

P. Milovidov:

Príspevek k mikroskopicko-morfologickému studiu vývoje námele (*Claviceps purpurea* [Fries] Tul.)

(Výzkumný ústav léčivých rostlin, Praha)

Úvod

Práce Tula s n e h o (1853), pojednávající o vývoji této vřekaté houby na základě anatomického rozboru, je sto let stará. I když nepřehlídíme značnou přesnost jeho údajů vzhledem k tehdejší primitivní mikroskopické metodice, nemůžeme se spokojit s prostým převzetím jeho nálezů. Proto jsme si vytkli za úkol znovu a podrobněji prostudovat na základě novější mikroskopické techniky celý vývoj této parazitické houby v žitném klasu od vníkaní konidií až po vytvoření dospělého sklerocia. Zvláštní zájem byl věnován studiu t. zv. „čepičky“, jejímu vzniku a mikroskopickému a morfologickému hodnocení. Šlo také o zjištění, zda se jedná o novotvoření sklerocia nebo o přeměnu sfacelie. Toto studium má přispět k vyjasnění poměrů, za kterých se tvoří určitá stadia námele a tím i k umožnění umělého pěstování námelových sklerocií. Mikroskopický rozbor je podmínkou dokonalého poznání vývoje houby.

Experimentální část

Používali jsme materiálu jak z polních tak i skleníkových pokusů. Pokusy byly provedeny za spolupráce Dr. K y b a l a a Dr. V a v r o u š k o v é, kterým vzdávám za to svůj dík. Byly provedeny tyto série pokusů ve skleníku: 1. očkování klasů vpichem suspense konidií (stříkačkou), 2. máčení v suspensi konidií, 3. infekce destičkami, namáčenými v suspensi konidií, 4. máčení v téže suspensi + sacharosa (1 kostka cukru v 15 ml), 5. infekce destičkami, a to suspensí konidií se sacharosou a 6. kontrolní pokus — klasy neinfikované. Koncentrace očkovací látky: 5 provozních zkumavek v 1 l vody. Z každého pokusného hrnce byly pak odebrány pro zpracování vždy 3 infikované klasy v těchto časových intervalech: 24 hod., 45 hod., 4, 17 a 20 dnů. Každá série obsahovala tedy objekty ze všech pokusů. Mimo to byla fixována dospělá sklerocia různé provenience a také čistá medovice. Tím byly dány možnosti pro sledování šíření infekce v klase od začátku klíčení až po utvoření sklerocia. Fixace objektů byla provedena jednak směsí Němcovou č. 1 (1 % vodního roztoku chromové kyseliny 100 dílů + formalinu 8 dílů), jednak směsí Carnoy (abs. lihu 6 dílů + chloroformu 3 díly + kyseliny ledové octové 1 díl). Barvení: 1. Heidenainův v železitý haematoxylin, 2. inverzní gencianová violet podle Němce, 3. safranin podle Baběse, 4. nukleální barvení — Feulgen — s dobarvováním světlou zelení nebo gencianovou violetí, 5. světlá zeleň vodní nebo lihová 1 %.

Barvení inverzní gencianovou violetí podle Němce: 1. moření ve 2 % taninu 10—60 minut, 2. oplachování ve vodě 1 minutu i více, 3. moření v 1,5 % vinnanu antimonylodraselném 5 až 15 minut, 4. důkladné vypírání ve vodě 5 minut, 5. barvení v 0,5 % vodním roztoku gencianové violeti 1 až 2 minuty — vyzkoušet! (na škrob 1 % roztok aspoň 30 minut), 6. mytí ve vodě 5 minut, 7. diferencování ve slabém lihu, 8. dehydratace, 9. terpentýn, 10. xylol, 11. kanadský balsám. Při správném provedení se jádro buněčné nebarví, barví se velmi dobře škrobová zrna, houbová vlákna, agar, částečně i cytoplazma.

Barvení safraninem podle Baběse: Roztok: dest. voda 100 dílů, anilin 2 díly, safranin do nasycení, se zahřeje na 60 °C, pak se filtruje. Barví velmi distinktně jádra buněčná, také cytoplazmu a konidie i vlákna námele. Doba barvení půl až čtyři hodiny. Rezy lze dobarvovat roztokem světlé zeleně v 96 % lihu (+ 2 kapky HCl). Pro vitální barvení konidií

a vláken byl používán slabý vodní roztok neutrální červeně, samotný nebo v kombinaci s methylenovou modří (0,05 % aa: směs R ů ž í č k o v a). Tato směs umožňuje rychlé rozlišování buněk živých (neutrální červeně barví vakuolární inkluze) a mrtvých (modře až černě: methylenová modř).

