

ANTONIO TONOLO

Alcuni aspetti morfologici del genere *Claviceps* Tul.
in relazione alla produzione di alcaloidi
in colture artificiali (*)

Prof. MOTHES! Dr. GRÖGER! Cari Colleghi! Signore e Signori!

Ringrazio sentitamente il Prof. MOTHES per le sue gentili parole e per il graditissimo invito a visitare l'Istituto di Biochimica Vegetale e l'antica e famosa Martin-Luther Universität. È sempre un grande piacere, infatti, avere l'opportunità di conoscere personalmente gli scienziati che lavorano nello stesso campo di ricerca, e discutere, con sentita amicizia e profonda stima, i vari problemi ed i risultati raggiunti nel nostro appassionato lavoro.

1) INTRODUZIONE

Il Prof. E.B. CHAIN (*) ed io abbiamo rivolto, in questi ultimi anni, le nostre ricerche micologiche verso due precise direzioni:

1) studiare le relazioni esistenti tra la forma di un determinato organismo e le sue caratteristiche biochimiche, interpretando le relazioni esistenti tra forma e funzione;

2) trovare eventuali correlazioni tra posizione sistematica di una data specie o genere e la produzione di specifici metaboliti.

Queste due direttrici di lavoro hanno trovato una pratica applicazione nella risoluzione dei vari problemi inerenti alla produzione di alcaloidi in colture artificiali, che impegnano da circa otto anni una gran parte del nostro Laboratorio.

(*) Memoria presentata dall'Accademico DOMENICO MAROTTA.
Conferenza tenuta all'Istituto di Botanica della Martin-Luther Universität di Halle (Saale)
il 25 marzo 1964.

II) SU ALCUNI ASPETTI MORFOLOGICI DEL GENERE *Claviceps* Tul.

1. Sulla formazione degli sclerozi nel fiore

È ben noto che in natura il genere *Claviceps* Tul., come mise in evidenza il mio grande e compianto maestro, il Prof. E. GAUMANN (2), è un parassita specifico degli organi fiorali delle graminacee. Esso ha in natura un ciclo biologico ben determinato, che inizia con l'infezione primaria dei fiori da parte delle ascospore. Si formano successivamente i conidi, che propagano l'infezione ad altre piante, mentre lo stadio finale è rappresentato dallo sclerozio, organo di conservazione, a strut-



FIG. 1. - Sclerozio di *Claviceps paspali* in germinazione. Si notino il peduncolo (p) e lo sferidio (s).

tura ben definita, costituito da cellule isodiametriche, ripiene di grasso, strettamente unite le une alle altre. In seguito gli sclerozi germineranno, dando origine al ciclo di sviluppo sessuato del fungo, rappresentato da periteci, aschi ed ascospore (Fig. 1).

Dobbiamo ora fare due osservazioni:

a) la produzione e la presenza di alcaloidi si ha solo nella fase scleroziale del ciclo di sviluppo della *Claviceps* Tul. Essi non sono cioè presenti durante la fase conidiale (2, 4);

b) la formazione dello sclerozio non avviene nella stessa maniera in tutte le specie.

Infatti in alcune specie, come nella *Claviceps paspali* Stev. et Hall o nella *Claviceps sesleriae* Stäger (1, 2), gli sclerozi si formano da ife che mantengono inalterate le loro caratteristiche originarie. Ossia le ife si avvicinano le une alle altre nel senso della lunghezza, quasi a costituire un unico grosso sinema. In altre specie invece, come nella *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul., la formazione dello sclerozio avviene mediante una profonda alterazione della struttura originaria delle ife. Esse infatti o formano cellule a struttura irregolare oppure si dividono formando setti molto ravvicinati, che delimitano cellule lunghe 12-15 μ , simili ad artrospore, le quali costituiranno la struttura finale dello sclerozio.

