Einfluß von Phosphat auf Fruktifikation und Sekundärmetabolismen der Myzelien von Psilocybe cubensis, Psilocybe semilanceata und Gymnopilus purpuratus

J. GARTZ

Institut für Biotechnologie der Akademie
der Wissenschaften der DDR
Permoserstraße 15, DDR-7050 Leipzig

Eingegangen am 20.5.1990

Gartz, J. (1990) – Influence of phosphate on fruiting and secondary metabolisms of mycelia of *Psilocybe cubensis, Psilocybe semilanceata* and *Gymnopilus purpuratus:* Z. Mykol. 57(1): 149–154.

Key Words: *Psilocybe cubensis, Psilocybe semilanceata, Gymnopilus purpuratus,* psilocybin, psilocin, baeocystin, phosphate, fruiting, mycelial cultures.

Abstract: Fruiting of *Psilocybe cubensis* (Earle) Sing. on a horse dung / rice-grain medium begins earlier than the formation of fruit bodies of *Psilocybe semilanceata* (Fr.) Kumm. from a similar solid substratum. Analysis of cultivated *Psilocybe semilanceata* revealed the presence of psilocybin and baeocystin which were in the same order of magnitude as the amounts of the alkaloides in the naturally grown mushrooms.

There was no variation of the psilocybin and baeocystin levels with repeated flushes from a single culture of *Psilocybe semilanceata.* The psilocybin, psilocin and baeocystin levels of laboratory grown fruit bodies of *Gymnopilus purpuratus* (Cooke & Mass.) Sing. were also in the same order of magnitude as that found in mushrooms from heaps of mixtures of pig dung and wood chips in the district Rostock.

The alkaloids were absent in cultivated mushrooms of the three species which were grown on phosphate containing media. No blueing of these mushrooms could be observed.

Under the same culture conditions, the fructification times and sizes of mushrooms were equal when the growth media also contained high concentrations of phosphate.

Zusammenfassung: *Psilocybe cubensis* (Earle) Sing. fruktifizierte auf einer Pferdedung/Reis-Mischung eher als *Psilocybe semilanceata* (Fr.) Kumm. von einem ähnlichen, festen Substrat.

Die Psilocybin- und Baeocystin-Mengen in kultivierten Fruchtkörpern der *Psilocybe semilanceata* lagen in den gleichen Größenordnungen wie in natürlich gewachsenen Pilzen vor, wobei sich die Mengen in den Pilzen aus verschiedenen Fruktifikationswellen nicht wesentlich unterschieden.

Der Gehalt an Psilocybin, Psilocin und Baeocystin in kultivierten Pilzen des *Gymnopilus purpuratus* (Cooke & Mass.) Sing. war weitgehend mit den Mengen in den natürlichen Fruchtkörpern der Standorte des Bezirkes Rostock identisch, wo die Pilzart auf Mischungen aus Schweinegülle und Holzabfällen fruktifiziert.

Ein Zusatz von Phosphat zu den Nährmedien der drei Pilzarten verhinderte die Bildung der Alkaloide in den Fruchtkörpern.

Bei sonst gleichen Kulturbedingungen war die Kultivierungszeit und das Aussehen der jetzt nicht mehr blauenden Pilze identisch mit denen der Fruchtkörper von den Substraten ohne Phosphatzusatz.

In einer früheren Arbeit wurde nachgewiesen, daß die Variation der Kulturbedingungen der *Psilocybe cubensis* (Earle) Singer Auswirkungen auf die Morphologie der Fruchtkör-

per sowie deren Gehalt an Indolderivaten hat Gartz 1987). Weiterhin konnte gezeigt werden, daß auch in Oberflächenkulturen der gleichen Pilzart durch zunehmenden Anteil an Malzextrakt in den Nährlösungen schließlich die Fruktifikation unterdrückt wird und gleichzeitig eine Reduktion des Gehaltes an Psilocybin und Psilocin resultiert (Gartz 1989c).

Durch Zugabe von synthetischen Tryptaminderivaten läuft bei gleichzeitiger Unterdrükkung der Synthese dieser beiden Alkaloide in den Myzelien eine Biotransformation zu neuen indolischen Inhaltsstoffen ab (Gartz 1989b).

Mikrobielle Sekundärstoffsynthesen werden durch die angebotene Menge an Phosphat in den Kulturmedien entscheidend mitbeeinflußt, wobei ein Überschuß bei niederen Pilzen, z. B. die Antibiotikabildung, völlig inhibieren kann (Gräfe 1988).