Hodnocení tinkčních metod: Železitý haematoxylin barví černofialově dobře živěná vlákna houby, konidie, jádra buněk hostitelových a pod. Velmi dobře se osvědčila metoda inverzní gencianové violeti, při níž se velmi dobře barví vlákna houby a také konidie; při moření vinanem antimonyl draselným se barví i cytoplasma, také dřevní elementy svazků cévních vynikají distinktně. Této metody jsme používali jako základní. Také světlá zeleň se osvědčila, ale barvení je slabší, vlákna se nebarví dostatečně distinktně a často jsou opticky nejasně ohraničená, dává však dobré výsledky při dobarvování jako kontrastní barvivo na př. při nukleální reakci. Anilínový safranin podle B a b e s e velmi dobře barví, na př. klíčící konidie a vlákna v semeníku. Nedostatkem této metody jsou sraženiny, jež vznikají nezřídka na preparátech, jež se však dají odstranit kyselým lihem. Velmi dobrá je nukleální F e u l g e n o v a metoda, umožňující kontrastní zbarvení jednak elementů cizopasníku, jednak buněk hostitelových (resp. jejich zbytků) a tím i stanovení, zda a do jaké míry jsou hostitelova pletiva napadena. Také konidie a pylová zrna se velmi dobře barví F e u l g e n o v o u metodou. Zdrěvnatělé elementy svazků cévních po tomto zbarvení zůstávají růžové. Mimo obvyčejné přibarvování světlou zelení používali jsme také nové kombinace nukleálního barvení s inverzní gencianovou metodou. Nejdrív se provede klasická F e u l g e n o v a reakce, potom po vyprání ve vodě se preparát vloží do taninového roztoku, dále do roztoku vinanu antimonyl draselného a konečně na krátkou dobu (asi ½ až 1 min.) do roztoku genciany; preparát nesmí být přebarven, neboť fialová barva kryje nukleální zbarvení. Výsledek: typicky červenofialová jádra a světlefialové blány a cytoplasma. Vnikání a klíčení konidií na blízce a pod. bylo dobře zachyceno právě touto metodou.

Výsledky pokusů

Otázka vnikání konidií do žitného klasu ztrácí v našem případě svůj význam, poněvadž při umělé infekci vnášíme do něho záměrně velké množství těchto útvarů. Studium barvených mikroskopických preparátů však umožňuje sledovat různá stadia, kterými prochází vývoj námele v klasu. Konidie byly konstatovány nejen na povrchu různých částí žitného klasu, nýbrž i uvnitř prašníků, trichomů, lodikulí, resp. plůšek a j. Během vývoje parazita jsou tyto konidie vždy přítomny ve velkém množství ve všech stadiích a na různých místech: na povrchu založeného sklerocia, kolem prašníku a jinde, ale zvlášť se objevují ve velkých kompaktních masách v t. zv. čepičce, kde se tvoří zvláštní hymeniální vrstva palisádových hyf produkujících konidie ve velkém množství. Cílevědomá aplikace metody inverzní gencianové violeti za vhodného diferencování umožňuje zbarvit buď celý preparát do různých odstínů fialové nebo pouze konidie, a to skoro elektivně, takže na preparátech je názorně naznačeno rozložení konidiotvorných ohnisek nebo lokalisace jednotlivých konidií, na př. v trichomech a pod. Jednotlivé konidie se dobře barví jak na řezech, tak i v náterech nejen touto metodou, nýbrž i methylenovou modří, fuchsinem, brilantkresylovou modří a j. Velmi dobře se i zde osvědčila metoda F e u l g e n o v a, kombinovaná se světlou zelení, při které se jádro barví typicky červenofialově, cytoplasma pak světlezeleně; také pylová zrna se dobře barví diferenciaciálně.

Zásadně se konidie tvoří ve sfacelií, ale byly nalezeny také případy, kdy mladé sklerociové pletivo vytvořilo na své periferii palisádové hyfy, produkující konidie (tab. XVIII., obr. 3). Tato hymeniální vrstva zde vzniká na pletivu, které je složeno ze silnějších vláken typu sklerociového, sestavených z buněk krátkých, skoro isodiametrických se silnějšími blanami. Mezi nimi jsou i tenší hyfy. Toto pletivo bychom snad mohli označit jako starší sfaceliové, ale ještě správněji jako mladé sklerociové. Na povrchu zralého sklizeného sklerocia lze proto nezřídka vidět tuto hymeniální vrstvu s konidiemi. Námel produkuje nepřehledné množství konidií, z nichž část stále klíčí v hyfy sfacelie, jiné

konidie ztrácejí barvitelnost (aspoň částečně) a tvoří kompaktní masy v čepičce, na periferii sklerocia a jinde.

Podle S a h a (1946) nekončí se sfaceliové stadium vytvořením medovice, nýbrž jeho růst pokračuje do sklizně sklerocia v šterbinách po jeho stranách nedaleko báse, kde byly pozorovány malé kapky medovice, obsahující konidie. Toto stadium označuje Saha jako sekundární sfacelie. Spory tohoto stadia se podobaly sporám primární sfacelie. Na povrchu sklerocií se v laboratorii záhy tvořil bílý povlak, skládající se pod mikroskopem hlavně z konidií a malá mycelia. Tyto konidie byly mnohem štíhlejší než z medovice. Náš náález na mikroskopických preparátech, že se sfacelie často objevuje na stranách na povrchu a v rozpuklinách sklerocia, také blíže báse, odpovídal by údajům indického badatele.

