

V. Brejcha a J. Kybal:

Faktory ovlivňující obsah alkaloidů ve sklerociích *Claviceps purpurea*.

(Z Výzkumného ústavu léčivých rostlin, Praha 1, Jilská 16.)

Propracovaná agrotechnická pravidla umělého pěstování námele zaručují dnes již dosti spolehlivě průměrné výnosy cca 40—50 kg sklerocií/ha. Tím je kryta potřeba farmaceutického průmyslu při rentabilním pěstování pro JZD a ČSSS.

Hospodářským předpokladem dalšího rozvoje pěstování námele je snížení produkční i překupnické ceny a snížení rozlohy žitných porostů, očkovaných pro účely námelové produkce. Cestou k tomu je zvyšování hektarových výnosů a zvyšování obsahu alkaloidů ve sklerociích.

Úkolem této práce je probrati faktory, ovlivňující obsah alkaloidů ve sklerociích námele. Vyšší obsah alkaloidů umožňuje též jejich snadnější a levnější průmyslové zpracování.

Vliv váhy sklerocií na obsah alkaloidů

Autoři, pojednávající o této korelaci, se shodují v tom, že obsah alkaloidů stoupá se vzrůstající vahou sklerocií. Tak na př. Blažek, Böswart, Horák a Kybal (3) dokázali u vzorku analysovaného žitného námele ergotaminové rasy, že se stoupající vahou sklerocií stoupá i obsah alkaloidů a to zvláště nápadně v nejnižších váhových třídách. Blažek a Böswart (2) dokázali stejnou pozitivní korelaci pro sklerocia ergotoxinové rasy *Claviceps purpurea*, parasitující na trávě *Phragmites communis* Trin. a *Baldingera arundinacea* (L.) Dumort. Domníváme se, že souhlas mezi těmito výsledky nás opravňuje k vyslovení domněnky o existenci určitých stejných příčin, ovlivňujících jak velikost sklerocií, tak zároveň i obsah alkaloidů. Za tyto příčiny jsou považovány kvantitativní případně i kvalitativní rozdílnosti výživy.

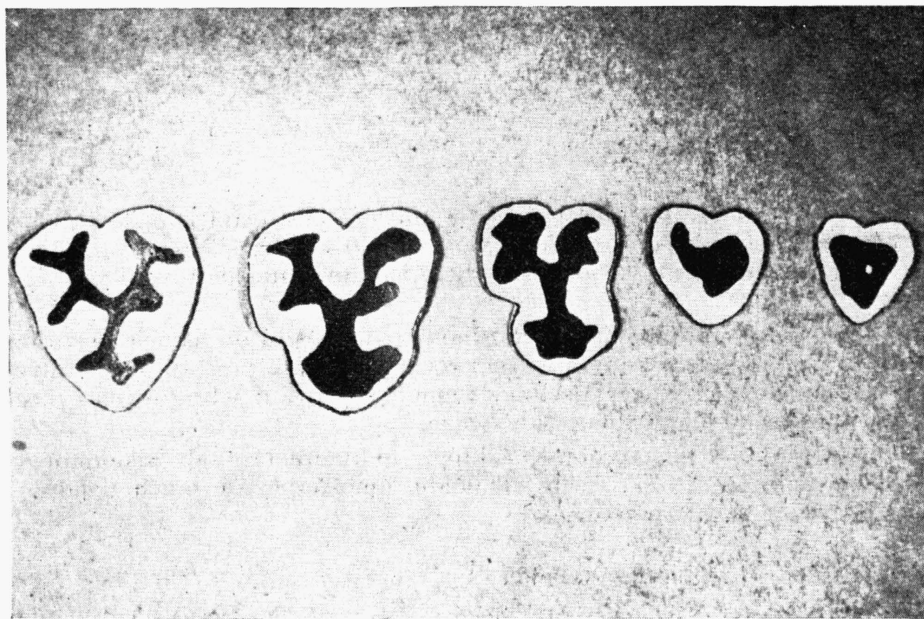
Sfaceliové pletivo ve sklerociu

Je známo, že na příčném průřezu sklerociem jeví se nepravidelné obrazce, popisované jako „kříž“. Po přesném mikroskopickém zhodnocení a proměření buněk, skládajících „kříž“, jsme zjistili, že jde o buňky charakteru sfacelie, odlišné od sklerociových (viz též Milovidov [10]). Velikost sfaceliových buněk je průměrně $1,8 \mu$, kdežto průměrná velikost okolních sklerociových buněk je 9μ .

