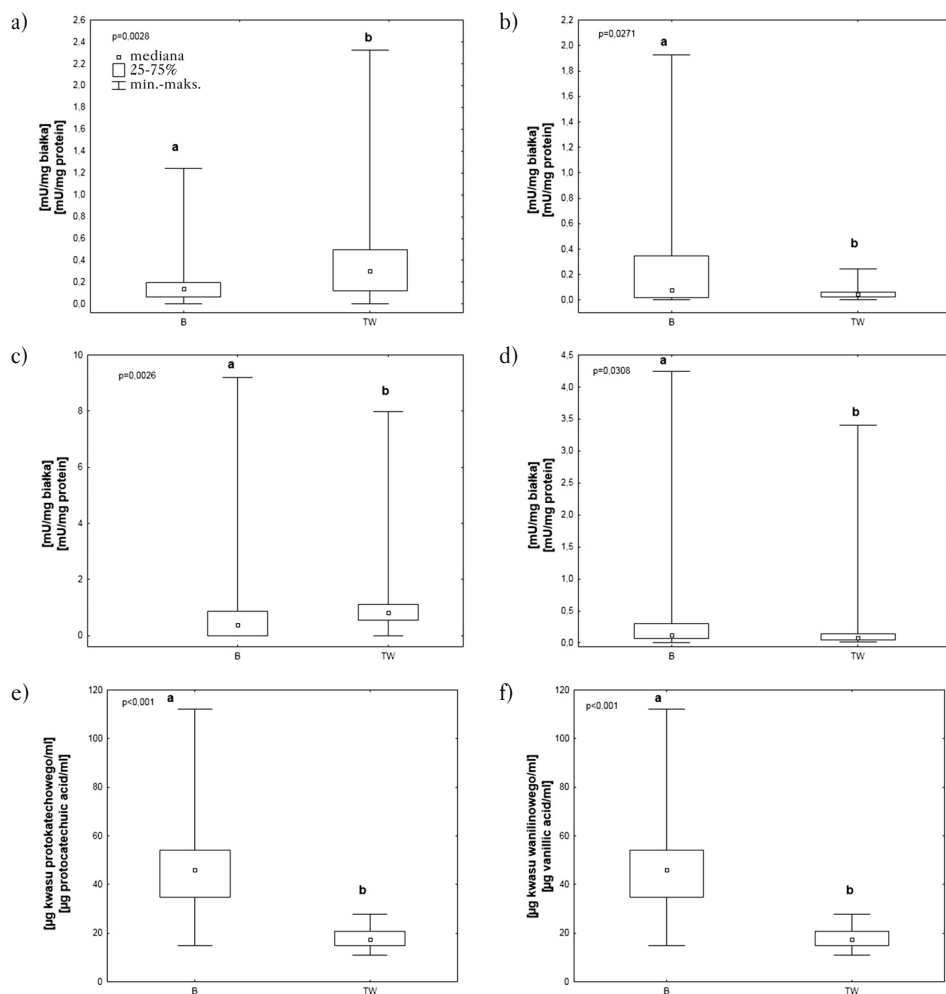


Ryc. 1.

Aktywność lakazy (a), peroksydazy manganozależnej (b), ligninowej (c) i „versatile” o właściwościach utleniających jony manganowe (d) i gwajakol (e) oraz porównanie median hydroksyfenoli (f) i metoksyfenoli (g) w zależności od czasu trwania hodowli izolatów *H. parviporum*. Activity of laccase (a), manganese peroxidase (b), lignin peroxidase (c) and versatile peroxidase oxidizing manganese ions (d) and guaiacol (e) as well as comparison of medians of hydroxyphenols (f) and methoxyphenols (g) in *H. parviporum* isolates depending on the duration of the cultures cultivation.

różne litery wskazują na różnice istotne statystycznie przy poziomie $\leq 0,05$. different letters indicate statistically significant differences at the $p \leq 0,05$.

Ekstrakty otrzymane z izolatów *H. parviporum* charakteryzowały się niewielką aktywnością peroksydazy „versatile” o właściwościach utleniających jony manganu. Kształtowała się ona w przedziale 0-3,063 mU/mg białka w hodowli na drewnie bielu i 0,059-3,054 mU/mg białka w hodowli na drewnie twardzieli. Najwyższą jej wartość odnotowano 20. dnia inkubacji na drewnie bielu



Ryc. 2.

