

Muscarine (Muscarin, epi- und allo-Muscarin) aus dem Mycel von *Amanita muscaria* und von *Clitocybe*-Arten.¹⁾

VON R. J. STADELMANN *) , E. MÜLLER *) und C. H. EUGSTER **)

Zusammenfassung

Stämme von *Clitocybe rivulosa*, *Clitocybe dealbata*, *Clitocybe festiva* und von *Amanita muscaria* (Gattungen aus der Ordnung der Agaricales) bildeten in Reinkultur stereoisomere Muscarine (Muscarin, epi-Muscarin, allo-Muscarin). Die Bildung dieser stereoisomeren Muscarine konnte bei *Clitocybe dealbata* und *Clitocybe rivulosa* durch verschiedene Kulturbedingungen beeinflusst werden. Epiallo-Muscarin konnte in den Biomassen dieser Pilze nicht gefunden werden. In Nährlösungen von *Clitocybe rivulosa* konnten keine Muscarine nachgewiesen werden.

Summary

Stereoisomeric muscarines (muscarine,¹⁾ epi-muscarine, allo-muscarine) were found in the mycelium of *Clitocybe rivulosa*, *Clitocybe dealbata*, *Clitocybe festiva* and of *Amanita muscaria* (genera of Agaricales) grown in pure culture. Their relative amounts in *Clitocybe dealbata* and in *Clitocybe rivulosa* were affected by composition of substratum and culture conditions. Epiallo-muscarine could not be detected in the mycelium of any fungi tested. No muscarines were obtained from a substrate of *Clitocybe rivulosa*.

Einleitung

Muscarin, ein Toxin mit charakteristischer neurologischer Wirkung, kommt nicht nur im Fliegenpilz (*Amanita muscaria* (L. ex Fr.) HOOKER) und in einigen *Clitocybe*-Arten vor, sondern ist als Hauptwirkstoff in der ebenfalls agaricalen Gattung *Inocybe* Fr. weitverbreitet. Eine Zusammenstellung der Literatur über das Vorkommen von Muscarin innerhalb der Ordnung der Agaricales findet sich z. B. bei STADELMANN (1976). Viele der als Muscarinproduzenten in Frage kommenden Arten sind Mykorrhizapilze, die sich ausserordentlich schlecht im Laboratorium kultivieren lassen. Für den Nachweis von Muscarin in Reinkulturen wurden deshalb vor allem saprophytische

¹⁾ 39. Mitteilung über Muscarin und verwandte Stoffe von C. H. EUGSTER und Mitarbeiter; 38. Mitteilung STADELMANN, MÜLLER und EUGSTER (1976).

*) Institut für spezielle Botanik der Eidg. Technischen Hochschule Zürich, Universitätsstr. 2, CH-8006 Zürich.

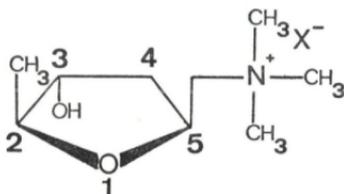
**) Organisch-chemisches Institut der Universität Zürich, Rämistr. 76, CH-8001 Zürich.

Arten der Gattung *Clitocybe* Kummer verwendet. So isolierten z. B. SWENBERG, KELLEHER und SCHWARTING (1967), BURTON (1969) und PORTE (1972) aus der Biomasse von Flüssigkeitsoberflächen-Kulturen von *Clitocybe rivulosa* bzw. *Clitocybe festiva* Muscarin als Reinekat. ISHIDA und KOZU (1949), BURTON, KELLEHER und SCHWARTING (1965), PORTE (1972) wiesen in wässrigen oder alkoholischen Extrakten aus dem Mycel von ebenfalls Flüssigkeitsoberflächen-Kulturen von *Inocybe rimosa* bzw. *Clitocybe*-Arten an der Ratte eine muscarinische Aktivität nach. Neben dem Muscarin mit typischer Wirkung existieren noch stereoisomere Muscarine mit weit geringerer physiologischer Aktivität. Solche sind bis anhin als Naturstoffe nur in Fruchtkörpern verschiedener Arten aus der Ordnung der Agaricales nachgewiesen worden; SCHLEUSENER und EUGSTER (1970), EUGSTER und SCHLEUSENER (1969), CATALFOMO und EUGSTER (1970), BOLLINGER und EUGSTER (1971a), STADELMANN, MÜLLER und EUGSTER (1976).

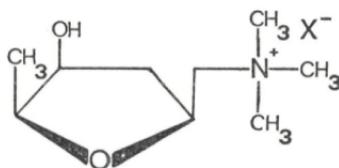
In der vorliegenden Arbeit wird die Beeinflussung von Kulturverfahren, Nährmedien und Kulturdauer auf die Bildung von stereoisomeren Muscarinen im Mycel von Stämmen von *Clitocybe rivulosa*, *Clitocybe dealbata*, *Clitocybe festiva* und *Amanita muscaria* untersucht.