„Kříž“ se nejvíce jeví jako pravidelný útvar, naopak projevuje se odlišně u různých sklerocií; zato v jednotlivém sklerociu průběhem od apikální části

k basální nabývá větší členitosti a bohatšího rozvětvení, jeho kresba je však užší. Všecky výběžky „kříže“ se sbíhají uprostřed v podélné ose sklerocia, takže „kříž“ tvoří souvislý, ničím nepřerušovaný celek (obr. 1).

Podrobný popis „kříže“ podáváme z toho důvodu, že je třeba upozorniti na souvislost mezi ním a mezi obsahem alkaloidů ve sklerociích. Č a p k o v á et al. (5) dokázali, že v povrchových částech sklerocia je vyšší obsah alkaloidů,



Obr. 1. Průměty příčných průřezů sklerociem od basální k apikální části.

než ve vnitřních. Většina autorů se shoduje v tom, že sfacelie alkaloidů netvoří. Důkazem toho je nepřítomnost alkaloidů v t. zv. „čepičce“, složené výhradně ze sfaceliového pletiva, jak dokázal B l a ž e k se spolupracovníky (3). Rovněž mladá sklerocia, v nichž převládá sfaceliální mycelium nad sklerociálním, neobsahují alkaloidy (5). Přijmeme-li toto tvrzení za správné, máme uspokojivý výklad pro rozmístění alkaloidů ve sklerociu. Periferní části sklerocia obsahují poměrně více vlastního sklerociového plektenchymu a proto i více alkaloidů, nežli vnitřní části, v nichž se sbíhají jednotlivé výběžky „kříže“ a kde tedy převládá sfaceliové pletivo.

Jak jsme dále prokázali, připadá ve velkých sklerociích větší podíl na sklerociový plektenchym s obsahem alkaloidů, než na sfaceliové pletivo „kříže“ (tab. 1).

(V tabulce uvedené hodnoty byly získány tak, že 10 malých a 10 velkých sklerocií bylo jednotlivě prováženo na torsních vahách; z každého sklerocia byl pak z prostředka vyříznut příčný řez o síle cca 1 mm a uložen přes noc do zředěného roztoku genciánové violeti. Takto obarvené řezy byly montovány na podložní sklíčka, promítnuty epidiaskopem na kladívkový papír a zakresleny obrysy řezu i probarveného „kříže“. Vystříháním byl pak „kříž“ oddělen od

ostatní části průmětu řezu a obě části byly provázeny na analytických vahách.)

Tabulka 1. Vztah mezi vahou sklerocia a velikostí „kříže“

Velká sklerocia				
	váha sklerocia v g	váha celého průmětu průřezu v g	váha průmětu kříže v g	% kříže
	0,322	0,0534	0,0161	23,16
	0,338	0,0485	0,0160	24,80
	0,259	0,0504	0,0125	19,85
	0,313	0,0578	0,0161	21,78
	0,374	0,0501	0,0128	20,34
	0,305	0,0481	0,0144	23,04
	0,416	0,0552	0,0173	23,86
	0,325	0,0578	0,0189	24,64
	0,395	0,0576	0,0231	28,62
	0,263	0,0564	0,0138	19,65
Σ	3,310	0,5353	0,1610	234,45
Ø	0,331	0,0535	0,0161	23,45
malá sklerocia				
	0,044	0,0124	0,0041	24,84
	0,028	0,0097	0,0035	26,51
	0,029	0,0081	0,0035	30,17
	0,036	0,0096	0,0031	24,40
	0,029	0,0071	0,0038	34,86
	0,035	0,0108	0,0036	25,00
	0,028	0,0084	0,0027	24,32
	0,029	0,0083	0,0041	33,06
	0,030	0,0066	0,0037	35,92
	0,020	0,0087	0,0050	36,49
Σ	0,308	0,0897	0,0371	292,57
Ø	0,031	0,00897	0,0037	29,25