Queste profonde differenze di origine dello sclerozio tra le specie « *paspali* » e « *purpurea* » si accompagnano anche ad una differenza fondamentale della struttura finale dello sclerozio. Infatti, mentre nella *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul. lo sclerozio presenta la parte esterna corticale compatta ed una forma allungata (Fig. 2),



FIG. 2. - Sclerozi di *Claviceps purpurea* su una spiga di segale.

gli sclerozi della *Claviceps paspali* Stev. et Hall (³, ⁴) sono rotondeggianti, giallobruni (Fig. 3), con una superficie esterna spugnosa (Fig. 4).



FIG. 3. - Sclerozio isolato di *Claviceps paspali*.

Recenti osservazioni riguardanti la differente formazione delle cellule sessuali (ascogonio e anteridio) e la forma delle ascospore, che nella *paspali* presentano un solo setto, a differenza di quelle della *purpurea* che sono plurisetate, farebbero pensare che la *Claviceps paspali* Stev. et Hall appartenga ad un altro genere.

Queste differenze morfologiche si accompagnano anche a profonde differenze nella composizione degli alcaloidi. Infatti nella *Claviceps paspali* Stev. et Hall è stata dimostrata solo (⁷) la presenza dell' α -ossietilamide e dell'amide dell'acido lisergico. Risultati analoghi sono stati raggiunti anche con sclerozi di *Claviceps paspali* Stev. et Hall raccolti in Italia (⁸). Essi infatti contengono lo 0,003% di α -ossietilamide dell'acido lisergico. È noto invece che gli sclerozi di *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul. contengono una maggior percentuale di alcaloidi, prevalentemente derivati peptidici dell'acido lisergico.

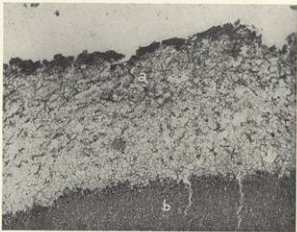


FIG. 4. - Sezione di sclerozio di *Claviceps paspali*.
a) parte esterna spugnosa
b) parte interna compatta.

×200

2. Sulla formazione di strutture scleroziali in colture saprofitiche e relativa produzione di alcaloidi

a) *Claviceps paspali* Stev. et Hall

Se si infettano (*), prima della germinazione, embrioni di segale coltivati in un adatto terreno nutritivo con ceppi di *Claviceps Tul.*, si riesce ad ottenere formazione di sclerozi, non solo sull'embrione (Fig. 5), ma anche sul germinello (Fig. 6),



FIG. 5. - Embrione di segale infettato con conidi di *Claviceps purpurea* prima della germinazione. Si noti la formazione dello sclerozio sull'embrione (s).

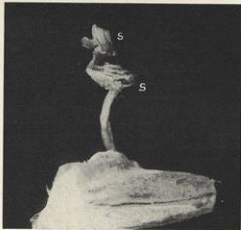


FIG. 6. - Formazione di sclerozi (s) su germinello di segale.

nello stelo e sulle foglie (Fig. 7). In queste particolari condizioni di coltura era stata trovata una relazione molto stretta tra virulenza di un dato ceppo e capacità di produrre sclerozi e quindi alcaloidi. Questa relazione fu dimostrata valida anche per alcuni ceppi di *Claviceps paspali* Stev. et Hall, di modo che aumentando la virulenza, con successivi passaggi, in piantine di segale coltivate sterilmente « in vitro », è stato possibile aumentare anche la loro capacità di produrre sclerozi e alcaloidi. Si è riusciti così ad isolare nel 1957 un ceppo di *Claviceps paspali* Stev.



FIG. 7. - Formazione di uno sclerozio (s) su una foglia di segale.

et Hall che produceva alcaloidi in coltura sommersa, in un terreno molto semplice (*), costituito da mannite, succinato di ammonio e sali minerali. Il ceppo originale F-140, della nostra collezione, produceva solo 10 µg/ml di alcaloidi. Con successive selezioni e modificazioni del terreno di coltura si raggiungono attualmente produzioni di 3000-4000 µg/ml dopo 9-13 giorni di coltura. Produzioni analoghe si ottengono industrialmente anche in tank di 30.000-50.000 litri di capacità. Il nostro ceppo produce un solo alcaloide e precisamente l' α -ossetilamide dell'acido lisergico. È presente anche la corrispondente amide, che deriva dal precedente composto, per perdita di una molecola di aldeide acetica.

