

Proč houby tvoří krystaly?

Netradiční otázka v názvu článku přímo vybízí k pochybám o překlepu nebo autorově omylu. Houby tvoří ledacos – od mikroskopického vegetativního mycelia přes okem viditelné specializované myceliální útvary až po plodnice, plodnicím podobné útvary a ložiska (u rzí). Kromě toho mohou na povrchu mycelia nebo plodnic vylučovat organické i anorganické sloučeniny, které za určitých podmínek krystalizují. To je skutečnost málo známá, ačkoli byla poprvé pozorována před více než 130 lety. V r. 1878 zaznamenal francouzský botanik a mykolog Philippe E. L. Van Tieghem drobné krystaly na myceliu spájkivých hub (*Zygomycota*) v kultuře. Autor se sice stanoví jejich chemického složení dále nevěnoval, hodnotný je ale i samotný popis tohoto jevu. V r. 1887 pozoroval německý mykolog Heinrich A. de Bary bílé krystaly šťavelanu vápenatého na povrchu mycelia pečárky polní (*Agaricus campestris*). Tato dvě pozorování stála na počátku mnoha studií, které odhalily fenomén, jenž ukazuje mimo jiné šíři spektra metabolitů produkovaných houbami.

Krystaly a krystalizace

Nejprve ale krátce o krystalech. Jsou to pevné látky, které mají své stavební částice (ionty, atomy nebo molekuly) spojeny do stavebních jednotek pravidelně uspořádaných v opakujícím se vzoru. Ten se zachovává i na velké vzdálenosti – relativně vůči velikosti stavební jednotky. Uspořádání částic v krystalu je z energetického hlediska výhodnější a většina látek krystalizuje, nebo má alespoň tendenci při nízké teplotě krystalizovat. Pro strukturu krystalu není důležitý ani tak vnější vzhled s charakteristickými se sbíhajícími plochami, jako jeho vnitřní struktura. U čistých krystalů dosahujících minimálně milimetrových rozměrů ji můžeme určit pomocí rentgenové krystalografie – metody založené na rozptylu (difrakci) rentgenových paprsků po průchodu krystalem. Podle rozložení atomů ve stavební částici krystalu dojde k charakteristickému rozptylu a na jeho základě lze rekonstruovat strukturu částice i její chemické složení. Tímto způsobem můžeme určit stavbu i složitých organických látek. O vysokém významu této metody svědčí, že Francis H. C. Crick, James D. Watson a Maurice H. F. Wilkins získali v r. 1962 Nobelovu cenu za určení molekulární struktury nukleových kyselin právě pomocí rentgenové krystalografie. Dalším způsobem uplatňujícím se zejména při studiu organických látek je např. využití hmotnostní spektrometrie.

Biogenní minerály

Ke krystalizaci různých sloučenin může docházet na povrchu mycelia nebo v jeho bezprostřední blízkosti a v různých částech plodnic. Krystaly vznikají vysrážením vylučovaných látek po reakci s dalšími chemickými prvky v prostředí, nebo krystalizací samotné sloučeniny produkované v dostatečném množství a v optimál-

ních podmínkách. Takto vytvořené minerály označujeme jako biogenní, přesněji mykogenní, tedy vzniklé činností hub.

Nejdříve si přiblížíme první případ. Většina druhů hub vytváří a vylučuje do svého okolí slabé organické kyseliny. Kyselina šťavelová, jablečná a glukuronová jsou těmi nejčastějšími. Jejich produkce má rozličný význam pro různé ekologické skupiny hub. Půdní druhy rozpouštějí svými kyselinami anorganické sloučeniny v okolí mycelia, a zvyšují tak dostupnost fosforu, síry a dalších prvků, u dřevokazných druhů zase organické kyseliny stimuluji funkci některých enzymů účastnících se rozkladu dřevní hmoty. Současně s rozpouštěním anorganických sloučenin mohou kationty přítomné v půdě reagovat s vylučovanými kyselinami a tím dochází k jejich vysrážení. Vznikají tak sekundární biogenně vzniklé minerály, které se v podobě mikroskopických krystalů ukládají uvnitř mycelia, na jeho povrchu, nebo v těsné blízkosti (viz obr. na 2. str. obálky). Když H. A. de Bary pozoroval krystaly šťavelanu vápenatého na myceliu pečárky polní, odhalil tak zřejmě nejčastější minerál tvořený houbami. Šťavelan vápenatý vzniklý činností hub se v přírodě vyskytuje buď jako dihydrát (minerál weddellit), nebo jako monohydrát (whewellit). Vlivem produkce oxidu uhličitého dochází v okolí hyf i ke krystalizaci uhličitánů, především uhličitanu vápenatého (kalcit). Po odumření a rozložení mycelia zůstávají biogenně vzniklé krystaly šťavelanu a uhličitanu vápenatého přítomny v půdě a představují významný dlouhodobý rezervoár půdního vápníku a velmi důležitý článek v jeho globálním cyklu.