Tím je zároveň vysvětlen vyšší obsah alkaloidů ve větších sklerociích. Při zpracovávání většího počtu stejně těžkých sklerocií se ukázalo, že konfigurace „kříže“ je variabilně proměnná. Tím je podle našeho mínění umožněna variabilita obsahu alkaloidů v různých sklerociích téhož typu a téže lokality. Ponecháváme otevřenou otázku, na jakých faktorech závisí utváření „kříže“. V každém případě je však možno se domnívati, že funkce „kříže“ je obdobná funkci cévních svazků u vyšších rostlin a že během růstu sklerocia dorůstá na basální části spolu se sklerociem i sfaceliální „kříž“. O větší permeabilitě sfaceliového pletiva je možno se přesvědčiti velmi jednoduchým pokusem; stačí vložit na několik hodin příčně nařezané kousky sklerocia do roztoku genciánové violeti. Po seříznutí řezné plochy je „kříž“ probarven intenzivně fialově, zatím co sklerociový pletenchym zůstává bílý.

Stadium vývoje žita a sekundární infekce

Do jaké míry se uplatňují změny ve výživě houby na intensitu biosynthesy alkaloidů, mohli jsme sledovat pokusem s umělou infekcí žita v různých stadiích vývoje. R e b e r a M a c V i c a r (12) sledovali kolísání obsahu aminokyselin v žitných rostlinách v průběhu různých vegetačních fází a zjistili, že klesá po ukončeném odnožování, během metání začíná opět stoupat a vrcholí v době mléčné zralosti. My jsme sledovali kolísání obsahu alkaloidů ve sklerociích, vyrostlých v kvítku žitného klasu v různých fázích vývoje žitné rostliny tak, že jsme námelem uměle infikovali žitné klasy v době před metáním, na počátku metání, na počátku květu, v plném květu a po odkvětu. Tímto pokusem jsme zjistili, že sklerocia, vyrostlá z kvítků infikovaných v pozdější vývojové fázi žitné rostliny obsahovala více alkaloidů, než sklerocia, jež se vytvořila a uzrála ve fázi ranější (tab. 2).

Považujeme-li aminokyseliny za prvotní praekursory alkaloidů, respektive za jejich stavební materiál, zdají se tím být tato námi experimentálně zjištěná data vysvětlena.

Zároveň jsme na několika lokalitách sledovali rozdíly v obsahu alkaloidů ve sklerociích vyrostlých z klasů, očkovaných na počátku metání (běžná pěstitelská praxe) a ve sklerociích ze sekundární infekce, samovolně probíhající v době květu (vyvíjejících se tedy v pozdější vývojové fázi hostitelské rostliny). Také výsledky těchto analýs potvrdily předchozí závěry. (Tab. 3.)

Tabulka 2. Analýsy provedl metodou Čsl. 2 Mr Pavel H o r á k z VÚLR Praha

Infekce provedena ve stadiu	Obsah alkaloidů v % sušiny
Před metáním žita	0,160
Na počátku metání	0,179
Na počátku květu	0,241
V plném květu	0,272
Po odkvětu	0,281

Tabulka 3

Analýsy provedl metodou Čsl. 2 Mr Pavel H o r á k z VÚLR Praha

Lokalita	Obsah alkaloidů v % sušiny sklerocií z	
	primární infekce	sekundární infekce
Mělník	0,202	0,243
Větrušice	0,168	0,183
Lysá n/L. I.	0,190	0,198
Lysá n/L. II.	0,192	0,210
Praha-Hadovka	0,179	0,241

Vliv hostitelské rostliny — výživa

Rozdílné obsahy alkaloidů ve sklerociích vyrostlých planě na různých hostitelích jsou dalším důkazem toho, že výživa je nejdůležitějším faktorem, ovlivňujícím intensitu biosynthesy námelových alkaloidů. Do tabulky 4 jsme vybrali některé význačné příklady.