S f a c e l i e (*Sphacelia segetum* L é v.; podle T u l a s n e h o spermogonie) vzniká pouze z klíčících konidií a tvoří různě hustou spleť mycelární. Klíčící konidie byly nalezeny na povrchu buněk laloků blizny (tab. XVII., obr. 1), čnělky, semeníku, do jejichž vnitřku vysílají haustoriální vlákna. Tato vlákna mohou být demonstrována běžnými metodami v různém počtu a na různých hloubkách pletiv. Pochybujeme však, že tyto klíčící konidie jsou primárním zdrojem infekce i dalších pletiv pestíku při umělé infekci, poněvadž vlákna v semeníku jsou již často vyvinuta silněji než v blizně a čnělce. V každém případě nejsou jediným zdrojem infekce. Při masovém zavedení konidií do květu při umělé infekci množství konidií nepochybně klíčí ve stejnou dobu nebo v malých časových intervalech na mnoha místech. Nemí proto snadno stanovit, které části květu, resp. pestíku se nakazily dříve a které později. Byla na př. nalezena tato stadia: 1. blizna a čnělka infikovány klíčovými konidii, semeník však napaden silněji, 2. blizna neinfikovaná, ale báse semeníku se teprve infikuje — konidie klíčí (tab. XX., obr. 9), 3. blizna neinfikovaná, semeník silně napaden (časté stadium, tab. XX., obr. 7). Mluvílo by to spíše pro vznikání infekce především na bási semeníku, i když nevyklučuje infekci blizny. Houbová vlákna byla nalezena také na bási květu v přímé blízkosti elementů svazků cévních, ale vnikají tam, jak se zdá, pouze z květu („shora“), nikoliv z pletiva lůžka květního.

Většina autorů se shoduje v tom, že z klíčících konidií na blizně vzniká sfacelie, která obrůstá semeník a na jeho bási vniká dovnitř jeho pletiv (K ü h n, K i r c h h o f f); pletivo uvnitř semeníku je totiž často ještě intaktní, když se již na bási semeníku tvoří sfacelie. Pouze E n g e l k e (1902) předpokládá, že vlákna klíčících spor prorůstají do pletiv blizny, vodivým pletivem pestíku se dostávají k vajíčku, odkud se rozrůstají ve sfacelii. Tak vysvětluje, proč vývoj sklerocia vždy začíná na bási semeníku. Následkem mocného klíčení množství konidií se vyvíjí sfaceliové stadium houby, t. j. spleť tenkých vláken. Podle T u l a s n e h o je to houbovitá, skoro homogenní, jemná, bílá masa, která se snadno dá řezat. Klíčící konidie a začátek tvoření sfacelie byly velmi distinktně dokázány v pletivech semeníku, zvláště po barvení safraninem podle B a b è s e, kde kontrastně vynikají (červeně) na žlutém pozadí (tab. XX., obr. 9). Vlákna sfaceliového mycelia lze snadno demonstrovat na mikroskopických preparátech barvených inverzní gencianovou violetí, železitým haematoxylinem, nebo světlou zelení, a to v prašnicích, na jejich povrchu, v čnělce, semeníku, v různém stupni infekce. Tyto hyfy spolu s masami konidií a zbytky pletiv hostitelových tvoří pak hlavní část čepičky. Počet konidií se stále množí (konidiotvorní vrstvy) a tyto znovu konidie. Hymeniální vrstvy jsou obyčejně bizarně zprohýbány, vytvářejí na řezech meandrující vchlípeniny

a vychlípeniny, zevně připomínající řezy nějaké živočišné žlázy, čímž se docílí značného zvětšení povrchu těchto vrstev (sillons sinueux, cavités irrégulières, tab. XIX., obr. 6). Do těchto vychlípenin vcházejí vlákna sfacellie a tvoří jakousi oporu. Vlákna houby se rozrůstají a zabírají stále nové buňky různých orgánů květních, mohou obalovat tyčinky (tab. XVII., obr. 2), pestík, vnikají dovnitř prašníků, nezdídka je stravují a vyplňují mezery mezi tyčinkami a pestíkem atd. Je tedy čepička komplexním útvarem, jenž vzniká následkem napadení celého vnitřku květu, eventuálně lodiculí, plušek, atd. Postupně se děje vstřebávání a zničení těchto orgánů. Tento pochod lze sledovat na preparátech zbarvených inverzní gencianovou violetí, Feulgenovou metodou, kombinovanou se světlou zelení nebo i s gencianou a pod. Semeník je někdy napaden tak silně, že můžeme rozlišit jeho vnitřní partie pouze podle zbytků buněčných jader, zbarvených nukleální metodou, která prozrazuje přítomnost zbytků pletiv hostitelových.

Přítomnost sfacellie kolem semeníku není podle Tulasneho překážkou oplodnění. Často bývají zralé a správně vyvinuté obilky více méně obklopeny sfacelií. Tessier (1783, cit. podle Tulasneho) nalezl zrna žita, částečně změněná v námelové sklerocium. Tulasne také pozoroval sklerocia námele, na kterých sedělo zrno, což jsme také našli při polních pokusech. Podle tohoto autora stupeň napadení pestíku sfacelií kolísá. Obvykle houba nenapadá chlupatý vrchol semeníku a blizny, ale začíná se vyvíjet na basi tohoto orgánu a obepíná jej kolem dokola.