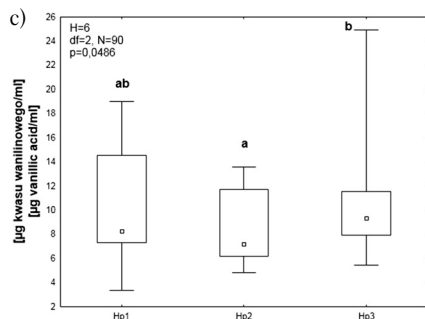
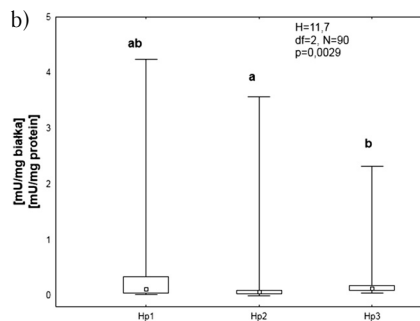
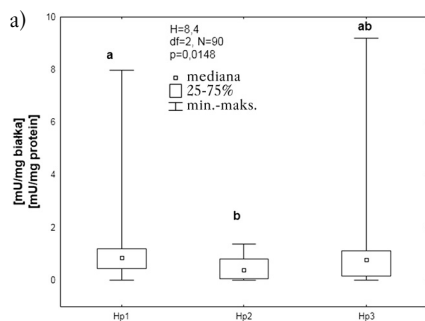
Aktywność peroksydazy manganozależnej (a), ligninowej (b) i „versatile” o właściwościach: utleniających jony manganu (c) i gwajakol (d) oraz porównanie median hydroksyfenoli (e) i metoksyfenoli (f) w hodowli izolatów *H. parviporum* w drewnie bieli (B) i drewnie twardzieli (TW)

Activity of manganese peroxidase (a), lignin peroxidase (b) and versatile peroxidase oxidizing manganese ions (c) and guaiacol (d) as well as comparison of medians of hydroxyphenols (e) and methoxyphenols (f) in cultivation of *H. parviporum* isolates on sapwood (B) and heartwood (TW)

oznaczenia jak na rycinie 1; denotes as on figure 1

dla Hp_1 (3,054 mU/mg białka) i na drewnie twardzieli dla Hp_3 (3,063 mU/mg białka). Różnice istotne statystycznie między medianami aktywności tej peroksydazy stwierdzono dla izolatów *H. parviporum*: Hp_1 i Hp_2 (ryc. 3a), w drewnie bieli i drewnie twardzieli (ryc. 2c) oraz w próbkach ocenionych 30. i 40., 30. i 50. dnia hodowli grzybni (ryc. 1d).

Wobec gwajakolu aktywność tej peroksydazy kształtowała się w przedziale 0,006-1,490 mU/mg białka w hodowli grzybni na drewnie bieli oraz 0,038-1,147 mU/mg białka na drewnie twardzieli. Najwyższą jej wartość odnotowano dla Hp_1 (1,490 mU/mg białka) 10. dnia inkubacji na drewnie bieli i dla Hp_2 (1,147 mU/mg białka) 50. dnia inkubacji na drewnie twardzieli. Istotne statystycz-



Ryc. 3.

Aktywność peroksydazy „versatile” o właściwościach utleniających jony manganu (a) i utleniających gwajakol (b) w hodowli izolatów *H. parviporum* (Hp_1 , Hp_2 , Hp_3) oraz porównanie median metoksyfenoli (c) Activity of versatile peroxidase (VP) oxidizing manganese ions (a) and oxidizing guaiacol (b) in cultivation of *H. parviporum* (Hp_1 , Hp_2 , Hp_3) isolates, and comparison of medians of methoxyphenols (c) depending on the duration of culture cultivation różne litery wskazują na różnice istotne statystycznie przy poziomie $p \leq 0,05$ different letters indicate statistically significant differences at the $p \leq 0,05$

nie różnice między wartościami aktywności tej peroksydazy stwierdzono dla izolatów Hp_2 i Hp_3 (ryc. 3b) w drewnie bieli i drewnie twardzieli (ryc. 2d) oraz w próbkach ocenionych 20. i 50. dnia hodowli grzybni (ryc. 1e).