Z tabulky se dá vyvozovat, že největší množství alkaloidů produkuje houba na trávě *Molinia coerulea* Moench., zatím co na *Phragmites communis* Trin. a *Lolium perenne* L., vzniká alkaloidů méně. Přesto však i zde je obsah alkaloidů vyšší, než je tomu v případech běžně pěstovaného žitného námele, jehož obsahy se pohybují kolem 0,2 %. Tyto rozdíly považujeme za důsledek rozdílné výživy (dusíkaté), jež je k dispozici námeli na různých hostitelích.

Tabulka 4

Hostitel	Obsah alkaloidů v % sušiny	Autor
<i>Molinia coerulea</i> Moench	0,90	Blažek, Böswart (1)
<i>Molinia coerulea</i> Moench	0,810	Hartwich (7)
<i>Molinia coerulea</i> Moench	0,550	Rochelmeyer (14)
<i>Phragmites communis</i> Trin.	0,437	Blažek, Böswart (2)
<i>Phragmites communis</i> Trin.	0,313	Rochelmeyer (7)
<i>Phragmites communis</i> Trin.	0,250	M. a W. Hecht (8)
<i>Lolium perenne</i> L.	0,290	Bredemann (4)
<i>Lolium perenne</i> L.	0,220	Rochelmeyer (14)
<i>Lolium perenne</i> L.	0,290	Dim - Zajec (6)
<i>Lolium perenne</i> L.	0,330	Rybář a spol. (15)

Tabulka 5.

Analysy provedl metodou Čsl. 2 Mr. Pavel Horák z VÚLR Praha

Hostitel	Obsah alkaloidů v % sušiny
<i>Molinia coerulea</i> Moench	1,01
<i>Phragmites communis</i> Trin.	0,456
<i>Lolium perenne</i> L.	0,330

Naproti tomu M. a W. Hecht (8) tvrdí, že jejich dosavadní zkušenosti nepotvrzují žádný vliv hostitelské rostliny na obsah alkaloidů ve sklerociích. Abychom si zjednali jasno v této otázce, provedli jsme přeočkování planě rostoucího námele travního na žito. K tomu účelu jsme vybrali sklerocia, nalezená na trávě *Molinia coerulea* Moench, vyznačující se extrémně vysokým obsahem alkaloidů, sklerocia z *Phragmites communis* Trin. rovněž s vysokým obsahem alkaloidů a běžně se vyskytující námel z *Lolium perenne* L. Obsahy alkaloidů, nalezené v těchto sklerociích jsou uvedeny v tabulce 5.

Ze sklerocií jsme vypěstovali konidiotvorné mycelium, metodou podle K i r c h h o f f a (9). Rozetřením tohoto mycelia s vodou jsme získali suspensi konidií a tou jsme uměle vpichem naočkovali žito. Ve všech třech případech vyrostla na žitě sklerocia, svým vzhledem zcela normální. Výsledky analys těchto sklerocií jsou uvedeny v tabulce 6. Tento pokus nám tedy znovu potvrdil domněnku, že výživa je hlavním faktorem, ovlivňujícím ve značném rozmezí obsah alkaloidů ve sklerociích námele. Vysoký obsah alkaloidů u sklerocií z bezkolence se dá velmi dobře vysvětlit vysokým obsahem dusíku v sušině této trávy. Zcela jasně se o tom převědíme, doplníme-li tabulku 5 údaji o obsahu bílkovin v uvedených hostitelích a to v době, kdy na nich námel vyrůstá, t. j. v době květu až po odkvětu (tab. 7).

Tabulka 6.