Napadení tyčinek, speciálně prašníků je pravidlem. Je tedy čepička složitým útvarem, vzniklým následkem silného bujení mycelia uvnitř žitného klasu, které obvykle zachvacuje tyčinky, pestík, ev. jiné části květu. Není tedy námel, jak na př. uvádí Gäumann (1946) „Modelbeispiel“ houby, která „ausschliesslich in den weiblichen Geschlechtsorganen der Gräser lebt“ (str. 98). Neběží zde o „organspezifische Besiedlung des Wirtes“, poněvadž parazit nenapadá pouze samičí orgány, nýbrž také ve velké míře a pravidelně i tyčinky (viz také Tulasne). Proti přísné specificitě námele mluví také tvoření sklerociových útvarů v stébly nebo i v kolínkách trav (Stoll und Brack 1944). Také v našem ústavě byly takové útvary na můj pokyn uměle vyvolány Dr. Kybalem, M. Černou a M. Zahálkovou a byly zjištěny i v polních pokusech. Gäumann však vysvětluje jejich vznik traumatickou infekcí spicích základů sekundárních květenství ležících pod pochvou. Tato otázka potřebuje však dalšího mikroskopického vyšetření. Pokusně však jsme dokázali možnost vzniku sklerocia v kastrovaném květu. Není tedy přítomnost pohlavních orgánů nezbytnou podmínkou vzniku sklerocia. Stavba čepičky celkem odpovídá popisu a obrázkům Tulasneho; může se měnit, ale v zásadě je stejná. Prašníky někdy bizarně vyčnívají jako růžky z dospělého sklerocia. Během vývoje lze konstatovat, že vlákna sfacellie nabývají silnějšího vzezření a během stárnutí tvoří jakýsi přechod k pletivu sklerociovému.

V kulturách námele na pevných půdách (agar + Pragomalt + kyselina citronová + K_2HPO_4) 6 až 8 dní starých, které byly přelity agarem a ponechány několik dnů růst dále, byl nalezen zvláštní druh fruktifikace, a to hroznovitě útvary, složené až ze 20 velmi dobře vyvinutých konidií na krátké stopce (sferuly) a vznikající na jedné nebo i na obou stranách na mateřském vlákně nebo i na jeho konci. Jejich počet je na jednom vlákně různý a vlákno obvykle roste dále. Toto stadium velmi připomíná odčleňování konidií v kul-

turách sfacelie námele, vypěstované Schweizerem (1939) za studené sterilace na půdě z kaše ze žitných klasů (5.—6. den, Quetschpräparat) (viz též Kirchhoff, obr. 18). Poněvadž tyto sferylky nikdy nebyly pozorovány na povrchu kultury bylo by snad možno se domnívat, že jejich vznik je určován anaerobními podmínkami. Je-li tomu tak, měli bychom tedy dva způsoby tvoření konidií, a to na povrchu (vzduch) a v pevném mediu bez přístupu vzduchu. Přesné podmínky jejich vzniku nejsou však zatím známy. Na preparátech jak trvalých tak i připravených ze živého materiálu, jsou nezřídka houbová vlákna šroubovitě stočena v různé míře. Je to zjev dost typický. Toto stočení je však velmi pravděpodobně artefaktem, vzniklým při vysychání neb vůbec při dehydrataci media (tab. XX., obr. 8).

Sklerocium. Tulasne popisuje, že sklerocium vzniká jako kompaktní tělísko na basi sfacelie a růstem postupně posunuje čepičku apikálně. Oddělování vrchole semeníku a jeho posunutí směrem nahoru jsme však také pozorovali i tehdy, když tělo vyvíjejícího se sklerocia bylo složeno ještě výhradně z pletiva sfaceliového. K této diferenciaci sfacelie dochází podle francouzského autora ještě před vylučováním medovice. Tulasne uvádí také výjimky, kdy námelové sklerocium vyrůstá docela mimo pestík (pod a vně semeníku) nebo kdy pestík se nalézá na špičce houby. Sklerocium může vzniknout také nejen v semeníku, ale i ve vajíčku nebo je uzavřeno spolu se semeníkem v perikarpu. Při pozdější infekci se vyvíjejí dílčí sklerocia spojená s částečně vyvinutou obilkou. Námel se vyvíjí vždy na basi obilky, t. j. nevyvinutá obilka (zbytek semeníku) sedí na vrchole sklerocia, jen při pozdní infekci vyrůstá jako postranní útvar při břišní stěně obilky. Také v našich seriích barvených mikroskopických preparátů jsme nalézali důkaz toho, že sklerocium může roztrhat semeník ve dvě části, takže dole zůstává sklerocium se sfaceliovým vnitřkem, nad ním pak čepička, korunovaná zbytkem horní části semeníku s trichomy.

Nám se zdá, že některá pozorovaná fakta mluví také o jiné možnosti vzniku sklerocia. Tak na př. jsme pozorovali, že ostrůvky a pruhy sklerociového pletiva se mohou tvořit uvnitř sfacelie (tab. XIX, obr. 5), v jiných případech nelze vůbec rozhodnouti, zda tu běží o starší sfaceliové nebo o mladé sklerociové pletivo. Často nemůžeme také stanovit hranici mezi pletivem tvořícím se sklerocia a sousedním pletivem sfaceliovým (tab. XVIII., obr. 4). Dále jsme našli na preparátech stadia, kde vnitřek typického sklerocia je tvořen typickými sfacelií. Sklerociový útvar může být skoro celý složen z pletiva sfaceliového, mladá sklerocia si zachovávají ještě některé rysy sfacelie (konidiotvorná vrstva a pod.). Byla dokonce nalezena sklerocia, ve kterých jsou typická sklerociová pletiva propletena sfaceliovými vlákénky. V jiných sklerociích pletiva byla v různém stupni diferenciaci, a to tak, že nejvíce diferencované pletivo bylo uloženo apikálně na hranici čepičky. Nelze vůbec pochybovat o možné přítomnosti sfaceliových elementů v dospělém sklerociu.