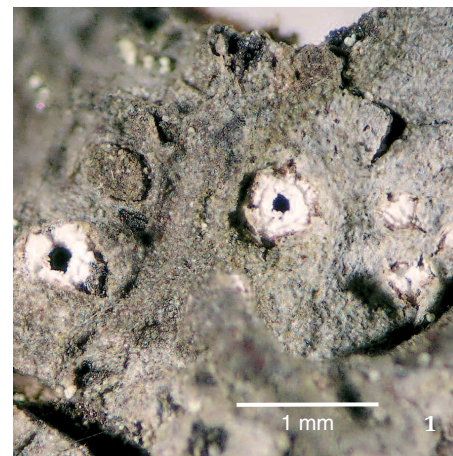
Další minerály vznikají reakcí kyseliny šťavelové s kationty kovů, které jsou ve vyšších koncentracích toxické (mědi, zinku, kadmia a olova). Nerozpuštěné šťavelany mohou chránit mycelium a v podstatě

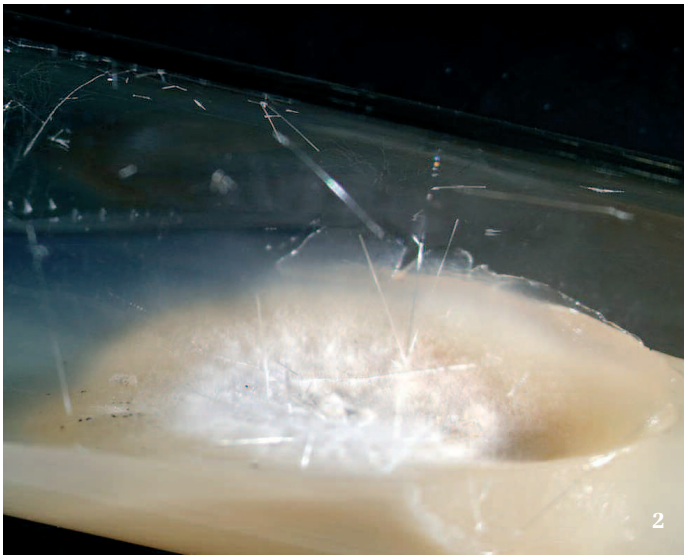
i další mikroorganismy před přijímáním těchto kovů. Chráněny jsou i rostliny tvořící mykorhizní symbiózu s houbami, neboť jejich houbový partner takto může zabránit vstupu toxického kovu do rostliny. V neposlední řadě byly tyto krystaly zaznamenány i ve stélce lišejníků, které rostou na povrchu hornin s vysokým přirozeným obsahem měďnatých minerálů. Na těchto substrátech byla u některých druhů lišejníků pozorována tvorba uhličitnanu měďnatého (minerál malachit).