Formelschema

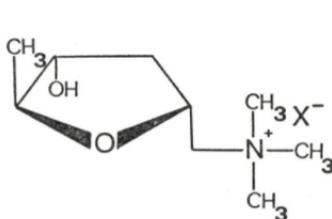
Das Muscarinmolekül besitzt drei Chiralitätszentren. Dies führt zu acht möglichen Stereoisomeren bzw. vier Enantiomerenpaaren. Die einzelnen Diastereomeren werden folgendermassen benannt (CORRODI, HARDEGGER und KOEGL, 1957):



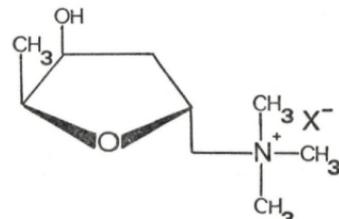
(+)-(2S, 3R, 5S)-Muscarinsalz



(+)-(2S, 3S, 5S)-epi-Muscarinsalz



(-)-(2S, 3R, 5R)-allo-Muscarinsalz



(+)-(2S, 3S, 5R)-epiallo-Muscarin-salz

Dargestellt sind die bisher in der Natur aufgefundenen Enantiomeren, mit Ausnahme von epiallo-Muscarin, bei dem noch nicht feststeht, welches Enantiomere in der Natur vorkommt (BOLLINGER und EUGSTER, 1971b).

I. Material und Methoden

1. Pilzstämme

Die Untersuchungen wurden mit folgenden Ausgangsstämmen durchgeführt:

Amanita muscaria (L. ex FR.) HOOKER, ETH Nr. 2607

Clitocybe dealbata (Sow. ex FR.) KUMMER, ETH Nr. 2606

Clitocybe dealbata (Sow. ex FR.) KUMMER, ETH Nr. 2608

Clitocybe festiva FAVRE, Institut de Mycologie, Villeurbanne, Nr. SC 66—66

Clitocybe rivulosa (PERS. ex FR.) KUMMER, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Nr. CBS 152.37

2. Nährmedien

Nr. 1: 35 g Malzextrakt (Oxoid), 20 g Mannit, 8 g Hefeextrakt (Difco), 1 g Glutamin, 1 g $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g KH_2PO_4 , 0,01 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1 ml Hoaglandlösung (HOAGLAND et al. 1933), 1 l dest. Wasser.

Nr. 2: Nr. 1 ohne Mannit.

Nr. 3: Nr. 1 mit 75 g Mannit

Nr. 4: Nr. 1 mit 100 g Mannit.

Nr. 5: Nr. 1 mit 35 g Glucose an Stelle von 35 g Malzextrakt.

Nr. 6: Nr. 5 ohne Mannit.

Nr. 7: Nährlösung nach ODDOUX (1955) bestehend aus: 16,5 g Glucose, 3,5 g Malzextrakt (Oxoid), 0,35 g Ammoniumtartrat (neutral), 0,5 g Asparagin, 0,5 g Caseinhydrolysat (Fluka), 0,5 g KH_2PO_4 , 0,25 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 l dest. Wasser.

Nr. 8: Modifiziertes Medium Nr. 7 bestehend aus: 28 g Glucose, 7 g Malzextrakt (Oxoid), 0,35 g Ammoniumtartrat (neutral), 0,5 g Asparagin, 5 g Caseinhydrolysat (Fluka), 0,5 g KH_2PO_4 , 0,25 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 l dest. Wasser.

Alle hier beschriebenen Nährmedien wurden bei 120° und 1 at während 20 Minuten autoklaviert.

3. Vorkulturen

Zur Gewinnung von homogenem Impfmateriel kultivierten wir die Pilze in 500 ml-Erlenmeyerkolben (mit Schikane), die je 160 ml Nährlösung Nr. 1 enthielten und beimpften diese mit Hyphenmateriel ab Schrägagarröhrchen ohne Reste des alten Nährbodens. Inkubiert

wurde bei 24° C auf einer Rundschüttelmaschine mit 84 U/min (Schüttelamplitude 2,5 cm). Innert 12 Tagen entwickelte sich das Mycel bei den *Clitocybe*-Stämmen submers ausserordentlich kräftig in Form von Mycelkügelchen von ca. 2 mm Durchmesser. Auf einer Rundschüttelmaschine bei Schüttelfrequenzen bis 100 U/min (Schüttelamplitude 2,5 cm) konnten diese Kulturen ohne Beeinträchtigung über einige Wochen bei 8° C weiter kultiviert werden. Darnach wurden, um Degenerationen vorzubeugen, die Stämme auf Nährmedien Nr. 2, Nr. 5 und Nr. 6 umgeimpft.