Ora, se noi esaminiamo la struttura del micelio di *Claviceps paspali* in coltura sommersa, osserviamo che la produzione di alcaloidi si ha solo in presenza di particolari strutture a sinnema (Fig. 8). Le ife, ripiene di grasso (Fig. 9), si addensano infatti in forme allungate che, nell'origine e nel colore, assomigliano a tipici sclerozi (Fig. 10). Tutti i nostri ceppi di *Claviceps paspali* Stev. et Hall, produttori di elevate quantità di alcaloidi, non producono conidi in nessun terreno nutritivo. Raramente sono stati isolati alcuni ceppi che producevano conidi. Essi però non hanno mai prodotto alcaloidi. Per la produzione di alcaloidi occorre cioè avere, in coltura saprofitica, una struttura simile o omologa a quella naturale. Come abbiamo già detto precedentemente, in natura la produzione di alcaloidi si ha solo nella fase scleroziale. Ed in questo caso specifico la produzione di strutture sinematiche compatte ripete la formazione naturale degli sclerozi.

Una conferma a tale fatto si è potuta avere recentemente nel nostro Laboratorio (19).

Infatti ceppi selvaggi di *Claviceps paspali* Stev. et Hall si possono isolare in tre modi diversi:

- a) da conidi
- b) da sclerozi
- c) da ascospore.



FIG. 8. - Sinterni di *Claviceps paspali* in cultura sommersa.

×5

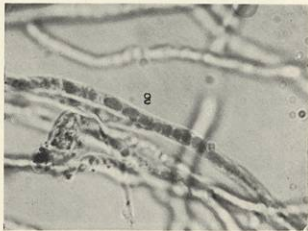


FIG. 9. - Iife di *Claviceps paspali* con gocce di grasso (g).
(Colorazione Sudan III in lattiofenolo).

×800

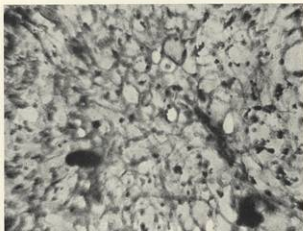


FIG. 10.- Sezione della parte interna di un sinnema di *Claviceps paspali* in coltura sommersa. Si noti la formazione di cellule sclerotizzate isodiametriche o poligonali. x500

Le colonie che si ottengono in coltura pura, isolando conidi, parti di sclerozi o ascospore, si possono raggruppare in tre tipi morfologici ben distinti, e precisamente:
Colonie tipo A: colonie grandi, piane, con rare gocce di essudato in superficie, costituite da ife formanti un micelio a struttura lassa (Fig. 11);

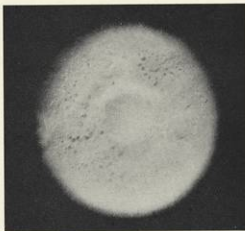


FIG. 11. - *Claviceps paspali*. Colonie tipo A isolate da conidi.

Colonie tipo B : colonie più piccole delle precedenti, con molte gocce di essudato di colore verde e ife raggruppate a formare una struttura compatta scleroziale (Fig. 12);

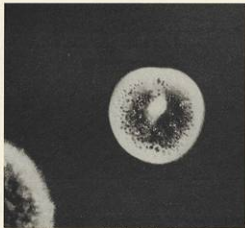


FIG. 12. - *Claviceps paspali*. Colonie tipo B isolate da sclerozi.

Colonie tipo C : colonie molto piccole con micelio formato da ife irregolarmente ingrossate (Fig. 13).



FIG. 13. - *Claviceps paspali*. Colonia tipo C.

Questi tre tipi di colonie sono variamente rappresentati nei ceppi isolati da conidi, da sclerozi o da ascospore (Tab. 1).

TABELLA 1.
PERCENTUALI DEI VARI TIPI DI COLONIE A SECONDA DELL'ISOLAMENTO.