Všechny tyto okolnosti by svědčily ve prospěch toho, že sfaceliové pletivo může postupně přecházet v sklerociové. Tento přechod mohl by souviset se změnou výživy houby v různých obdobích růstu v hostitelské rostlině. Při vývinu sklerocia by tento pochod mohl začínat hlavně na basi semeníku a pak postupovat od periferie ke středu, takže sklerociové pletivo by postupně obalovalo střed jako pláštěm. Na druhé straně, utvořené již sklerocium roste dále skoro vždy asi tak, jak si to představoval Tulasne, t. j. jako již hotové tělísko. V tomto stadiu je hranice mezi sfacelií a sklerociem obvykle dobře

vyznačena. Zda při vývoji sklerocia jde o tyto dvě paralelní možnosti nebo o dvě postupná stadia, nebylo zatím možno rozhodnout. Podle Engelke (1902) mycelium námele má na pevných živných půdách tendenci tvořiti mikrosklerocia. Kirchhoff (1929) pozoroval, že sklerocium vzniká v nekyselých půdách kultury přeměnou pletiv sfaceliové formy. Ve sklerocium se nejdříve přetvoří okrajové buňky mycelia, uprostřed zůstávají ještě častěji sfaceliové. Dr. Kybal vypěstoval na tekutých živných půdách in vitro nepravidelné útvary, jejichž mikroskopická stavba prozrazuje jakési sklerociové pletivo pravidelně uspořádané a vzniklé ze sfaceliového mycelia. Jiné jím vypěstované útvary připomínají svou mikroskopickou strukturou stavbu čepičky (odmyslíme-li si zbytky tyčinek a pestíku), neboť se skládají ze sfaceliových hyf a velkého množství konidií. Nám se nezdá tedy být dokázán názor Tulasneho, že sklerocium vzniká pouze jako samostatný útvar na basi klásku, přikláníme se spíše k názoru, že sklerocium vzniká postupnou přeměnou sfaceliových pletiv a že tato přeměna začíná hlavně na basi semeníku, kde snad trofické podmínky jsou pro tuto přeměnu nejvhodnější (napojení na svazky cévní). Tato přeměna by se mohla v jiných případech odehrávat i na jiných místech sfacelie.

Podle Tulasneho se skládá sklerocium námele z bílého, suchého, křehkého parenchymu, z buněk kuličkovitých, polyedrických ($5-8\mu$), s blánami dost tlustými. Buňky jsou těsně spojeny a vyplněny čirým olejem, který se barví jodem jen slabě. Buňky jsou zbarveny pouze na periferii a mají navenek blány tlustší než na vnitřní straně. Tento popis celkem odpovídá tomu, co jsme našli na trvalých preparátech. Pletivo sklerocia se skládá z buněk větších a kratších než buňky sfaceliové, na periferii poněkud kompaktnějších. Krůpěje oleje dávají typické reakce tuků (osmium, alkanin, šarlachová červen, sudan III, Nílská modř). Celkem probíhají vlákna na podélném řezu tvořícího se sklerocia spíš rovnoběžně s delší osou, nezřídka vlnitě. Jeho base je obyčejně přímo napojena na systém svazků cévních v klásku, což je zvláště dobře vidět na preparátech barvených gencianovou violetí nebo po použití Feulgenovy metody. Tvořící se sklerocium není na apikálním konci zprvu přesně ohraničeno od sfaceliového pletiva, nýbrž teprve později se vytvoří viditelná hranice, někde ze žlutě zbarvených elementů. Pletivo dospělého sklerocia je dost jednotvárné a pravidelné, ale uvnitř nacházíme partie složené z buněk sfaceliových (jakési vodivé pletivo). T. zv. „kříž“, který lze vidět na příčném řezu sklerociem, skládá se z buněk sfaceliových — je to pravděpodobně ta část sfacelie, která zbývá po diferenciaci ostatní části sfacelie ve sklerocium. Také větší elementy, velmi připomínající řezy cévami vyšších rostlin, byly občas ve sklerociu nalezeny. Je tedy sklerocium útvarem nehomogenním. Diferenciace uvnitř sklerocia může dosahovat různého stupně, takže v některých sklerociích buňky vnitřního pletiva zachovávají svůj sfaceliový ráz, kdežto v jiných se blíží k typu sklerociovému. Buňky tohoto pletiva nemají totiž často ráz výslovně „sfaceliový“ — jsou poměrně krátké a nejsou rozvětvené. Jsou však užší a delší než typické sklerociové a obyčejně uspořádány těsně jako pletivo „vodivé“. Bylo by proto snad lépe mluvit o buňkách přechodného typu. Počet těchto buněk a stupeň jejich odchylky od typického sklerociového typu může být různý. Na řezech dospělým sklerociem lze někdy vidět zbytky prašníku a jiných pletiv hostitelových, uvnitř vhlípenin pletiva sklerocia, z čehož je jasno, že jeho vznik neprobíhá naprosto odděleně od vývoje sfacelie v klásku. Tvoření sklerocia předchází vždy sfaceliová