Wartości uwalnianych hydroksyfenoli dla izolatów *H. parviporum* kształtowały się w granicach 15,037-110,149 μg kwasu protokatechowego/ml w hodowli na drewnie bieli oraz 11,236-27,777 μg kwasu protokatechowego/ml w hodowli na drewnie twardzieli. Najwyższą wartość hydroksyfenoli uzyskano w przypadku Hp_3 20. dnia inkubacji na drewnie bieli (110,149 μg kwasu protokatechowego/ml) i na drewnie twardzieli (27,777 μg kwasu protokatechowego/ml). Nie stwierdzono różnic istotnych statystycznie między wartościami hydroksyfenoli dla izolatów *H. parviporum*. Różnice istotne statystycznie między medianami hydroksyfenoli stwierdzono w drewnie bieli i drewnie twardzieli (ryc. 2e), jak również w próbkach ocenionych 10. i 20., 10. i 30. dnia hodowli grzybni *H. parviporum* (ryc. 1f).

Wartości metoksyfenoli dla izolatów *H. parviporum* kształtowały się w przedziale 3,393-24,253 μg kwasu wanilinowego/ml w hodowli na drewnie bieli i 4,955-12,005 μg kwasu wanilinowego/ml w hodowli na drewnie twardzieli. Najwyższą wartość metoksyfenoli oznaczono dla izolatu Hp_3 20. dnia inkubacji na drewnie bieli (24,253 μg kwasu wanilinowego/ml) oraz dla izolatu Hp_1 30. dnia inkubacji na drewnie twardzieli (12,005 μg kwasu wanilinowego/ml). Różnice istotne statystycznie między medianami metoksyfenoli stwierdzono dla izolatów Hp_2 i Hp_3 , w drewnie bieli i twardzieli (ryc. 2c), jak również w próbkach porównywanych po odpowiednio 10 i 20, 10 i 30, 10 i 40, 10 i 50 dniach hodowli grzybni *H. parviporum* (ryc. 1g).

Dyskusja

Aktywność lakazy stwierdzono u wszystkich badanych izolatów *H. parviporum*, jakkolwiek jej wartości były niewielkie. Baldrian [2005] podaje, że istnieje wiele taksonomicznych lub fizjo-

logicznych grup grzybów, które nie produkują dużych ilości lakazy lub których tylko nieliczni przedstawiciele produkują ten enzym. Według Karjalainena [1994] rozkład ligniny przez *H. annosum* różni się od rozkładu powodowanego przez *Phanerochaete chrysosporium* tym, że ten pierwszy wydziela lakazę. Przypuszczano, że degradacja ligniny prowadzi do akumulowania toksycznych fenoli i lakaza może być podstawowym elementem detoksykującym fenole w drewnie bielu [Haars i in. 1981; Cwielong, Hüttermann 1988]. To może wyjaśniać zdolność grzyba do przeżywania przez dłuższy czas wewnątrz tkanek drewna. Jednak w przypadku drewna świerka grzyb zasiedla drewno twardzieli. Ostatnio wykazano znacznie większą aktywność lakazy u *H. annosum* niż u *H. parviporum*. Żółciak i in. [2008] stwierdzili aktywność lakazy dla izolatu *H. annosum* i to zarówno w hodowli na próbkach drewna sosny (1482,785 U/cm³), jak i w hodowlach płynnych z odpadami ligninowymi (46,882 U/g s.m.).