Krystaly v taxonomii

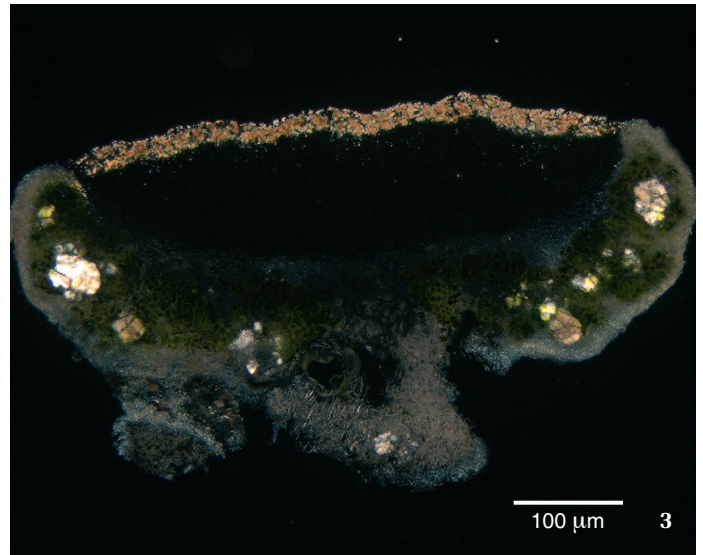
Morfologie krystalů minerálních látek uložených na povrchu i uvnitř těl se využívá při určování různých skupin živočichů (krytenek, žahavců, měkkýšů a dalších). Stejně tak krystaly tvořené v plodnicích hub (vřeckovýtusných – *Ascomycota* i stopkovýtusných – *Basidiomycota*) jsou velmi významné v jejich taxonomii. U vřeckovýtusných hub je nacházíme především ve svrchní vrstvě (excipulu) miskovitých plodnic (apotecií) a na povrchu specializovaných hyf (parafýz), které vyplňují prostor mezi vřecky. Např. u rodu *Stictis*, jehož apotecia prorážejí dřevo a borku na větších dřevin, nebo epidermis na bylinných lodyhách, je vrstva s krystaly šťavelanu vápenatého v excipulu velice výrazná a viditelná jako bílý okraj kolem apotecia (obr. 1). U lichenizovaných hub, tedy lišejníků, hrají krystaly významnou roli v taxonomii několika rodů, přičemž záleží na jejich velikosti, rozmístění a rozpustnosti v různých činidlech. Pilotní fylogenetické analýzy dokonce ukazují, že velikost krystalů šťavelanu vápenatého v excipulu plodnic u misničky (*Lecanora*, obr. 3) odpovídá fylogenetickému vývoji tohoto rodu.

U stopkovýtusných hub najdeme krystaly šťavelanu vápenatého na vrcholu specializovaných buněk (cystid) ve výtrusorodé vrstvě (hymeniu) některých druhů. Jejich přítomnost je charakteristická pro určité druhy, nebo i celé rody, jako je tomu např. u rodu vláknice (*Inocybe*, obr. 4). U mnoha dřevokazných hub byly rovněž pozorovány jednotlivé krystaly i srostlice šťavelanu vápenatého na vegetativním myceliu. Dokonce byly snahy využít morfologii těchto krystalů pro určování druhů, které kolonizují rozkládající se dřevo, ale netvoří v tu chvíli plodnice. Jak ale ukázalo srovnání krystalů na myceliu ve dřevě a v čisté kultuře, přítomnost krystalů a jejich morfologie jsou velmi proměnlivé, a tedy nevhodné pro identifikaci hub.





2



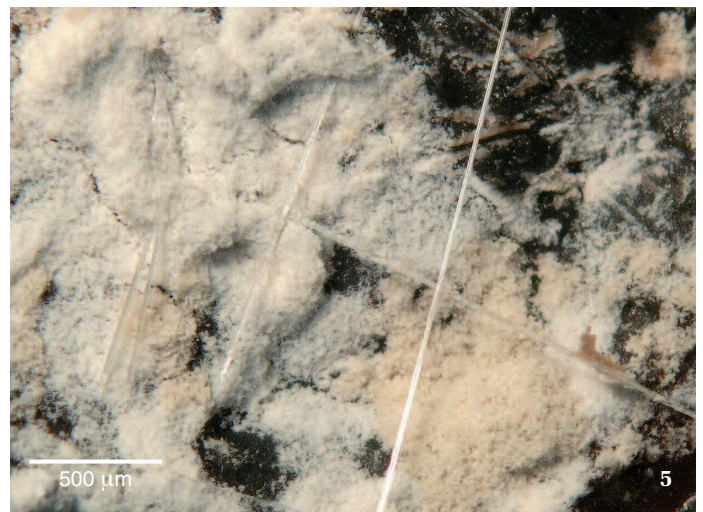
100 μm

3



20 μm

4



500 μm

5

1 Výrazný bílý okraj miskovité plodnice (apotecia) houby rodu *Stictis*, která proráží borku na větvičce borovice lesní (*Pinus sylvestris*).

2 Krystaly drosofilin A metyleteru trčí z mycelia špičky žíněné (*Marasmius androsaceus*) na šikmém agarovém médiu ve zkumavce.