In dieser Arbeit wird der Einfluß von Phosphat auf die Fruktifikation von *Psilocybe cubensis* und *Psilocybe semilanceata* (Fr.) Kumm. sowie auf deren Alkaloidgehalt untersucht.

Da in jüngster Zeit Psilocybin und seine Derivate Psilocin und Baeocystin auch in *Gymnopilus purpuratus* (Cooke & Mass.) Sing. nachgewiesen werden konnten (Gartz 1989b;Kreisel & Lindequist 1988) und es uns gelang, von der Pilzart Myzelkulturen anzulegen (Gartz & Müller 1990), wurde diese Pilzart in die Untersuchungen ebenfalls mit einbezogen.

Material und Methoden

Die Isolierung der verwendeten Stämme von *P. cubensis* (Gartz 1987; 1989b, c), *P. semilanceata* (Gartz 1989b) und *G. purpuratus* (Gartz & Müller 1990) sowie auch deren Eigenschaften wurden bereits ausführlich beschrieben.

Fruktifikationsversuche

Nach der entsprechenden Vorkultur auf 60%igem Malzagar wurden zur Fruktifikation verschiedene, autoklavierte Medien benutzt, wobei mit Myzelsuspension beimpft wurde (Gartz 1987).

Alle Versuche wurden jeweils mit und ohne Zusatz von 0,6 g KH_2PO_4 pro 100 g Nährboden durchgeführt. Zur Fruktifikation von *G. purpuratus* wurde ein Gemisch aus Reiskörnern und Wasser (1:2) verwendet (Gartz 1987), während *P. cubensis* auf einem Gemisch von Pferdedung / Reis / Wasser (1:2:6) bei 23°C leicht fruktifizierte.

Ein Gemisch aus Grassamen / Reiskörnern und ca. 1 Jahr auf einer Weide liegenden Kuhdung unter Zusatz von Wasser (2:1:1:7) diente zur Kultur der *P. semilanceata*. Der völlig durchwachsene Nährboden (3–4 Monate Kultur) fruktifizierte nach Abdecken mit einer feuchten, sterilen Mischung aus Torf und Calciumcarbonat (2:1) entsprechend einer Methode zur Kultivierung anderer Pilzarten (Stamets & Chilton 1983). Zur Vermeidung von Austrocknung wurde die Deckschicht alle 2 bis 3 Tage mit sterilem Wasser besprüht.

Alle Pilze wurden aseptisch mit einem gebogenen, scharfen Metallspatel geerntet und danach gefriergetrocknet.

Extraktion der Pilze und Analyse der Indolderivate

Zur Mittelwertbestimmung des Gehaltes an Indolderivaten erfolgte die gemeinsame Pulverisierung der Pilze von den entsprechenden Fruktifikationswellen. Die Extraktion mit Methanol und die nachfolgenden Analysen mit HPLC und DC wurden bereits beschrieben (Gartz 1985, 1987; Semerdzieva & al. 1986).

Ergebnisse und Diskussion

P. cubensis bildete auf dem Pferdedung / Reisgemisch Fruchtkörper aus (Abb. 1), die robuster als die von Malzagar und Reismedium waren (Gartz 1987). Gegenüber den Pilzen vom entsprechenden Kuhdungsubstrat Gartz 1989b) unterschieden sich die Fruchtkörper durch breitere und weniger kegelige Hüte und durchschnittlich 50 % höhere Trockenmassen. Als weitere Auffälligkeit hatten die Pilze von beiden Dungsubstraten braunere Hüte als die vom Agar oder Reis. Bei Zusatz von Phosphat zum Nährmedium

wurden morphologisch gleiche Pilze nach 3 bis 4 Wochen Kulturzeit erhalten, die jedoch keine blauen Verfärbungen mehr zeigten. In früheren in-vitro-Versuchen konnte gezeigt werden, daß Psilocin zu blauen Produkten oxydiert wird und in Pilzen mit spontaner, blauer Verfärbung großer Intensität der Gehalt an Indolderivaten signifikant sinkt (Gartz 1989c). Neal & al. (1968) untersuchten den Einfluß von Phosphationen auf die Psilocybinbildung bei der submersen Kultur der *P. cubensis* und wiesen bei Substanzüberschuß eine Reduktion der Alkaloidkonzentrationen in den gewonnenen Pellets nach.