Origine	Tipo delle colonie		
	A%	B%	C%
Conidi	53,8	46,2	0
Sclerozi	5,5	94,5	0
Ascospore	10,0	40,0	50

In coltura sommersa solo le colonie di tipo B producono alcaloidi. Infatti questi ceppi formano tipici sinnemi (Fig. 14). Le colonie tipo A e C invece formano, in coltura sommersa, del micelio costituito da ife molto ramificate, raggruppate in ammassi irregolari e che non hanno nessuna rassomiglianza con una struttura scleroziale (Fig. 15), e quindi non producono alcaloidi.



FIG. 14. - *Claviceps paspali*. Sinnema in coltura sommersa, ottenuto da colonie tipo B. ×3

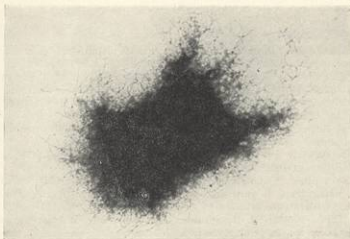


FIG. 15. - *Claviceps paspali*. Micelio filamentoso in cultura sommersa ottenuto da colonia tipo A. $\times 2$

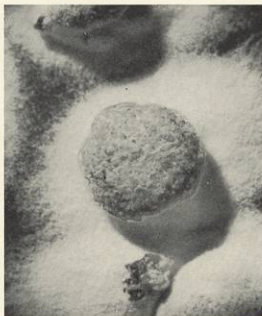


FIG. 16. - *Claviceps purpurea*. Colonie scleroziali in agar.

$\times 3$

b) *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul.

Nel nostro Laboratorio si sono isolati, in questi ultimi anni, centinaia di ceppi di *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul. provenienti da differenti ospiti e luoghi. La maggior parte di questi ceppi produceva, nei comuni terreni di coltura, una grande quantità di conidi, per cui nessuno di questi riusciva a produrre alcaloidi. Si è però recentemente isolato un ceppo di *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul. (F-1317/3), proveniente da sclerozi raccolti su una pianta di *Triticum* (Porriño, Spagna) (Fig. 16), il quale non produce conidi, e, se coltivato in coltura superficiale, in un terreno a base di saccarosio, succinato di ammonio e sali minerali, forma, dopo 8-12 giorni, uno strato superficiale compatto a struttura tipicamente scleroziale (Fig. 17), e produce alcaloidi derivati dell'acido lisergico.

Solo se si riproduce tale struttura si riesce ad ottenere produzione di alcaloidi e, nel caso particolare, di pura ergotamina. Con successive modificazioni del terreno di coltura e ripetute selezioni si raggiungono attualmente, in modo costante, produzioni di 400-600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ di ergotamina, dopo 10-12 giorni di coltura. In coltura sommersa invece, la produzione non è costante, dato che non si riesce ancora ad ottenere le tipiche formazioni scleroziali.

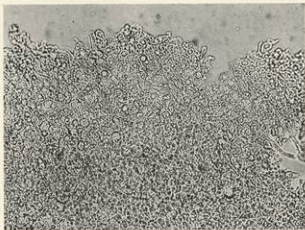


Fig. 17. - *Claviceps purpurea*. Sezione della massa miceliale ottenuta in coltura superficiale. Si noti la tipica struttura scleroziale. $\times 200$

III) SU ALCUNI ASPETTI CULTURALI DEL GENERE *Claviceps* Tul.

Produzione di alcaloidi in coltura sommersa con ceppi di Claviceps paspali Stev. et Hall.

In precedenti lavori era stato dimostrato che la produzione ottimale di alcaloidi si aveva solo se la concentrazione di mannite e di acido succinico raggiunge-

vano inizialmente valori elevati che erano corrispondentemente del 5% e del 4%. Il micelio durante la sua crescita ne utilizza però solo il 30% circa. D'altra parte se la concentrazione iniziale diminuisce si ha un incremento di peso secco ma una forte diminuzione nella produzione di alcaloidi. In base a questi risultati abbiamo cercato di modificare sostanzialmente il terreno di coltura originale.

Con i nostri ceppi di *Claviceps paspali* si può ottenere produzione di alcaloidi anche con terreni aventi come fonte di carbonio una elevata concentrazione di zuccheri e come fonte di azoto una sostanza organica complessa, come peptone o corn-steep.