Hyphenmaterial der Stammkultur von *Amanita muscaria* übertragen wir in 500 ml-Erlenmeyerkolben, die je 40 ml Nährmedium Nr. 1 sowie je 70 g Glaskugeln à 5 mm Durchmesser enthielten und inkubierten bei 21° C. Hierauf wurde das sich innert ca. 6—7 Wochen spärlich entwickelnde Oberflächenmycel mit den Glaskugeln zerschlagen und die so erhaltene Hyphensuspension bei 3° C gelagert.

4. Kulturverfahren

a. Oberflächenkulturen

Je Ansatz beschickten wir dreissig 500 ml-Erlenmeyerkolben mit je 35 ml Nährmedium Nr. 1 sowie mit je 60 g Glaskugeln (5 mm Durchmesser) und beimpften jeden Kolben mit 0,2 ml Mycelsuspension. Dabei waren die Glaskugeln nicht von der Nährlösung bedeckt und das Mycel konnte sich wegen der günstigen Belüftungsverhältnisse vollständig oberflächlich entwickeln.

b. Kulturen in Schikanekolben

Zwanzig 500 ml-Erlenmeyerkolben pro Ansatz, die unmittelbar über der Standfläche eine ca. 2 cm tiefe und 1 cm hohe seitliche Einbuchtung aufwiesen, enthielten je 160 ml Nährlösung. Wir haben diese Kolben bei den Versuchen mit je 1 ml Mycelsuspension von *Clitocybe*-Arten beimpft und anschliessend bei $24 \pm 1^\circ$ auf einer Hin- und Herschüttelmaschine mit 72 Hin- und Herbewegungen/min (Schüttelamplitude 5 cm) inkubiert. Dabei achteten wir darauf, dass sich die seitliche Einbuchtung (Schikane) jedes Kolbens senkrecht zur Auslenkung dieser Schüttelmaschine befand.

Für den Kulturversuch mit *Amanita muscaria* haben sich Schikanekolben mit 200 ml Nährlösung besser bewährt. Wir verwendeten für die Beimpfung 1,25 ml Hyphensuspension und inkubierten auf einer Rundschüttelmaschine mit 40 U/min (Schüttelamplitude 2,5 cm).

c. Kulturen in Kulturflaschen

Vier Kulturflaschen nach Fernbach pro Ansatz mit je einem Volumen von 2,4 l enthielten je 650 ml Nährlösung; dies ergab eine

Nährlösungsschicht von 2,4 cm Höhe. Diese Flaschen wurden mit je 4 ml Suspension beimpft und auf der Hin- und Herschüttelmaschine mit 72 Hin- und Herbewegungen/min (Schüttelamplitude 5 cm) inkubiert.

d. Fermenter

Wir beschickten den Fermenter Typ b 10 der AG für Biologische Verfahrenstechnik, Basel, mit jeweils 10 l Nährlösung. Bei einer Belüftung von 6,5 l Luft/min und einer Drehzahl des Blattührers von 175 U/min konnten wir durch tropfenweise Zugabe von dest. Wasser während der Kulturdauer das Volumen von 10 l konstant halten. Wir beimpften mit 62,5 ml Suspension je Ansatz, und die Arbeitstemperatur betrug 24°.

5. Temperatur, Licht

Sofern keine anderen Angaben gemacht werden, betrug die Kulturtemperatur für sämtliche *Clitocybe*-Stämme $24 \pm 1^\circ$, für den Stamm von *Amanita muscaria* $21 \pm 1^\circ$. Die Inkubation erfolgte unter diffusum Kunstlicht; einen Einfluss des Lichtes auf die Versuchsergebnisse konnten wir nie feststellen. Die optimalen Wachstumstemperaturen liessen sich mit Hilfe von Schrägagarröhrchen in Thermostaten (mit Temperaturintervallen von 3°) bestimmen.

6. Bestimmung der Mycelgewichte

Das Mycel trennten wir mit Hilfe von Käseleinen vom Kulturfiltrat. Hierauf wurde es mit Brunnenwasser gewaschen, anschliessend gefriergetrocknet und dann gewogen. Die Werte werden in Milligramm pro 100 ml Nährlösung angegeben.

7. Isolierung und Nachweis der stereoisomeren Muscarine aus Mycel und Kulturfiltrat

a. Isolierung der Muscarine

Das bei BOLLINGER und EUGSTER (1971) beschriebene sowie das von BOLLINGER (1974) ausgearbeitete Verfahren zur Isolierung von Muscarinen aus dem in den Kulturversuchen gewonnenen Mycel wurde abgeändert übernommen.