stadia a toto sfaceliové mycelium se vyvíjí velmi často po stranách i na basi mladého sklerocia, je to jakási „stavební hmota“, kterou dodávají masy klíčících konidií. Dospělé sklerocium nemá žádné zvlášť vyvinuté korové vrstvy, nýbrž pouze hnědě zbarvené a pravděpodobně odumřelé buňky, seřazené poněkud kompaktněji. Za touto hranicí zvenčí je nezřídka palisádové konidiotvorné pletivo, zbylé po sfaceli; u leukosklerocií a v bílých částech sklerocií smíšených („chiméry“) tato vrstva chybí.

Na příčných řezech sklerociem je většina sklerociových buněk rozříznuta napříč, kdežto buňky sfaceliového zbytku probíhají většinou podél. Byly nalezeny případy, kdy na příčném řezu vypadá sklerocium jako složené z několika dílčích sklerocií, obklopených sfacelií a konidiemi. Na podélném řezu to odpovídá nerovnoměrně vyvinutému sklerociu, obklopenému sfacelií, ačkoliv nelze zásadně popírat možnost vzniku několika dílčích sklerocií vedle sebe. Na některých preparátech jsme mohli konstatovat přítomnost žluté homogenní hmoty jako krupějí nebo i souvislé vrstvy na různých místech, na př. na hranicích pletiva sklerociového — je to pravděpodobně medovice. Ve fixované přírodní medovici byly běžnými metodami barvení dokázány velmi dobře vyvinuté konidie.

Diskuse

Na základě studia barvených seriových mikroskopických preparátů se dá s velkou pravděpodobností usuzovat, že se sfaceliové pletivo vlivem různých podmínek, hlavně změny výživy resp. dehydratací, může diferencovat v pletivo sklerociové. Proto se domníváme, že sklerocium námele jako celek vzniká po určité době vývoje sfacelie, když se podmínky (blíže neznámé) mění a jsou dány předpoklady pro vznik trvalého pletiva sklerociového. Jako důkaz možnosti přeměny pletiva sfaceliového v pletiva sklerociová lze uvést mikroskopické nálezy, a to místa přechodu mezi pletivem sfacelie a sklerocia, pletiva přechodného typu, která nelze kvalifikovat ani jako typická sklerociová, ani typická sfaceliová, dále nález inklusí pletiv typu sklerociového v myceliu sfaceliovém, a to i v čepičce (tedy i mimo tvořící se sklerocium). Mimo to byly konstatovány případy, kdy mladé sklerocium vytváří na periferii palisádovou hymeniální konidiotvornou vrstvu, obdobně jako typická sfacelie. I dospělé sklerocium obaluje zpravidla zbytky sfaceliového pletiva, nebo bývá sklerociové pletivo propleteno sfacelií.

Může tedy i sfacelium i mladé sklerocium vytvářet konidie. Na druhé straně praxe ukazuje, že při pěstování (rozočkování) částí dospělého sklerocia na živných půdách vždy z tohoto sklerociového pletiva vyrůstá sfaceliové mycelium; je to však také možné proto, že uvnitř sklerocia jsou zachovalé sfaceliové buňky. Může tedy i pletivo sklerociové přecházet za vhodných podmínek ve sfaceliové.

Tyto okolnosti odůvodňují předpoklad, že po zjištění podmínek, za kterých se tyto změny odehrávají, bude možno docílit umělého pěstování sklerocií nebo vůbec sklerociových útvarů a pletiv, *in vitro*.

Mikroskopické nálezy vyvracejí názor, že námel je typickým příkladem přísně specifického usídlení na určitém orgánu a že napadá pouze samičí pohlavní orgány žita. Histologický rozbor jasně dokazuje, že, na příklad, tyčinky jsou soustavně pojímány do tvořícího se komplexu čepičky.