Nella Tabella 2 si osserva molto chiaramente, come la produzione di alcaloidi, con un terreno costituito da varie fonti di carbonio e da una soluzione di peptone all'1%, sia in funzione di una determinata concentrazione dello zucchero presente.

TABELLA 2.

INFLUENZA DI DIVERSE CONCENTRAZIONI DI FONTI C SULLA PRODUZIONE DI ALCALOIDI (*)
($\mu\text{g/ml}$ all'11° giorno di coltura).

Concentrazione %	Fonti di C			
	Glucosio	Saccarosio	Mannite	Sorbito
5	10	12	350	300
10	15	120	1500	800
20	150	180	3000	1800
30	220	500	1800	750
40	700	1500	300	200
50	800	1450	200	100

È interessante notare come in presenza di saccarosio al 40-50%, oltre alla α -ossietilamide dell'acido lisergico venga prodotto anche acido lisergico puro e agroclavina, nelle proporzioni del 70%, 20% e 10% circa.

Risultati analoghi si sono ottenuti sostituendo al peptone il corn-steep, nella concentrazione iniziale del 10%.

Se la concentrazione di peptone viene aumentata al 2%, aumenta anche la produzione di alcaloidi, ottenendo, con una concentrazione del 20% di mannite, valori di 4000-5000 $\mu\text{g/ml}$ dopo 10-12 giorni di coltura.

Risultati analoghi si sono ottenuti anche con un ceppo di *Claviceps* sp., gentilmente inviatici dal Dr. J. RENZ (Sandoz, Basilea), isolato dal *Pennisetum tithoides*.

In un terreno della seguente composizione: saccarosio 10%, peptone 2%, acqua di fonte, si raggiungono produzioni dell'ordine di 3000-4000 $\mu\text{g/ml}$ di cla-

(*) Beute da 500 ml contenenti 100 ml di terreno nutritivo. In tutte le concentrazioni indicate il terreno di coltura è costituito da una soluzione all'1% di peptone Costantino in acqua di fonte.

vine, principalmente agroclavina e elimoclavina, dopo 7-10 giorni di coltura⁽¹¹⁾. Al contrario i nostri ceppi di *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul. (F-1317) non producono ergotamina in questi nuovi terreni ad alta concentrazione di zuccheri.

La *Claviceps paspali* produce alcaloidi anche in terreni nei quali l'unica fonte di azoto è rappresentata da singoli aminoacidi (Tab. 3)⁽¹²⁾.

TABELLA 3.
PRODUZIONE DI ALCALOIDI CON *Claviceps paspali* Stev. et Hall CON DIFFERENTI AMMINOACIDI.

Amminoacidi	Alcaloidi (µg/ml)
Controllo	1070
DL-Triptofano	300
DL-Serina	145
DL-Alanina	220
DL-Glicocolla	270
DL-Arginina	140
DL-Tirosina	175
DL-Acido glutammico	225
Fenilalanina	30

Controllo : saccarosio 40% ; peptone 1% ; acqua di fonte.

Nei terreni con amminoacidi il terreno base era costituito da : saccarosio 40% ; acqua di fonte. Gli amminoacidi sono stati aggiunti alla concentrazione iniziale dello 0,2%.

A differenza di quanto potevamo pensare precedentemente a questi risultati, la presenza di un acido organico, e precisamente dell'acido succinico, non è affatto necessaria per la produzione di alcaloidi. È sufficiente solo avere una elevata concentrazione di fonti di carbonio. Non siamo qui in presenza, a mio parere, di un fattore chimico che regola la produzione degli alcaloidi, ma di un fattore puramente fisico che si può identificare con la pressione osmotica.

Mi sembra che con questi nuovi terreni si possa affrontare con maggior facilità il problema della biosintesi degli alcaloidi, così ampiamente iniziata e sviluppata dalla scuola del Prof. MOTHERS e collaboratori. D'altra parte recenti esperienze ci hanno permesso di coltivare in colture sommerse sterili intere piantine di *Ipomoea* sp.⁽¹³⁾. Dato che anche questa pianta produce alcaloidi derivati dell'acido lisergico, simili se non identici a quelli prodotti dalla *Claviceps paspali*⁽¹⁴⁾, si apre davvero un nuovo campo fecondo di future ricerche.