3 Příčný řez apoteciem lišejníku misnička světlejší (*Lecanora chlorotera*) v polarizovaném světle. Velké bílé krystaly šťavelanu vápenatého jsou zřetelné ve svrchní vrstvě plodnice (excipulum). Foto J. Malíček

4 Shluky krystalů šťavelanu vápenatého na povrchu specializovaných buněk – cystid ve výtrusorodé vrstvě (hymeniu) vláknice tuřinonohé (*Inocybe napipes*)

5 Jehlicovité krystaly (+)-globulolu na povrchu mycelia stopkovýtusné houby *Quambalaria cyanescens*.

Foto M. Kolařík

Krystaly organických sloučenin

Trochu jinou kapitolu představují krystaly organické sloučeniny vylučované myceliem čistých kultur hub v laboratorních podmínkách. Aby mohla látka krystalizovat, potřebuje dosáhnout dostatečné koncentrace při optimální teplotě prostředí. U kultur hub dlouhodobě (až několik měsíců) uchovávaných ve zkumavkách na šikmé agarové půdě (obr. 2) při nižší teplotě (většinou 4–7 °C) jsou pro vznik krystalů teoreticky ideální podmínky. Na po-

vrchu mycelia se tvoří mikrofilm s roztokem houbových metabolitů, a pokud mají houby dostatek času a živin, aby dlouhodobě vylučovaly dostatečně velké koncentrace chemicky čisté sloučeniny, vznikají až okem viditelné krystaly. Ve skutečnosti to tak snadné samozřejmě není a s krystaly přímo na myceliu čistých kultur hub se setká málokterý mykolog.

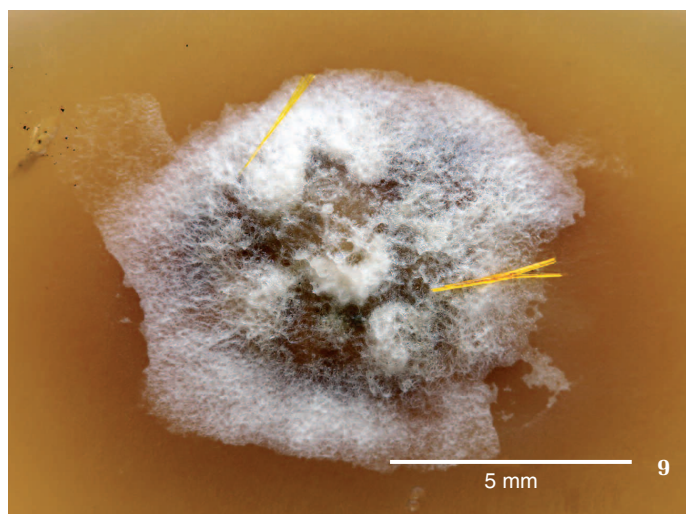
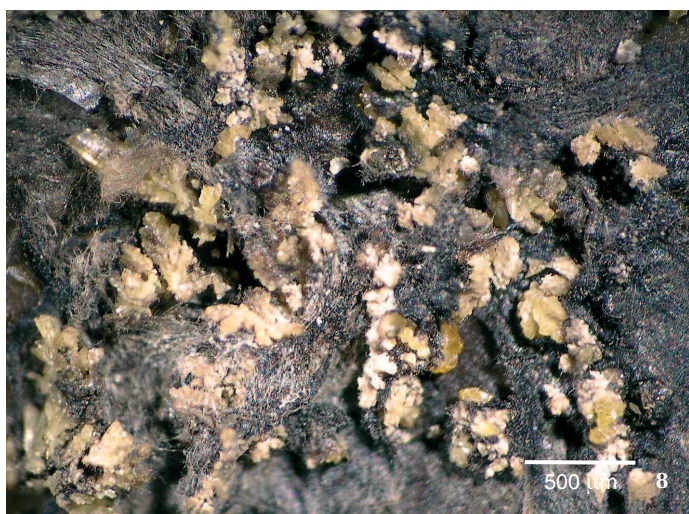
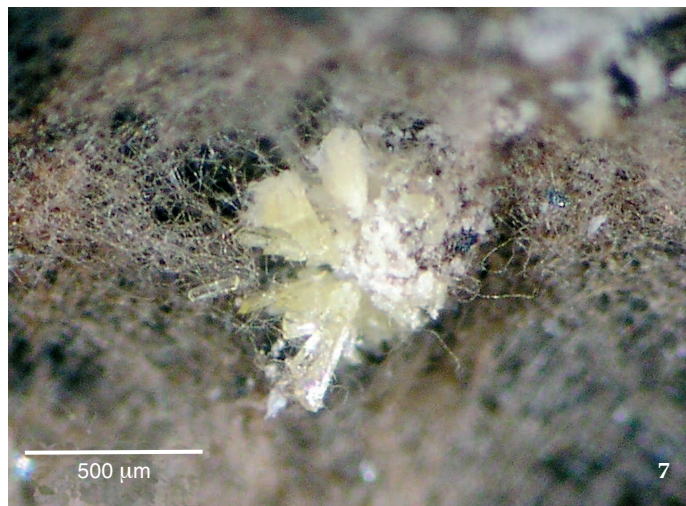
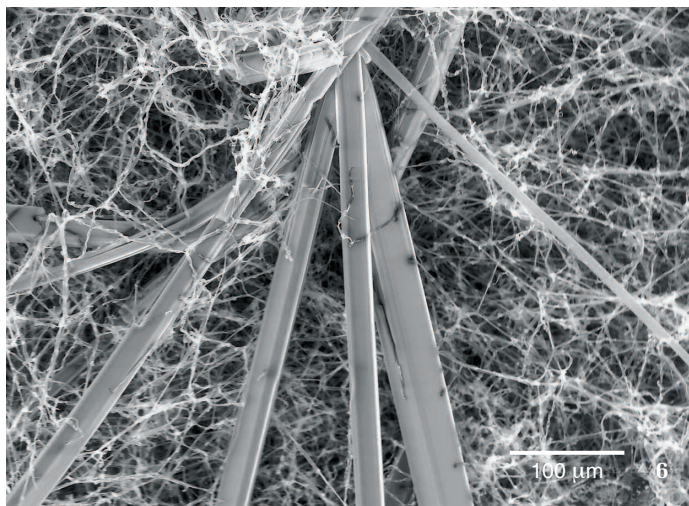
Ve dvou případech byly krystaly zjištěny v kulturách fytopatogenních druhů hub. V nedávno publikované studii (Grad a kol. 2009) zaměřené na mikroskopickou vřekovýtusnou houbu *Chalara fraxinea*, která napadá jasanu a způsobuje jejich chřadnutí, byly zaznamenány shluky bílých krystalů na myceliu. Hmotnostní spektrometrie ukázala, že jde o viridiol – organickou sloučeninu odvozenou ze stearanu a pojmenovanou podle mikroskopické houby *Trichoderma viride*, u níž byla produkce této látky poprvé zjištěna. Viridiol je silný přírodní herbicid. Ve stejné studii byl aplikován do řezné plochy větve jasanu a způsoboval na větvi nekrotické skvrny. Ve druhém případě byly zjištěny keříčkovité trsy krystalů přímo v médiu pod myceliem mikroskopické vřekovýtusné houby *Alternaria radicina*. Jejich základem byl keton radicinin, rovněž sloučenina s herbicidními účinky. V obou případech se krystaly tvořily vždy jen na některých izolátech daného druhu. To však nic neříká o produkci dané sloučeniny u ostatních izolátů, kde ji můžeme rovněž