1. Konidie, uměle vnesené do klasu ve velkém množství, rychle klíčí a dávají vznik vláknům sfacelie, která napadají nejen pestík, ale i tyčinky, eventuálně lodiculi, resp. plušky. Jak konidie tak i klíčící konidie a z nich vyrostlé hyfy mycelia lze snadno dokázat mikroskopicky na povrchu i uvnitř blizny, čnělky, semeníku, prašníku, trichomů a jinde.
2. Sfaceliové mycelium napadá pletiva pestíku a tyčinky, tvoří hustou spleť hyf a zpravidla meandrující hymeniální vrstvu, produkující ohromné množství konidií. Masa sfacelie spolu s napadenými orgány hostitele tvoří tak zv. „čepičku“, jež je tedy útvarem komplexním, v jehož nitru lze nezdědká dokázat zbytky pletiv hostitele. Ve sfaceliovém pletivu čepičky se mohou tvořit ostrůvky buněk sklerociového typu.
3. Sklerocium vzniká pravděpodobně postupnou přeměnou sfaceliového pletiva, hlavně na basi semeníku. Jeho base je napojena na cévní svazky hostitelovy. Ve prospěch uvedeného názoru svědčí zjištěná fakta, že: a) ve sfaceliovém myceliu se mohou tvořit partie sklerociových buněk, b) mezi sklerociovým a sfaceliovým pletivem nezdědká není určité viditelné hranice, c) na periferii mladého sklerocia se může vytvořit konidiotvorná vrstva jako u typické sfacelie, d) typické sklerocium pokročilého typu obsahuje nezdědká sfaceliový vnitřek; i dospělá sklizená sklerocia zpravidla obsahují sfaceliové elementy, e) útvary sklerociového tvaru mohou být složeny výhradně ze sfaceliového mycelia, f) byla nalezena pletiva přechodného typu.
4. Lze tedy usuzovat, že se může sfaceliové pletivo za určitých podmínek, zatím blíže neznámých, diferencovat ve sklerociové a vice versa (klíčení sklerocia).
5. Sfaceliová (někdy i mladá sklerociová) pletiva mohou produkovat za přirozených podmínek konidie a to obvykle tak, že vytvoří palisádovou hymeniální vrstvu.
6. Z konidií vždy vyklíčí pouze sfaceliové mycelium.
7. Sklerocium je nehomogenní útvar, složený z pletiv sklerociových a sfaceliových.
8. Byl vyvrácen názor, že námel napadá výhradně samičí pohlavní orgány žita. Histologicky bylo dokázáno, že také tyčinky a jiné části květu jsou houbou soustavně napadány.

1. Engelke, C. (1902): Neue Beobachtungen über die Vegetations-Formen des Mutterkornpilzes *Claviceps purpurea* Tulasne. Hedwigia 41, 221—222.
2. Gäumann, E. (1946): Pflanzliche Infektionslehre. Birkhauser, Basel, 611 S.
3. Kirchhoff, H. (1929): Beiträge zur Biologie und Physiologie des Mutterkorns. Zentralbl. f. Bakt. (II. Abt.) 77, 310.
4. Kühn, J. (1859): Die Krankheiten der Kulturgetreide. Berlin.
5. Kühn, J. (1863): Untersuchungen über die Entwicklung und das künstliche Hervorrufen nebst Verhütung des Mutterkorns. Mitt. a. d. Physiol. Lab. u. Versuchst. d. Ladw. Inst. Univ. Halle. I. Heft.
6. Saha, J. (1946): Sphacelial stage in the life-history of *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul. Nature (London) 158, 881—882.
7. Schweizer, G. (1939): Über die Kultur von *Claviceps purpurea* (Tul.) auf kaltsterilisierten Nährboden, Phytopatol. Zeitschr. 13, 317—350.
8. Stoll, A. und A. Brack (1944): Ber. Schweiz. Bot. Ges. 54, 252—254. Cit. Gäumann.
9. Tessier (1783): Traité des maladies des grains. Cit. Tulasne.
10. Tulasne, L. (1853): Mémoire sur l'ergot des glumacées. Annales d. Sci. Nat. Paris. Partie botan. (3. série) vol. 20, 5—56, pl. I—IV. Note préliminaire: C. R. Acad. Sci. Paris (1851), 33, 645.

Vysvětlení obrázků na tabulkách XVII—XX.

Veškeré fotografie pořízeny s planar-okularem Leitz 8, objektivem 5 a fotokomorou Makam. Zvětšení všude (mimo obr. 9) 220×. — Foto L. Suchá a Dr. M. Nováček (č. 9).

Obr. 1. Klíčení konidií na lalocích blizny a vnikání vláken houby do buněk. Nukleální reakce, dobarveno gencianovou violetí.

Obr. 2. Pronikání vláken námele do prašníků, degenerace pylových zrn. Heidenhainův železitý haematoxylin.

Obr. 3. Hymeniální vrstva, vzniklá na periferii mladého sklerociového pletiva. Barveno inverzní gencianovou violetí.

Obr. 4. Hranice mezi vyvíjejícím se sklerociem (dole) a sfacelií není diferencována. Na periferii (vlevo) je hymeniální vrstva s konidiemi, pod ní sfacelie. Barveno inverzní gencianovou violetí.

Obr. 5. Inkluse sklerociového pletiva ve sfacelii (čepička). Vedle jsou degenerované prašníky a konidie (vpravo). Barveno inverzní gencianovou violetí.

Obr. 6. Meandrující hymeniální vrstvy s konidiemi v čepičce. Barveno inverzní gencianovou violetí.

Obr. 7. Base semeníku, silně napadená parazitem, vlákna jsou také v dutině degenerovaného vajíčka. Barveno inverzní gencianovou violetí.

Obr. 8. Stočená vlákna houby se sferulami v agaru. Barveno neutrální červení. Ruční řez.

Obr. 9. Klíčící konidie v semeníku a plušce. Barveno anilin-safraninem podle Babèse. Zvětšení 60×.

К микроскопическо-морфологическому изучению развития спорыньи
(*Claviceps purpurea* [Fries] Tul.)