Die Konzentrationen an Indolderivaten in Pilzen vom Substrat ohne Phosphatzusatz (Tab. 1) überstiegen die Mengen an Metaboliten in den Fruchtkörpern vom Agar bzw. Reis (Gartz 1987, vgl. auch Beug & Bigwood 1982).

Die Kulturansätze der *P. semilanceata* fruktifizierten erheblich später als die Myzelien von *P. cubensis* (Abb. 2).

Über die Kultur der Pilzart existieren in der Literatur nur spärliche Angaben. So erwähnen Hofmann & al. (1963), daß die *Psilocybe*-Art auf Kompost fruktifiziert, wobei die Pilze sich im Alter völlig blau verfärbten. In den eigenen Versuchen blaute das ebenfalls langsamer als *P. cubensis* wachsende Myzel nach Verletzung innerhalb einer Stunde nur sehr geringfügig, enthielt aber ca. 0,2 % Psilocybin neben Baeocystinspuren. Die Myzelien, die im Kühlschrank vorher auf dem gleichen Nährboden gewachsen waren, zeigten jedoch eine kräftige blaue Verfärbung innerhalb weniger Minuten nach Abtrennung eines Stückes mittels Spatels. Weiterhin beschreiben Repke & al. (1977) die Kultur auf kompostierten Eichenästchen, die sogar 84 Wochen (!) dauerte. Auffällig war weiterhin in dieser Untersuchung, daß die kultivierten Pilze erheblich weniger Baeocystin enthielten als die Fruchtkörper von natürlichen Weidestandorten. Die Konzentrationen an Psilocybin und Baeocystin in den Pilzen aus den eigenen Kulturversuchen lagen dagegen völlig im Bereich der natürlich vorkommenden Fruchtkörper aus der Dübener Heide (Tab. 2) (Gartz 1989b; Semerdzieva & al. 1986). Im Gegensatz zu den beiden anderen Pilzarten wurden nur 4 Fruktifikationswellen beobachtet. Psilocin ließ sich in der 3. und 4. Welle lediglich in Spuren, in den anderen überhaupt nicht nachweisen.

Sonst enthielten die Pilze die üblichen Mengen um 1 % Psilocybin, im Gegensatz zu *P. cubensis* waren die Mengen in den einzelnen Fruktifikationswellen aber sehr ähnlich (Gartz 1987).

Stamets & Chilton (1983) zeigten in ihrem Werk über Kulturpilze ebenfalls die Myzelien von *P. semilanceata* beim Durchwachsen von Weizenstroh, machten jedoch keine weiteren Angaben zur Kultur und Fruktifikation. Schließlich gibt es auch Berichte über die Kultur der Pilzart auf Stroh aus Finnland und Italien (Müller und Bianchi, mündl.).

In Analogie zu *P. cubensis* (Gartz 1987) kommen auch bei *P. semilanceata* unvollkommen entwickelte Fruchtkörper vor, die nach dem Wachstumsstop sich bläulich verfärbten.

Der Zusatz des Phosphates zum Substrat bewirkte ebenfalls keine Entwicklungsverzögerung, inhibierte jedoch die Bildung der Alkaloide in den jetzt ebenfalls nicht mehr blauenden Pilzen.

In Analogie zu den früheren Versuchen (Gartz & Müller 1990) fruktifizierten die Myzelien des *G. purpuratus* auf den Reiskörnern nach ca. 9 Wochen ohne Anwendung einer Deckschicht (Abb. 3). Die Pilze enthielten wie die natürlich vorkommenden Fruchtkörper (Gartz 1989 a) neben wenig Baeocystin etwa gleiche Mengen an Psilocybin und Psilocin (Tab. 3). Auch bei diesen Kulturversuchen trat eine Inhibierung der Biosynthese der Sekundärmetaboliten durch Phosphat auf. Diese Pilze zeigten dann ebenfalls keine Blauung mehr. Obwohl die Fruktifikation etwa 1 Woche später begann als bei den Ansätzen ohne

Phosphatzusatz, läßt sich die Verzögerung eher aus der durch äußere Umstände bedingten, etwa 3°C niedrigeren Kultivierungstemperatur (20°C) erklären.