Analysy provedl metodou Čsl. 2 Mr. Pavel H o r á k z VÚLR Praha

Původní hostitel	Obsah alkaloidů ve sklerociích ze žita v % sušiny
<i>Molinia</i>	0,287
<i>Phragmites</i>	0,236
<i>Lolium</i>	0,266

Tabulka 7

Hodnoty uvedené v tabulce podle V. R e g á l a (13)

Hostitel	% bílkovin v sušině	
	v květu	po odkvětu
<i>Molinia</i>	12,9	11,0
<i>Phragmites</i>	6,7	5,8
<i>Lolium</i>	7,6	4,1

Z tabulky je vidět, že *Molinia*, na níž vyrostla sklerocia s nejvyšším obsahem alkaloidů, obsahuje zhruba dvojnásobné množství bílkovin, než jilek nebo rákos.

Problematika kmenů *Claviceps purpurea* T u l.

Z předešlých úvah vyplývá, že obsah alkaloidů v námeli kolísá ve velmi širokém rozmezí. Z toho důvodu pokládáme za odvážné tvrzení Silbera a Bischoffa (16), kteří se domnívají, že prokázali existenci kmenů, schopných syntetisovat větší či menší množství alkaloidů.

Dosavadní výzkum nepotvrzuje, podle našeho mínění, zcela jasně existenci kmenů námele, schopných syntetisovat větší či menší množství alkaloidů. Naopak bylo nutno přikročit k izolaci monosporických kultur, aby bylo možno

rozhodnout tuto otázku s konečnou platností. Sklerocium nemusí totiž vždy vyrůstati z jediné ascospory nebo konidie, což celou problematiku značně komplikuje. Podařilo se nám to prokázat vypěstováním dvoubarevných chimér, když jsme uměle očkovali žito směsí konidií z leukosklerocií a pigmentovaných sklerocií (obr. 2).

Teoreticky se tedy nevylučuje možnost existence kmenů. Skutečnost, že sklerocia sklizená z bezkolence, která obsahovala průměrně 1,01 % alkaloidů v sušině, poskytla po přeočkování na žito sklerocia s obsahem alkaloidů obvyklým sklerociím ze žita (tab. 6) zcela průkazně dokumentuje, že tvorba alkaloidů je prvotřídní otázkou výživy a jde-li o kmeny, může být jejich vliv v mnohých případech překryt vlivy jinými.



Obr. 2. Uměle vypěstované dvoubarevné chiméry.

Souhrn

1. Existuje pozitivní korelace mezi vahou sklerocií *Claviceps purpurea* Tul. a úhrnným obsahem alkaloidů. To je způsobeno tím, že hodnota podílu sklerociového plektenchymu ke sfaceliiovému myceliu t. zv. kříže je u velkých sklerocií větší, než u sklerocií malých.

2. Výše obsahu alkaloidů sklerocií *Claviceps purpurea* Tul. závisí ve značné míře na intenzitě dusíkaté výživy rostoucího sklerocia, jež je dána hostitelskou rostlinou.

3. Intensita biosythesy alkaloidů ve sklerociích je v širokém rozmezí ovlivňována mnoha různými faktory. Existují-li kmeny *Claviceps purpurea* Tul., schopné syntetisovat větší nebo menší množství alkaloidů, může být jejich vliv těmito faktory překrýván.

Literatura

- (1) Blažek, Z., Böswart, J. (1953): Qualitative und quantitative Bestimmung der Alkaloide des auf der Gräsergattung *Molinia* vorkommenden Mutterkorns. *Die Pharmazie*, 8: 851—853 (1953).
- (2) Blažek, Z., Böswart, J.: Über die Alkaloide des auf *Phragmites communis* und *Baldin-gera arundinacea* vorkommenden Mutterkorns. *Die Pharmazie* 8: 1051—1053 (1953).