Solo ora abbiamo intrapreso, nel nostro Laboratorio, uno studio approfondito sulla biosintesi degli alcaloidi. Le mie impressioni, dico impressioni di biologo e micologo, mi fanno pensare che non vi sia una sola via biosintetica. Credo infatti che la biosintesi di una molecola di clavina, o di acido lisergico o di derivati peptidici dell'acido lisergico, sia profondamente differente. Ma questa è solo una mia impressione, non basata su nessun dato sperimentale. Spero solo che la felice opportunità di avermi fatto incontrare con questa magnifica e famosa scuola di biochimica possa portare un contributo decisivo alla risoluzione definitiva di questi nostri appassionanti problemi.

BIBLIOGRAFIA

- (1) CHAIN, E.B. (1960), Nouvelles voies microbiologiques pour l'obtention de médicaments. *Journées Pharmaceutiques Françaises*, 1960, S.E.P.E.S. - Paris IV.
- (2) GAUMANN, E.B. (1959), Plant Infection, Crosby, Lockwood & Son, Ltd., London.
- (3) TONOLO, A., SCOTTI, T., e VERO, L. (1961), Morphological observations on different species of *Claviceps* Tul. grown in submerged culture. *Sci. Rep. Ist. Sup. Sanità*, I, 404-422.
- (4) TONOLO, A. (1959), Infection and production of sclerotia on cereal plants grown in sterile conditions by *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul. *Sel. Sci. Papers from the Ist. Sup. Sanità*, Vol. II, p. 388-404.
- (5) GRASSO, V., e TONOLO, A. (1964), Alcuni aspetti biologici nella *Claviceps paspali* Stev. et Hall. *Nuovo Giornale Botanico Italiano* (in corso di stampa).
- (6) STEWART, R.B. (1957), Morphology of the sclerotium of *Claviceps paspali*. *Phytopathology*, 47: 444-445.
- (7) GRÖGER, D., TYLER, V.E.Jr., e DUSENBERY, J.E. (1961), Investigation of the alkaloids of *Paspalum ergot*. *Lloydia*, 24: 97-102.
- (8) BIANCHI, P., PUGLIESE, A., TONOLO, A., e VALFRÉ, F. (1964), Sul contenuto di alcaloidi di sclerozi naturali di *Claviceps paspali* Stev. et Hall in Italia. *Revd. Ist. Sup. Sanità* (in corso di stampa).
- (9) ARCAMONE, F., CHAIN, E.B., FERRETTI, A., MINGHETTI, A., PENNELLA, P., TONOLO, A., e VERO, L. (1961), Production of a new lysergic acid derivative in submerged culture by a strain of *Claviceps paspali* Stev. et Hall. *Proc. Roy. Soc.*, 135, B, 26-54.
- (10) BARCELONA-VERO, L., BIANCHI, P., e TONOLO, A. (1964), Produzione di alcaloidi in coltura sommersa con differenti ceppi di *Claviceps paspali* Stev. et Hall. *Nuovo Giornale Botanico Italiano* (in corso di stampa).
- (11) TONOLO, A., e EDWARDY-NAGY, E. (1964), *Osservazioni non pubblicate*.
- (12) ARCAMONE, F., MINGHETTI, A., PENNELLA, P., SCOTTI, T., e TONOLO, A. (1964), *Osservazioni non pubblicate*.
- (13) BARCELONA-VERO, L., MINO, L., ODDO, N., REALI-TEMPESTA, P., e TONOLO, A. (1964), La coltura sommersa sterile di piantine di *Triticum vulgare* L. Var. Mentana. *Nuovo Giornale Botanico Italiano* (in corso di stampa).
- (14) GRÖGER, D. (1963), Ueber das Vorkommen von Ergolinderivaten an *Ipomoea* Arten. *Flora*, Bd. 153, S. 373-382.