předpokládat vzhledem k významu pro úspěšné napadání hostitelské rostliny.

Krystaly v kulturách nejsou doménou jen patogenních druhů hub. Bezbarvé jehlicovité krystaly dlouhé několik milimetrů vznikaly i na povrchu kultury mikroskopické stopkovýtusné houby *Quambalaria cyanescens* (obr. 5). Pomocí hmotnostní spektrometrie a rentgenové krystalografie byly identifikovány jako seskviterpenoid (+)-globulol. Tuto sloučeninu známe z listů, pupenů a kořenů zástupců řady rostlinných čeledí (cypřišovitě – *Cupressaceae*, myrtovitě – *Myrtaceae* a další), ale dosud pouze ze dvou druhů mikroskopických vřekovýtusných hub. V laboratorních pokusech měla výrazně fungicidní účinek a rostliny se jejím prostřednictvím zřejmě chrání před některými houbovými parazity. Její produkce u saprotrofních hub naopak ukazuje na potenciální účinek při soutěžení (kompetici) o substrát a živiny mezi různými druhy hub.

Houby z opadu

Sám jsem se setkal s několika případy, kdy krystaly tvořily saprotrofní mikroskopické houby izolované z opadu jehličnatých dřevin. Jako první jsem narazil na krystaly na špičce žíněné (*Marasmius androsaceus*). Na povrchu mycelia některých kolonií se tvořily bezbarvé, štíhlé a rovné krystaly dlouhé až několik milimetrů, které trčely jednotlivě nebo ve skupinách z různých míst na povrchu kolonie (obr. 2 a 6). Pro-



vedená krystalografická analýza ukázala, že jde o drosofilin A metyleter, sloučeninu se čtyřmi atomy chloru navázanými na benzenové jádro. O tom, že špička žíněná produkuje tuto látku, se ví už několik desítek let, stejně tak je známo několik dalších druhů hub, které drosofilin A tvoří. Pravděpodobně má antagonistický účinek proti jiným houbám, s nimiž může špička soupeřit o substrát. Při současné kultivaci dřevokazných hub *Phellinus fastuosus* a *Phlebia radiata* vzrostla desetinásobně produkce drosofilinu prvním druhem. Zajímavé však je, že špička rostoucí v čisté kultuře tvořila tuto antagonistickou sloučeninu rovněž ve vysokém množství, ačkoli jí žádná kompetice nehrozila. Podobně i v případě předchozích fytopatogenních druhů hub byly vylučovány herbicidní sloučeniny, i když houba nerostla v kontaktu se svým hostitelem.