Das gefriergetrocknete Mycel liess sich in einem Mörser zu einem feinen Mehl zerreiben. Anschliessend folgte ein Kochvorgang von zweimal je drei Stunden mit Methanol unter Rückfluss. Die Methanol-extrakte wurden hierauf vereinigt, im Vakuum auf ungefähr 40 ml eingengt, der Niederschlag abfiltriert, mit Methanol gewaschen und dann verworfen. Hierauf fügten wir dem rotbraunen, klaren Filtrat vorsichtig unter Schütteln ca. 50–100 ml Wasser zu. Die auftretenden

schleimigen, klebrigen Ausflockungen wurden abzentrifugiert, mit Wasser gewaschen und dann verworfen. Im Vakuum wurde nun diese wässrige Lösung von allem Methanol befreit; hierauf dreimal mit Methylenchlorid entfettet. Mit einem stark basischen Ionentauscher (Amberlite IRA 410 20—50 mesh, OH⁻-Form, 1,5—2×25—30 cm; Amberlite IRA 410 Cl⁻-Form wurde mit 8%-iger, ca. 40° warmer NaOH in die OH⁻-Form übergeführt und mit Wasser gut gewaschen) entfernten wir die Säuren aus dieser klaren, rotbraunen, entfetteten, wässrigen Lösung. Den alkalischen Durchlauf neutralisierten wir fortwährend mit einer verdünnten Salzsäure (ca. 1N). Allerdings wirkte sich bei der Extraktion von ca. 30 g und mehr trockenem Mycel der hohe Gehalt an Zucker und Zuckeralkoholen (Mannit) bei der Weiteraufarbeitung ausserordentlich störend aus. Um diese Neutralstoffe aus dem Gemisch der Rohchloride der Basen zu entfernen, schickte man die neutrale Lösung durch einen starken Kationentauscher (Dowex 50 W, 50—100 mesh, K⁺-Form, 1,5—2×25—30 cm; Dowex 50 W H⁺-Form wurde mit einer 5%-igen, ca. 40° warmen K₂SO₄-Lösung behandelt und mit Wasser gut gewaschen). Nach gründlichem Waschen mit Wasser konnten wir die Basen mit ca. 70—100 ml wässriger, ca. 40° warmer 5%-igen KCl-Lösung wieder herauswaschen. Um das überschüssige Salz wieder abzutrennen, musste die Lösung zur Trockenheit eingedampft, dann mit wenig Wasser gelöst und unter Zugabe von Methanol langsam ausgefällt werden. Die überstehende Lösung liess sich abpipettieren, erneut eindampfen und von neuem mit Methanol Salze ausfällen. Diesen Vorgang wiederholten wir, bis keine Salze mehr ausfielen. Ein besseres Eluieren liess sich bei der anschliessenden Säulenchromatographie durch ein Aufziehen der Rohchloride auf ca. 0,5 g gut mit Wasser gewaschenes Aluminiumoxid (Fluka neutral) erreichen. Hierauf wurde an einer Aluminiumoxidsäule (Fluka Typ 507 C, Aktivitätsstufe 1,5—2×20—25 cm) mit Aceton : Methanol 1 : 1 chromatographiert. Die Fraktionen von ca. 4 ml engten wir auf ein minimales Volumen ein und untersuchten sie anschliessend mit Dünnschichtchromatographie. Die Entwicklung erfolgte auf Cellulosefolien (Macherey und Nagel, Polygram Cel 300, 0,1 mm) mit Laufmittel 14 (EUGSTER, 1956: 150 sek. Butanol, 50 Aethanol, 10 Eisessig, 50 Wasser). Die Substanzflecken liessen sich mit Hilfe von modifiziertem DRAGENDORFF-Reagens (THIES und REUTHER, 1954) sichtbar machen.

b. Nachweis der Muscarine aus dem Kulturfiltrat

Nach dem Einengen des Kulturfiltrats auf ca. $\frac{1}{3}$ des Volumens schickten wir es durch den starken Kationentauscher (Dowex 50 W, 50—100 mesh, K⁺-Form). Die weitere Aufarbeitung erfolgte hierauf, nach gründlichem Waschen mit Wasser, gleich wie bei den aus dem Mycel gewonnenen Rohchloriden.

c. Pyrolyse

Für die weitere Aufarbeitung lassen sich die muscarinhaltigen Fraktionen eines Kulturverfahrens vereinigen und in ein Pyrolyserohr (1,5 × 15 cm) übertragen. Hierauf wurden die Lösungsmittel im Wasserbad mit Stickstoff abgeblasen. Dann folgte die Pyrolyse der quaternären Chloride während 10–15 Minuten bei 190–240° und 10⁻³ Torr in einem Kugelrohrdestillationsofen (Büchi GRK 50) wobei die Norbasen in einem anschliessenden U-Rohr (Durchmesser 7 mm) mit flüssigem Stickstoff ausgefroren wurden. Mit wenig Aether lösten wir die Produkte im ersten Knie des U-Rohres und spritzten dann anschliessend diese Lösung in den Gaschromatographen.

d. Qualitativer Nachweis der stereoisomeren Muscarine durch Gaschromatographie

Diese von EUGSTER und SCHLEUSNER (1969) für Muscarine ausgearbeitete Nachweismethode mit Hilfe der Gaschromatographie führten wir mit einem Carlo Erba Fractovap, Modell G 1, Typ AID (FID) an einer Glaskapillarkolonne 20 m, ø 0,3 mm und 22 m, ø 0,35 mm, beladen mit Emulphor O/KOH 10%, unter folgenden Bedingungen durch: Verdampferblock 180–200°, Kolonne 110–120°, Trägergas 0,2 at H₂, Split 5–25 ml/min.