Die Kulturversuche der 3 Pilzarten beweisen, daß im Einklang mit den früheren Submersversuchen der *P. cubensis* (Neal & al. 1968) ein Überschuß an Phosphat die Synthese der Sekundärmetabolite hemmt, obwohl Psilocybin und Baeocystin im Molekül Phosphatgruppierungen beinhalten. Es ist jedoch möglich, daß es auch Phosphat unempfindliche Stämme der hier untersuchten und auch weiterer Pilzarten, die die Alkaloide bilden, gibt. Ein analoges Verhalten ist für die Antibiotikabildung von einzelnen Schimmelpilzen bekannt (Gräfe 1988). Das vegetative Wachstum von Pilzmyzelien niederer Pilze wird dagegen durch Zusatz von Phosphat nicht gehemmt (Gräfe 1988). Im Gegensatz zu früheren Auffassungen ist man heute der Meinung, daß der Sekundärstoffwechsel eine Bedeutung für Pflanzen und Mikroorganismen besitzt. Er soll u. a. durch eine entsprechende Effektorproduktion die langzeitige Adaption des Organismus durch Förderung der Zytodifferenzierung erleichtern, wobei seine Funktionen auf bestimmte Entwicklungsstadien beschränkt sind (Gräfe 1988).

Die Untersuchungen zur Inhibierung dieser Stoffwechselwege durch Phosphat bei *P. cubensis, P. semilanceata* und *G. purpuratus* beweisen jedoch, daß die Differenzierung der Myzelien zu den Fruchtkörpern durch den Sekundärstoffwechsel unter Bildung der Indolderivate nicht signifikant beeinflußt wird.

Herrn Gerhard Drewitz, Caputh, sei herzlich für seine Diskussionen gedankt.

Literatur

BIGWOOD, J. & M. W. BEUG (1982) – Variation of psilocybin and psilocin levels with repeated flushes (harvests) of mature sporocarps of *Psilocybe cubensis* (Earle) Singer. J. Ethnopharm. 5: 287–291.

GARTZ, J. (1985) – Zur Untersuchung von *Psilocybe semilanceata* (Fr.) Kumm. Pharmazie 40: 506.

– (1987) – Variation der Indolalkaloide von *Psilocybe cubensis* durch unterschiedliche Kultivierungsbedingungen. Beiträge zur Kenntnis der Pilze Mitteleuropas 3: 275–281.

– (1989a) – Occurrence of psilocybin, psilocin and baeocystin in *Gymnopilus purpuratus*. Persoonia 14: 19–22.

– (1989b) – Biotransformation of tryptamine derivatives in mycelial cultures of *Psilocybe*. J. Basic Microbiol. 29: 347–352.

– (1989c) – Bildung und Verteilung der Indolalkaloide in Fruchtkörpern, Mycelien und Sklerotien von *Psilocybe cubensis*. Beiträge zur Kenntnis der Pilze Mitteleuropas 5: 167–174.

– & G. K. MÜLLER (1990) – Untersuchungen zur Myzelkultur von *Gymnopilus purpuratus*, Purpurflämmling. Mykologisches Mitteilungsblatt 33: 29–30.

GRÄFE, U. (1988) – Biotechnologische Produktion mikrobieller Wirkstoffe: ein Beispiel für die Nutzung des Adaptionspotentials von Mikroorganismen. Acta biotechnol. 8: 3–20.

HOFMANN, A., R. HEIM & H. TSCHERTER (1963) – Présence de la psilocybine dans une espéce européene d'Agaric, le *Psilocybe semilanceata*. Compt. Rend. 257: 10–12.

KREISEL, H. & U. LINDEQUIST (1988) – *Gymnopilus purpuratus*, ein psilocybinhaltiger Pilz adventiv im Bezirk Rostock. Z. Mykol. 54: 73–76.

NEAL, J. M., R. G. BENEDICT & L. R. BRADY (1968) – Interrelationsship of phosphat nutrition, nitrogen metabolism and accumulation of key secondary metabolites in saprophytic cultures of *Psilocybe cubensis, Psilocybe cyanescens* and *Panaeolus campanulatus*. J. Pharm. Sci. 57: 1661–1667.

REPKE, D. B., D. T. LESLIE & G. GUZMAN (1977) – Baeocystin in *Psilocybe, Conocybe* and *Panaeolus*. Lloydia 40: 566–578.

SEMERDZIEVA, M., M. WURST, T. KOZA & J. GARTZ (1986) – Psilocybin in Fruchtkörpern von *Inocybe aeruginascens*. Planta Med. 47: 83–85.

STAMETS, P. & J. S. CHILTON (1983) – The mushroom cultivator. Agarikon Press, Olympia: 125.