- (3) Blažek, Z., Böswart, J., Horák, P. Kybal, J.: Über die Menge und Verteilung der Alkaloide im Sklerotium von „*Claviceps purpurea*“ (Fries) Tul. Die Pharmazie 8 : 592—595 (1953).
- (4) Bredemann, G.: Mykolog. Zentralbl. 1 : 359—364 (1912).
- (5) Čapková, J., Dykyj-Sajfertová, D., Křečlová, J., Kybal, J., Toman, M.: Nový názor na pěstování námelu *Claviceps purpurea* Tul. v kultuře in vitro. Československá farmacie 1 : 145—178 (1952).
- (6) Dim-Zajec, V., Mastak, A.: Die Erzeugung von Mutterkorn (*Claviceps purpurea* T.) in Kroatien. Farm. Glas. 7 : 44—51 (1951).
- (7) Hartwich: Das Mutterkorn von *Molinia*. Schweiz. Wochenschr. (1895).
- (8) Hecht, M., Hecht, W.: Über den Gehalt von Mutterkorn auf verschiedenen Wirtspflanzen. *Sciencia Pharmaceutica*, 22 : 23—31 (1954).
- (9) Kirchhoff, H.: Beiträge zur Biologie und Physiologie des Mutterkornpilzes. Zentralbl. f. Bakteriologie, 77 : 340—367 (1929).
- (10) Milovidov, P.: Příspěvek k mikroskopicko-morfologickému studiu vývoje námelu (*Claviceps purpurea* (Fries) Tul.). *Preslia* 26 : 415—426 (1954).
- (11) Mothes, K.: Fragen der Mutterkornengewinnung in der DDR (Sitzungsbericht). Die Pharmazie 6 (1951).
- (12) Reber, E., Mc Vicar, R.: The Nitrogen Composition of Cereal Grasses. III. Amino Acid Distribution in Field Clippings and Growing Plants. *Agronomy Journal* 45 : 17—21 (1953).
- (13) Regal, V.: Pícní a plevelné trávy. Státní zemědělské nakladatelství, Praha (1953).
- (14) Rochelmeyer, H. Die Pharmazie 4 : 326—333 (1949).
- (15) Rybář, D., Šmíd, M., Oulehla, B., Böswart, J.: Identifikace a fotometrické stanovení alkaloidů z jílku ozimého. Českosl. farm. 2 : 5—8 (1953).
- (16) Silber, A., Bischoff, W.: Die Konstanz des Alkaloidgehaltes bei verschiedenen Rassen von Mutterkorn. Die Pharmazie 9 : 46—61 (1954).

В. Брейха и И. Кибал :

Факторы, влияющие на содержание алкалоидов в склероциях спорыньи *Claviceps purpurea* Tul.

1) Существует положительная корреляция между весом склероция спорыньи (*Claviceps purpurea* Tul.) и общим содержанием в нем алкалоидов. Это объясняется тем, что величина отношения плектенхимы склероция к мицелию сфацелии т. наз. «креста» в крупных склероциях больше, чем в малых.

2) Содержание алкалоидов в склероциях спорыньи зависит в значительной степени от интенсивности азотистого питания растущего склероция, которая определяется растением-хозяином.

3) На интенсивность биосинтеза алкалоидов в склероциях в значительной мере влияет множество разных факторов. Если существуют разные штаммы спорыньи, способные синтезировать большее или меньшее количество алкалоидов, то влияние штаммов может быть маскировано этими факторами.

V. Brejcha, J. Kybal.

Factors influencing alkaloids-content in sclerotia of *Claviceps purpurea* Tul.

1. A positive correlation exists between weights of sclerotia *Claviceps purpurea* and the whole alkaloids-content. It is caused by the fact that in large-sized sclerotia a higher value of the relationship between sclerotia-plectenchyme and sphacelia-mycelium (of the so called: "cross-figure") has been found than that of the small-sized sclerotia.

2. The amount of alkaloids in sclerotia *Claviceps purpurea* depends by large manner upon the intensity of nitrogen supply of the growing sclerotia as furnished by the host plant.

3. Many various factors are able to influence the intensity of the alkaloid-biosynthesis within sclerotia. These factors can overhaepe—however—the influence of strains *Claviceps purpurea* upon synthetizing larger or smaller alkaloids-quantities if such strains exist.