Durch Zumischen von authentischen Proben erfolgten die qualitativen Identifikationen, und die Auswertung haben wir mit einem Carlo Erba Elektrometer-Digitalintegrator Modell 72 durchgeführt.

II. Ergebnisse

Tabelle 1. Stereoisomere Muscarine (Relativprozentage) von *Clitocybe rivulosa* in Schikanekolben mit Nährmedium Nr. 1 nach 13, 21, 28 und 35 Tagen (3 Ansätze) Kulturdauer

Kulturdauer	Mycel trocken- gewicht	Muscarin	epi-	allo-Muscarin
13 Tage	1190	86	12	2
21 Tage	1240	76	14	10
28 Tage	1090	87	6	7
35 Tage (1)	1120	93	4	3
35 Tage (2)	1140	92	5	3
35 Tage (3)	1160	91	5	4

Die drei unabhängig voneinander aufgearbeiteten Ansätze mit 35 Tagen Kulturdauer stimmen in der Isomerenzusammensetzung in engen Grenzen überein. Der Pilz bildet Muscarin und die beiden Isomeren epi- und allo-Muscarin nebeneinander. In keiner Zeitstufe konnte in den Kulturfiltraten Muscarine nachgewiesen werden. In den folgenden Versuchen wurden die Kulturfiltrate nicht mehr untersucht.

Tabelle 2. Einfluss verschiedener Nährmedien auf die Bildung von stereoisomeren Muscarinen (Relativprozente) durch *Clitocybe rivulosa* in Schikanekolben während 35 bzw. 55 Tagen Kulturdauer

Nährmedien	Kulturdauer	Trocken- gewicht	Muscarin	epi-	allo-Muscarin
Nr. 5	35 Tage	1010	92	6	2
Nr. 6	35 Tage	980	89	5	6
Nr. 7	55 Tage	180	96	3	1
Nr. 8	55 Tage	540	36	64	—

Das Nährmedium Nr. 8 bewirkt eine die Produktion von Muscarin übersteigenden Anteil an epi-Muscarin.

Tabelle 3. Einfluss verschiedener Mannitkonzentrationen auf die Bildung von stereoisomeren Muscarinen durch *Clitocybe rivulosa* in Schikanekolben mit Grundnährmedium Nr. 2 während 35 Tagen Kulturdauer

Nährmedium	Trocken- gewicht	Muscarin	epi-	allo-Muscarin
Nr. 2	980	99	1	—
*Nr. 2+2% Mannit	1120	93	4	3
Nr. 2+7,5% Mannit	1290	76	23	1
Nr. 2+10% Mannit	1020	72	21	7

* Werte aus Tabelle 1 (1. Ansatz)

Höhere Mannitkonzentrationen begünstigen die Bildung stereoisomerer Muscarine, insbesondere von epi-Muscarin. Bei Abwesenheit von Mannit bildet der Pilz beinahe nur noch Muscarin.

Tabelle 4. Einfluss verschiedener Kulturverfahren auf die Produktion von stereoisomeren Muscarinen durch *Clitocybe rivulosa* in Nährmedium Nr. 1

Kulturverfahren	Kulturdauer	Trocken- gewicht	Muscarin	epi-	allo-Muscarin
Oberflächen	35	800	85	14	1
Schikanekolben *	35	1120	93	4	3
Schikanekolben **	64	1560	87	12	1
Kulturflaschen (1)	35	860	91	4	5
Kulturflaschen (2)	35	910	91	6	3
Kulturflaschen ***	35	430	90	5	5
Fermenter	16	1320	87	12	1

* Werte aus Tabelle 1 (1. Ansatz)

** Auf Rundschüttelmaschine mit 84 U/min bei 8° (Schüttelamplitude 2,5 cm)

*** Nährmedium Nr. 8

Die zwei unabhängig voneinander aufgearbeiteten Kulturflaschenansätze stimmen in ihrer Isomerenzusammensetzung beinahe überein. Die relative Isomerenzusammensetzung wird bei diesem Pilz in Nährmedium Nr. 1 durch verschiedene Kulturverfahren nur unwesentlich beeinflusst. Auch bewirkt ein anderes Nährmedium in Kulturflaschen keine nennenswerte Änderung der Isomerenzusammensetzung.