W biodegradację ligniny przez grzyby białej zgnilizny drewna zaangażowane są trzy peroksydazy: manganozależna, ligninowa i „versatile” [Leonowicz i in. 2001; Martinez 2002; Ruiz-Dueñas i in. 2009]. Pierwsza pozakomórkowa peroksydaza manganozależna została wyizolowana z *P. chrysosporium*, przy czym wykazano, że jej aktywność i produkowana ilość są kontrolowane przez obecność manganu Mn(II) w podłożu. Mangan Mn(II) kontroluje transkrypcję genu peroksydazy manganozależnej, a ta z kolei jest uzależniona od wzrostu grzyba i stężenia manganu. Według Schwarze’a i in. [2000] u grzybów powodujących rozkład typu zgnilizny białej, takich jak *P. chrysosporium*, aktywność peroksydazy manganozależnej jest indukowana obecnością manganu, nadtlenku wodoru i ligniny. Hofrichter [2002] podaje, że 44 gatunki grzybów powodujące białą zgniliznę drewna produkują peroksydazę manganozależną. Są to m.in. *Armillaria mellea*, *A. ostoyae*, *Brekandera adusta*, *H. annosum*, *Hypholoma fasciculare*, *Ganoderma lucidum*, *P. chrysosporium*, *Phaeolus schweinitzii*, *Pleurotus ostreatus* i *Trametes versicolor*. Aktywność peroksydazy manganozależnej dla izolatów *H. parviporum* była niewielka.

Dla izolatów *H. parviporum* stwierdzono także niską aktywność ligninazy. Z dotychczasowych doniesień wynika, że niektóre peroksydazy manganowe, wyizolowane z grzybów *B. adusta*, *B. fumosa*, *P. eryngii*, *P. ostreatus* oraz *P. pulmonarius* i oznaczane wobec substratów aromatycznych, wykazują działanie podobne do aktywności ligninaz [Wong 2009]. Według tego autora enzymatyczna aktywność peroksydazy ligninowej może być łatwo mierzona przez wzrost absorbancji przy długości fali 310 nm w warunkach utleniania alkoholu weratrylowego (optymalnego substratu ligninazy) do aldehydu weratrylowego, jak to uczyniono w przypadku oznaczeń przeprowadzonych w niniejszych badaniach. Niższa aktywność peroksydazy ligninowej na drewnie twardzieli niż na drewnie bielu wynika z budowy chemicznej drewna. Jak podaje Surmiński [2006], grubość ścian drewna twardzieli jest dwukrotnie większa w porównaniu z drewnem normalnym.

Innym enzymem ligninolitycznym włączanym w biodegradację ligninocelulozy przez grzyby białej zgnilizny drewna jest peroksydaza „versatile”. Jest ona nie tylko specyficzna dla manganu Mn (II), jak u peroksydazy manganozależnej, ale utlenia także substraty fenolowe i niefenolowe, które są typowo utleniane przez ligninazę, a w tym takie jak alkohol weratrylowy, metoksybenzeny i modelowe związki lignin, przy braku manganu. Stąd wynika podział na peroksydazę „versatile” o właściwościach utleniających jony manganu i o właściwościach utleniających gwajakol. Aktywność peroksydazy „versatile” w hodowlach *H. parviporum* była równie niska jak aktywność ligninazy.

Według Schwarze’a i in. [2000] każdy gatunek mikroorganizmów zawiera specyficzną kombinację genów na enzymy pozakomórkowe i jest przystosowany do rozkładu specyficznych substratów. Dodatkowo ekspresja genów kodujących syntezę tych enzymów jest zazwyczaj regulowana przez dostępność określonego substratu.

U wszystkich badanych izolatów *H. parviporum* stwierdzono wzrost zawartości zarówno hydroksyfenoli, jak i metoksyfenoli w hodowli na drewnie bielu i drewnie twardej. Zdolność patogenów do utleniania fenoli wydaje się być kluczowa w skutecznej infekcji i przełamaniu aktywnych reakcji obronnych zaatakowanego drzewa, wyrażających się m.in. tworzeniem i gromadzeniem fenoli w zainfekowanych tkankach.

Podsumowanie

W niniejszych badaniach stwierdzono, że izolaty *H. parviporum* w hodowli na drewnie świerka wydzielają zewnątrzkomórkowe enzymy uczestniczące w rozkładzie kompleksu ligninocelulozowego drewna bielu i drewna twardej świerka. Stwierdzono różnice w uwalnianiu aktywnych enzymów podczas biodegradacji drewna w wybranych punktach czasowych. Podczas tego procesu uwalniane były hydroksy- i metoksyfenole.