При искусственном заражении колосьев ржи суспензией конидий спорыньи (*Claviceps purpurea* [Fries] Tul.) конидии прорастают (табл. XVII., 1), образуя густой мицелий («сфацилия»), гифы которого поражают пестик (табл. XX., 7, 9), тычинки, а иногда и другие части цветка. Сфацилия, образующая в своем гимениальном слое (табл. XVIII., 4; табл. XIX., 6) огромное количество конидий, проникает также внутрь клеток растения-хозяина и постепенно разрушает и использует их содержимое, превращаясь в сложное образование (т. наз. «колпачек»), сидящее на вырастающем склероции и в котором можно микроскопически доказать остатки тканей ржи (табл. XVII., 2).

Склероций образуется из сфацилии путем превращения ее клеток в склероциевую ткань; это превращение начинается обыкновенно у основания завязи, однако не исключено, что оно происходит и в других местах. В пользу этого говорят следующие микроскопические наблюдения:

1) В сфацилии могут возникать «очаги», т. е. группы склероциевых клеток (табл. XIX., 5);

2) ткани сфацилии и склероция нередко постепенно переходят друг в друга без резкой границы (табл. XVIII., 4);

3) на периферии молодого склероция наблюдается иногда, как и у типической сфацилии, гимениальный слой, образующий конидии (табл. XVIII., 3);

4) типичный зрелый склероций, как правило, содержит элементы сфацилии;

5) были найдены склероциевидные образования, почти целиком состоящие из сфацилиевых элементов.

Таким образом при некоторых, ближе неизвестных условиях клетки сфацилии могут превращаться в склероциевые и наоборот (например, при прорастании склероция на искусственных питательных средах). Склероций представляет собой, т. о. неоднородное образование, состоящее из тканей как склероциевых, так и сфацилиевых.

Из конидий вырастает только сфацилиевая ткань, мицелий, образующая вновь конидии в гимениальном слое.

Было опровергнуто мнение, что спорынья является типическим примером строго специфического паразита, поражающего исключительно пестик. Микроскопические наблюдения доказывают, что спорынья поражает, как правило, и тычинки, а иногда и другие части растения.

P. Milovidov:

Beitrag zum mikroskopisch-morphologischen Studium der Mutterkornentwicklung (*Claviceps purpurea* [Fries] Tul.)

Bei der künstlichen Infektion der Roggenähren mit der Suspension der Mutterkorn-Konidien (*Claviceps purpurea* [Fries] Tul.) keimen die Konidien hindurch und bilden ein dichtes Myzel (Sphazelium), dessen Hyphen das Pistil, die Antheren, zuweilen auch andere Blütenteile befallen. Das Sphazelium-Myzel, das an seinen Hyphenenden eine Unmenge von Konidien bildet, dringt auch in die inneren Zellen dieser Organe des Wirtes, zerstört und nutzt ihr Inhalt aus, sich in ein zusammengesetztes Gebilde verwandelnd (sog. Mützechen), das an dem wachsenden Sklerotium sitzt und in dem die Reste der Wirtsgewebe mikroskopisch bewiesen werden können. (Tab. XVII., 1, 2; Tab. XVIII., 4; Tab. XIX., 6; Tab. XX., 7, 9).

Das Sklerotium entwickelt sich aus dem Sphazelium-Myzel durch die allmähliche Umwandlung seiner Zellen in sklerotisches Gewebe; diese Umwandlung beginnt gewöhnlich auf der Basis des Fruchtknotens an, es ist aber nicht ausgeschlossen, dass dieser Vorgang auch an anderen Stellen vor sich gehen kann. Zugunsten solcher Bildungsart des Sklerotiums sprechen folgende mikroskopische Beobachtungen:

a) Im Innern des Sphazelium-Myzels können sich „Herde“ der sklerotischen Zellen bilden (Tab. XIX., 5);

b) Zwischen dem Sklerotium- und Sphazeliumgewebe kann man zuweilen keine Grenze zu sehen; (Tab. XVIII., 4);

c) An der Peripherie des jungen Sklerotiums kann man zuweilen einen hymenialen konidienbildenden Schicht zu unterscheiden, wie es für das typische Sphazelium der Fall ist; (Tab. XVIII., 3);

d) Das typische reife Sklerotium enthält in der Regel auch Sphazelium-Elemente;

e) Die sklerotiumähnliche Gebilde können fast ausschliesslich aus den Sphazeliumzellen gebaut werden.

Das Sklerotium ist demgemäss ein nicht homogenes Gebilde, das aus beiden Zelltypen (d. h. Sklerotium- und Sphazeliumzellen) besteht.

Aus den Konidien keimt immer nur das Sphazelium-Myzel aus, das von neuem Konidien abschnührt.

Die Sphazeliengewebe können bei einigen, näher nicht bekannten Bedingungen, in die sklerotische sich umwandeln und vice versa (z. B. bei der Auskeimung des Sklerotiums in den künstlichen Medien).

Der Ansicht, dass der Mutterkornpilz ein Modelbeispiel des Pilzes ist, der ausschliesslich in dem weiblichen Geschlechtsorgan der Gräser lebt, wurde widerlegt. Gegen die strenge Organspezifizität des Mutterkornspilzes sprechen die mikroskopischen Beobachtungen, dass dieser Pilz in der Regel auch Antheren, bzw. andere Blütenteile (auch Stengelzellen) befällt.