Tabelle 5. Einfluss von verschiedenen Kulturbedingungen auf die Produktion von stereoisomeren Muscarinen durch *Clitocybe dealbata*, Stamm ETH Nr. 2608, in Nährmedium Nr. 1

Kulturverfahren	Kulturdauer	Trocken- gewicht	Muscarin	epi-	allo-Muscarin
Oberflächen	35	930	56	42	2
Schikanekolben	35	770	83	10	7
Kulturflaschen	35	1090	81	12	7

In Oberflächenkulturen wird bei diesem Pilz die Produktion von epi-Muscarin stark gefördert. In Schikanekolben und in Kulturflaschen bildet er bevorzugt Muscarin.

Tabelle 6. Stereoisomere Muscarine (Relativprozent) von verschiedenen Pilzen in Schikanekolben mit Nährmedium Nr. 1 während 35 Tagen Kulturdauer

Stämme	Trockengewicht	Muscarin	epi-	allo-Muscarin
<i>Amanita muscaria</i> *	790	54	46	—
<i>Clitocybe dealbata</i> Stamm Nr. 2606	910	—	—	—
<i>Clitocybe dealbata</i> ** Stamm Nr. 2608	770	83	10	7
<i>Clitocybe festiva</i>	1880	68	20	12
<i>Clitocybe rivulosa</i> ***	1120	93	4	3

* Rundschüttelmaschine mit 40 U/min (Schüttelamplitude 2,5 cm) bei 21° während 212 Tagen

** Werte aus Tabelle 5

*** Werte aus Tabelle 1 (1. Ansatz)

Amanita muscaria und *Clitocybe festiva* bilden am meisten isomere Muscarine. In der Biomasse von *Clitocybe dealbata*, Stamm Nr. 2606, konnten keine Muscarine nachgewiesen werden.

Epiallo-Muscarin konnten wir in keinem Kulturversuch finden. Mit einer Ausnahme (Tab. 2) ist der relative Anteil an Muscarin stets

grösser als die Summe der Anteile der beiden anderen Isomeren. Der Anteil von allo-Muscarin ist mit einer Ausnahme (Tab. 2) kleiner als derjenige von epi-Muscarin.

III. Diskussion

Die unabhängig voneinander aufgearbeiteten Ansätze von *Clitocybe rivulosa* unter identischen Kulturbedingungen (vgl. Tab. 1 und Tab. 4) ergaben eine Isomerenzusammensetzung, die innerhalb sehr enger Grenzen schwankt. Wir dürfen daraus schliessen, dass die Variation der relativen Anteile der einzelnen Isomeren nicht durch die Methode bedingt ist, sondern eben durch verschiedene Kulturbedingungen beeinflusst werden kann. Durch dünnschicht- sowie papierchromatographische Fleckenvergleiche fanden wir, dass *Clitocybe rivulosa* in Schikankolben mit Nährmedium Nr. 1 während 35 Tagen am meisten Muscarine produzierte. Die Unterschiede in der Muscarinproduktion eines Organismus unter verschiedenen Kulturbedingungen sind jedoch geringer als zwischen verschiedenen Arten und Stämmen der gleichen Art unter gleichen Kulturbedingungen. Von *Clitocybe dealbata*, Stamm ETH Nr. 2606, in deren Fruchtkörpern Muscarine nachgewiesen werden konnten (vgl. STADELMANN, 1976) konnten wir in Reinkultur keine Muscarine mehr erhalten. Die Fähigkeit eines Pilzes, Muscarin zu bilden, ist offenbar in hohem Grade genetisch bedingt; und die Umwelt, d. h. ökologische Faktoren, üben auf diese Fähigkeit einen geringen Einfluss aus. Eine weitere Bestätigung dieser Annahme liefern die Untersuchungen von HARMSSEN (1903) sowie EUGSTER und WASER (1954) mit Fruchtkörpern von *Amanita muscaria*; LOUP (1938), EUGSTER (1957, 1960, 1969) oder BROWN, MALONE, STUNTZ und TYLER (1962) mit Fruchtkörpern von *Inocybe*-Arten.

PORTE (1972) stellte in einigen Fällen fest, dass zwischen dem Gehalt der Fruchtkörper an Substanzen mit muscarinischer Aktivität von Arten aus der Gattung *Clitocybe* und dem Gehalt des aus Reinkulturen gewonnenen Mycels an solchen Substanzen keine Korrelation besteht. Auch fand sie z. T. erhebliche Unterschiede in der Produktion an Toxinen eines Stammes unter verschiedenen Kulturbedingungen. Dabei testete sie allerdings nur wässrige Extrakte am biologischen Objekt und verglich dabei die auftretenden muscarinischen Aktivitäten miteinander. Diese Versuchsergebnisse sind auf Grund von zwei möglichen Fehlerquellen nicht schlüssig. Einerseits können in solchen Extrakten weitere Substanzen vorkommen, die z. B. auf Grund der Reaktion am freigelegten Froschherz, qualitativ und quantitativ gleiche Reaktionen wie Muscarin hervorrufen (z. B. Acyl-derivate des Cholins, EUGSTER, 1960; BROWN, MALONE, STUNTZ und TYLER, 1962). Andererseits ist die Fähigkeit eines Pilzes, stereoisomere Muscarine in Reinkultur zu bilden, im Gegensatz zum Muscaringehalt, wie diese