Badania aktywności enzymatycznej zarówno patogenów, jak i saprotrofów mogą być pomocne w ograniczaniu występowania w Polsce *H. parviporum* w drzewostanach świerkowych przy stosowaniu grzyba konkurencyjnego *Phlebiopsis gigantea*, ponieważ – jak wynika z badań – drewno świerka nie jest podatne na kolonizację przez tego saprotrofa [Nicolotti i in. 1999; Westlund, Nohrstedt 2000; Berglund, Rönnerberg 2004; Żółciak 2005].

Literatura

- Asiegbu F. O., Daniel G., Jonsson L., Johansson M. 1994. Immunocytochemical localization of peroxidase in fine roots of Norway spruce infected by *Heterobasidion annosum*. W: Johansson M., Stenlid J. [red.]. Proceedings of the Eighth International Conference on Root and Butt Rots, Wik, Sweden and Haikko, Finland, 9-16 August 1993. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden. 104-115.
- Asiegbu F. O., Johansson M., Woodward S., Hüttermann A. 1998. Biochemistry of the Host-Parasite Interaction. W: Woodward S., Stenlid J., Karjalainen R., Hüttermann A. [red.]. *Heterobasidion annosum*. Biology, Ecology, Impact and Control. CAB International, London. 167-193.
- Baldrian P. 2005. Fungal laccases occurrence and properties. FEMS Microbiology Review 30: 215-242. DOI:10.1111/j.1574-4976.2005.00010.x.
- Berglund M., Rönnerberg J. 2004. Effectiveness of treatment of Norway spruce stumps with *Phlebiopsis gigantea* at different rates of coverage for the control of *Heterobasidion*. Forest Pathology 34 (4): 233.
- Cwielong P., Hüttermann A. 1988. Biochemical mechanisms of action of phenolic substances on *Heterobasidion*. Proceedings of the Seventh IUFRO Conference on Root and Butt Rots of Forest Trees. Canada, August 1987. Forestry Canada, Victoria, British Columbia, Canada. 208-225.
- Haars A., Chet I., Hüttermann A. 1981. Effect of phenolic compounds and tannin on growth and laccase activity of *Fomes annosum*. European Journal of Forest Pathology 11: 67-76.
- Hofrichter M. 2002. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). Enzyme and Microbial Technology 30: 454-466.
- Karjalainen R. 1994. Towards the molecular analysis of *Heterobasidion annosum*. W: Johansson M., Stenlid J. [red.]. Proceedings of the Eighth International Conference on Root and Butt Rots, Wik, Sweden and Haikko, Finland, 9-16 August 1993. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden. 292-302.
- Korhonen K. 1978. Intersterility groups of *Heterobasidion annosum*. Commun. Inst. Forest. Fenn. 94 (6): 1-25.
- Korhonen K., Stenlid J. 1998. Biology of *Heterobasidion annosum*. W: Woodward S., Stenlid J., Karjalainen R., Hüttermann A. [red.]. *Heterobasidion annosum*. Biology Ecology Impact and Control. CAB International, London. 43-70.
- Leonowicz A., Cho N. S., Luterek J., Wilkolazka A., Wojtas-Wasilewska M., Matuszewska A., Hofrichter M., Wesenberg D., Rogalski J. 2001. Fungal laccase: properties and activity on lignin. J. Basic. Microb. 41: 183-225.
- Leonowicz A., Grzywnowicz K. 1981. Quantitative estimation of laccase forms in some white-rot fungi using syringaldazine as a substrate. Enz. Microbiol. Technol. 3: 55-58.
- Leonowicz A., Wojtowicz B., Trojanowski J. 1968. Model experiment on the humification of rye roots. I. Phenolic products in the humification process. Polish Journal Soil Science 1: 129-136.
- Lowry O. H., Rosenbrought N. J., Forr A. L., Randel R. J. 1954. Protein measurement with Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-270.
- Łakomy P., Broda Z., Werner A. 2007. Genetic diversity of *Heterobasidion* spp. in Scots pine, Norway spruce and European silver fir stands. Acta Mycologica 42 (2): 203-210.