Další krystaly ve žlutých trsech produkovaly tentokrát mikroskopickou houbou *Chalara microspora* (obr. 7 a 8) byly tvořeny sulochrinem – derivátem aromatického ketonu se dvěma benzenovými jádry. Sulochrin velmi efektivně brání funkci části bílých krvinek (eozinofilních granulocytů), které se účastní imunitní reakce proti alergenům a parazitům. Tato sloučenina vzniká i u dalších druhů hub, především zástupců rodů *Penicillium* a *Aspergillus*.

Poměrně dlouhé žlutooranžové krystaly (obr. 9) jsem zaznamenal také na myceliu houby, kterou nebylo možné určit podle morfologie, protože kultura po celou

dobu kultivace neprodukovala žádné spory. Sekvenování DNA ukázalo, že tento druh náleží do řádu *Helotiales* (vřeckovýtusné houby) a jeho krystaly se skládaly z asterrikvinonu, sloučeniny náležící mezi chinony, časté sekundární metabolity rostlin i hub. Z hlediska funkce je významná role asterrikvinonu jako potenciálního léku proti některým zhoubným nádorům a při léčbě AIDS.

Zvláštním případem je i vznik krystalů minerálu se jménem struvit (chemicky $\text{NH}_4\text{MgPO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), jenž byl dokumentován na myceliu některých keratinofilních hub (druhů schopných rozložit a využívat keratin jako zdroj uhlíku a dusíku). Celkem 9 druhů tvořilo krystaly struvitu na povrchu kultur rostoucích na médiu s keratinem a síranem hořečnatým. Struvit tak mohl vznikat ve velkých koncentracích díky dostatečné produkci amoniakových iontů z rozkládajícího se keratinu a přítomnosti hořečnatých iontů v médiu. Krystaly těchto nerostů tvořil i neznámý druh houby izolované z opadu borovice lesní (*Pinus sylvestris*) a kultivovaly několik měsíců na běžném agarovém médiu. Ani v tomto případě nebylo možné určit druh podle morfologie, ale sekvence DNA ukázala na příslušnost k čeledi *Venturiaceae* (vřeckovýtusné houby). Vysoká produkce struvitu vedoucí ke krystalizaci na myceliu je zřejmě možná pouze v laboratorních podmínkách, protože jak dusík, tak fosfor jsou za normálních okolností pro houby vzácnými prvky. V přírodě tedy struvit nalezneme především díky činnosti bakterií

6 Shluk krystalů drosofilinu A metyleteru na povrchu mycelia špičky žíněné ve skenovacím elektronovém mikroskopu. Foto J. Machač a O. Koukol

7 a 8 Trsy krystalů sulochrinu na povrchu mycelia vřeckovýtusné houby *Chalara microspora*

9 Jednotlivé krystaly asterrikvinonu na myceliu blíže neurčené vřeckovýtusné houby z řádu *Helotiales*. Snímky O. Koukoly, pokud není uvedeno jinak

při rozkladu živočišných zbytků (často je nalézán ve stokách a odpadních vodách) a při onemocnění močových cest některých živočichů, kde tvoří močové kameny (nejčastěji u psů, koček, ale někdy i u lidí).

Závěr

Krystalizace organických i anorganických sloučenin na myceliu a plodnicích hub představuje fenomén využívaný v taxonomii některých skupin a současně ukazující, že houby produkují nesmírně zajímavé látky. Předpokládá se, že vznik krystalů pomáhá houbám vypořádat se s negativními vlivy prostředí a zároveň má velký význam pro celý ekosystém. Krystalizace organických látek na myceliu v čistých kulturách ale zůstává náhodným a zřídka pozorovaným jevem, jenž závisí na řadě faktorů včetně podmínek kultivace. Rozhodně se na něj tedy nelze spoléhat při studiu nových biologicky aktivních látek produkovaných houbami.