Arbeit zeigt, offensichtlich in ausgeprägtem Masse von den Kulturbedingungen abhängig (vgl. auch die Untersuchungen von STADELMANN (1976) mit Fruchtkörpern verschiedener Kollektionen von *Clitocybe dealbata*). WASER (1955) und GYERMEK und UNNA (1958) fanden nämlich, dass die Wirkungsstärke von stereoisomeren Muscarinen an der Katze, an Kaninchen, an der Maus und am isolierten Froshherz bis tausendfach geringer als diejenige von (+)-Muscarin ist.

Die Abhängigkeit der Bildung von Stereoisomeren von den ökologischen Bedingungen könnte in einigen Fällen erklären, warum in der Natur eine bestimmte Muscarin-produzierende Art das eine Mal in giftiger und dann wieder in ungiftiger Form auftritt. So wird z. B. in älterer Literatur *Clitocybe dealbata* als essbar bezeichnet (NUESCH, 1926; GUESSOW und ODELL, 1927).

Über den Wert von *Mycena pura* lesen wir bei MICHAEL/HENNIG (1964): essbar, galt früher als giftig. Bei SCHLITTLER und WALDVOGEL (1972) steht: essbar, aber nur im Wert eines Mischpilzes. THELLUNG (1938), HEIM (1963), MAKARA (1971) und HERRMANN (1971) berichten hingegen über mittelschwere Vergiftungsfälle durch *Mycena pura*, deren Abläufe auf Muscarinintoxikationen schliessen lassen.

Literaturverzeichnis

- BOLLINGER, H. und EUGSTER, C. H. (1971a). Nachweis von (+)-epi-Muscarin in *Inocybe geophylla*. — Helv. Chim. Acta, **54**, 1332—1335.
- BOLLINGER, H. und EUGSTER, C. H. (1971b). Konfigurative Zusammenhänge in der Muscarinreihe; Chiralität des epi-, allo- und epiallo-Muscarins, des Muscarons und allo-Muscarons. Zur Biogenese des Muscarins. — Helv. Chim. Acta, **54**, 2704—2730.
- BOLLINGER, H. (1974). Konfigurative Zusammenhänge in der Muscarinreihe. Chiralität der enantiomeren epi-, allo- und epiallo-Muscarine, Muscarone und allo-Muscarone. Zur Biogenese des Muscarins. — Diss. Universität Zürich.
- BROWN, J. K., MALONE, M. H., STUNTZ, D. E., and TYLER, Jr., V. E. (1962). Paper chromatographic determination of muscarine in *Inocybe* species. — J. Pharm. Sci., **51**, 853—856.
- BURTON, S. D., KELLEHER, W. J., and SCHWARTING, A. E. (1965). Isolation of a compound with muscarinic activity from mycelium of *Clitocybe rivulosa* grown in surface culture. — Lloydia, **28**, 260.
- BURTON, S. D. (1969). Production and isolation of muscarine from surface cultures of *Clitocybe rivulosa*. — Diss. Oregon State; Univ. Microfilm 70/15'528.
- CATALFOMO, P. und EUGSTER, C. H. (1970). Muscarine and muscarine isomers in selected *Inocybe* species. — Helv. Chim. Acta, **53**, 848—851.
- CORRODI, H., HARDEGGER, E., und KÖGL, F. (1957). Über Muscarin. Herstellung von racemischem Allomuscarin. — Helv. Chim. Acta, **40**, 2454—2461.
- EUGSTER, C. H. und WASER, P. G. (1954). Zur Kenntnis des Muscarins. — Experientia, **10**, 298—300.
- EUGSTER, C. H. (1956). Über Muscarin aus Fliegenpilzen. — Helv. Chim. Acta, **39**, 1002—1023.