- Lakomy P., Werner A. 2003. Distribution of *Heterobasidion annosum* intersterility groups in Poland. Forest Pathology 33: 105-112.
- Malarczyk E. 1984. Substrate-induction of veratric acid O-demethylase in *Nocardia* sp. Acta Biochem. Polon. 31 (4): 383-395.
- Malarczyk E., Nowak G., Kochmańska-Rdest I., Zińko E., Ziąja J., Leonowicz A. 1997. The relations between the concentration of phenolics and the activity of manganese peroxidase in cultures of two species of *Pleurotus* during fruit body formation. Biological Science Symposium, Second Tappi, San Francisco, October 19-23. 391-393.
- Martínez A. 2002. Molecular biology and structure-function of lignin-degrading heme peroxidases. Enz. Microbiol. Technol. 30: 425-444.
- Matuszewska A. 2005. Wpływ mediatorów na degradację modelowych preparatów ligninowych przez *Trametes versicolor*. Rozprawa doktorska, UMCS Lublin.
- Nicolotti G., Gonthier P., Varese G. C. 1999. Effectiveness of some biocontrol and chemical treatments against *Heterobasidion annosum* on Norway spruce stumps. European Journal of Forest Pathology 29 (5): 339.
- Ruiz-Dueñas F. J., Morales M., Garcia E., Miki Y., Martínez M. J., Martínez A. T. 2009. Substrate oxidation sites in versatile peroxidase and other basidiomycetes peroxidases. J. Experimental Botany 60: 441-452.
- Scharlete G. R., Pollack R. L. 1973. A simplified method for the quantitative assay small amounts of protein in biologic material. Anal. Biochem. 51: 654-655.
- Schwarze F. W. M. R., Engels J., Mattheck C. 2000. Fungal Strategies of Wood Decay in Trees.
- Sierota Z. 2001. Choroby lasu. CILP, Warszawa.
- Singh A. D., Abdullah N., Vikineswary S. 2003. Optimization of extraction of bulk enzymes from spent mushroom compost. J. Chem. Technol. Biot. 78: 743-752.
- Stenlid J., Redfern D. B. 1998. Spread within the tree and stand. W: Woodward S., Stenlid J., Karjalainen R., Hüttermann A. [red.]. *Heterobasidion annosum*. Biology Ecology Impact and Control. CAB International, London. 125-143.
- Sugano Y., Matsushima Y., Shoda M. 2006. Complete decolorization of *antraquinone dye Reactive Blue 5* by the concerted action of two peroxidases from *Thanatephorus cucumeris*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 73: 862-871.
- Surmiński J. 2006. Zarys chemii drewna. Wyd. Akademii Rolniczej w Poznaniu.
- Tien T., Kirk K. 1988. Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. Methods in Enzymology 161: 238-249.
- Wariishi H., Valli K., Gold H. M. 1992. Manganese (II) oxidation by manganese peroxidase from the Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. J. Biol. Chem. 267: 23685-23695.
- Westlund A., Nohrstedt H.-Ö. 2000. Effects of stump-treatment substances for root-rot control on ground vegetation and soil properties in a *Picea abies* forest in Sweden. Scandinavian Journal of Forest Research 15 (5): 550-560.
- Wong D. W. S. 2009. Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes. Applied Biochemistry and Biotechnology 157: 14-209.
- Woodward S., Stenlid J., Karjalainen R., Hütterman A. 1998. *Heterobasidion annosum*. Biology, Ecology, Impact and Control. CAB International. Wallingford, UK and New York, USA.
- Żółciak A. 1992. Grupy intersteryjne *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. – identyfikacja polskich izolatów. Prace Instytutu Badawczego Leśnictwa 741: 83-90.
- Żółciak A. 2005. Wstępne wyniki inokulacji pniaków świerkowych preparatem biologicznym z zylakiem olbrzymim (*Phlebiopsis gigantea*). Leś. Pr. Bad. 4: 29-40.
- Żółciak A., Kornilowicz-Kowalska T. A., Sierota Z., Iglík H. 2008. Enzymatic activity of *Phlebiopsis gigantea* isolates. Acta Mycologica 43 (1): 41-48.
- Żółciak A., Sierota Z., Małecka M. 2012. Characterisation of some *Phlebiopsis gigantea* isolates with respect to enzymatic activity and decay of Norway spruce wood. Biocontrol Science and Technology 22 (7): 777-790.