Tabelle 1: Gehalt an Indolderivaten von *Psilocybe cubensis* aus der Kultur auf Pferdedung/Reis-Gemisch (%, berechnet auf die Trockenmassen)

Fruktifikationswelle	Psilocybin	Psilocin
1.	0,61	–
2.	0,53	0,11
3.	0,45	0,09
4.	0,60	0,15
5.	0,38	0,22

Tabelle 2: Gehalt an Psilocybin und Baeocystin von Fruchtkörpern der *Psilocybe semilanceata* vom Mischsubstrat ohne Phosphatzusatz (%, berechnet auf die Trockenmassen)

Fruktifikationswelle	Psilocybin	Baeocystin
1.	0,91	0,15
2.	1,02	0,18
3.	0,93	0,13
4.	0,98	0,22

Tabelle 3: Indolderivate in Fruchtkörpern von *Gymnopilus purpuratus* auf feuchten Reiskörnern (%, berechnet auf die Trockenmassen)

Fruktifikationswelle	Psilocybin	Psilocin	Baeocystin
1.	0,13	0,15	0,03
2.	0,15	0,18	0,02
3.	0,23	0,21	0,04
4.	0,18	0,21	0,05
5.	0,15	0,14	0,02

Abb. 1: Kultur der *Psilocybe cubensis* auf Pferdedung/Reis-Gemisch

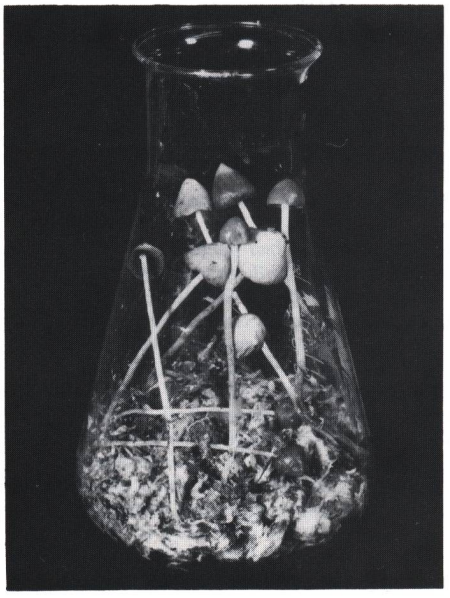

Abb. 2: *Psilocybe semilanceata* auf Grassamen/Reis/Dung/Wasser-Mischung

Abb. 3: Fruktifikation des *Gymnopilus purpuratus* auf feuchten Reiskörnern

Deutsche Gesellschaft für Mykologie e.V.
German Mycological Society

Dieses Werk stammt aus einer Publikation der **DGfM**.

www.dgfm-ev.de

Über Zobodat werden Artikel aus den Heften der pilzkundlichen Fachgesellschaft kostenfrei als PDF-Dateien zugänglich gemacht:

- **Zeitschrift für Mykologie**
  Mykologische Fachartikel (2× jährlich)
- **Zeitschrift für Pilzkunde**
  (Name der Heftreihe bis 1977)
- **DGfM-Mitteilungen**
  Neues aus dem Vereinsleben (2× jährlich)
- **Beihefte der Zeitschrift für Mykologie**
  Artikel zu Themenschwerpunkten (unregelmäßig)

Dieses Werk steht unter der Creative Commons Namensnennung - Keine Bearbeitungen 4.0 International Lizenz (CC BY-ND 4.0).

- **Teilen:** Sie dürfen das Werk bzw. den Inhalt vervielfältigen, verbreiten und öffentlich zugänglich machen, sogar kommerziell.
- **Namensnennung:** Sie müssen die Namen der Autor/innen bzw. Rechteinhaber/innen in der von ihnen festgelegten Weise nennen.
- **Keine Bearbeitungen:** Das Werk bzw. dieser Inhalt darf nicht bearbeitet, abgewandelt oder in anderer Weise verändert werden.

Es gelten die vollständigen Lizenzbedingungen, wovon eine offizielle deutsche Übersetzung existiert. Freigebiger lizenzierte Teile eines Werks (z.B. CC BY-SA) bleiben hiervon unberührt.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: Zeitschrift für Mykologie - Journal of the German Mycological Society

Jahr/Year: 1991

Band/Volume: 57_1991

Autor(en)/Author(s): Gartz Jochen Ernst Friedrich

Artikel/Article: Einfluß von Phosphat auf Fruktifikation und Sekundärmetabolismen der Myzelien von Psilocybe cubensis, Psilocybe semilanceata und Gymnopilus purpuratus 149-154