- EUGSTER, C. H. (1957). Isolierung von Muscarin aus *Inocybe Patouillardii* (Bres.). — Helv. Chim. Acta, **40**, 886—887.
- EUGSTER, C. H., 1960: Was ist Muscarin? — Schweiz. Z. f. Pilzk., **38**, 37—44.
- EUGSTER, C. H. und SCHLEUSENER, E. (1969): Stereoemere Muscarine kommen in der Natur vor. Gaschromatographische Trennung der Norbasen. — Helv. Chim. Acta, **52**, 708—715.
- EUGSTER, C. H. (1969). Chemie der Wirkstoffe aus dem Fliegenpilz, *Amanita muscaria*. — Fortschr. Chem. org. Naturstoffe (Ed. L. Zechmeister), **27**, 261—321.
- GÜSSOW, H. T. und ODELL, W. S. (1927): Mushrooms and Toadstools. — Ministry of Agriculture, Ottawa, Ontario, Canada, 58 S.
- GYERMEK, L. und UNNA, K. R. (1958). Relation of structure of synthetic muscarines and muscarones to their pharmacological action. — Proc. Soc. Exp. Biol., N. Y., **98**, 882—885.
- HARMSSEN, E. (1903). Zur Toxikologie des Fliegenschwammes. — Arch. exp. Path. Pharm., **50**, 361—452.
- HEIM, R. (1963). Les champignons toxiques et hallucinogènes. — N. Boubée & Cie, Paris, S. 262.
- HERRMANN, M. (1971). Der Rettichhelmling — *Mycena pura* (Pers. ex Fr.) Kummer — ist giftig! — Mykol. Mitteilungsblatt (Halle), **17**, (1), 17—18.
- HOAGLAND, D. R. und SNYDER, W. C. (1933). Nutrition of strawberry plant under controlled conditions. — Amer. Soc. Hort. Sci., **30**, 288—293.
- ISHIDA, Y., and KOZU, Y. (1949). Pure culture of toadstools. I. *Inocybe rimosa*. Oyo Kingaku (J. Applied Mycol.) **3**, 118—130, zit. nach Chem. Abstracts, **44**, 9522 (1950).
- LOUP, C. (1938). Contribution à l'étude toxicologique de trente trois espèces *Inocybes* de la région de Genève. — Université de Genève, Faculté de Médecine, Thèse 114.
- MAKARA, G. (1971). Essbar, als Mischpilz verwendbar, oder giftig? — Mykol. Mitteilungen, **III**, 138—139, Landesverein für Forstwesen, Mykol. Sektion, Budapest.
- MICHAEL, E. und HENNIG, B. (1964). Handbuch für Pilzfreunde. — Hellblättler und Leistlinge, **III**, S. 263, VEB, Gustav Fischer Verlag, Jena.
- NÜESCH, E. (1926). Die Trichterlinge. Monographie der Agariceen-Gattung *Clitocybe* mit Bestimmungsschlüssel. — F. Schwald Verlag, St. Gallen, 279 S.
- ODDOUX, L. (1955). Recherche sur les mycéliums secondaires des Homobasidiées en culture pure. Morphologie — Cytologie — Exigences alimentaires. — Diss. Université Lyon (Patissier éd. Trévoux).
- PORTE, M. (1972). Activité muscarinique chez les *Clitocybes*. Etude particulière de *Clitocybe festiva FAYRE*: Isolement de la muscarine. — Diss. Université Claude-Bernard, Lyon.
- SCHLEUSENER, E. und EUGSTER, C. H. (1970). Isolierung von (—)-allo-Muscarin aus *Amanita muscaria*. — Helv. Chim. Acta, **53**, 130—131.
- SCHLITTLER, J. und WALDVOGEL, F. (1972). Die Pilze, Bd. I, Blätterpilze. — Silva Verlag, Zürich, S. 100.
- STADELMANN, R. J. (1976). Produktion von stereoisomeren Muscarinen in vitro sowie über deren Verbreitung innerhalb der Ordnung der Agaricales. — Diss. Eidg. Technische Hochschule, Zürich, Nr. 5694.
- STADELMANN, R. J., MÜLLER, E. und EUGSTER, C. H. (1976). Über die Verbreitung der stereomeren Muscarine innerhalb der Ordnung der Agaricales. — Helv. Chim. Acta, **59**, 2432—2436.
- SWENBERG, M.-L., KELLEHER, W. J. and SCHWARTING, A. E. (1967). Muscarine: Isolation from cultures of *Clitocybe rivulosa*. — Science, **155**, 1259.

- THELLUNG, F. (1938). Aussergewöhnliche Pilzvergiftung. — Schweiz. Z. f. Pilzk., **16**, 18—23.
- THIES, H. und REUTHER, F. W. (1954). Ein Reagens zum Nachweis von Alkaloiden auf Papierchromatogrammen. — Naturwissenschaften, **41**, 230—231.
- WASER, P. G. (1955). Fehlende ganglionäre (nikotinische) Wirkung des Muscarins. — Experientia, **11**, 452—453.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Sydowia](#)

Jahr/Year: 1976/1977

Band/Volume: [29](#)

Autor(en)/Author(s): Stadelmann R., Müller Emil, Eugster C. H.

Artikel/Article: [Muscarine \(Muscarin, epi- und allo-Muscarin\) aus dem Mycel von Amanita muscaria und von Clitocybe-Arten. 15-27](#)