

Zapobieganie zagrożeniom związanym
z występowaniem w ziarnie zbóż alkaloidów
pasożytniczego grzyba buławinki czerwonej (sporysz)



Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin
Państwowy Instytut Badawczy

Ekspertyza pod redakcją
dr Piotra Ochodzkiego

Radzików 2015

Spis treści

1. Wstęp	3
2. Historia sporyszu	4
2.1. Starożytność	4
2.2. Średniowiecze.....	5
2.3. Okres późniejszy.....	6
3. Biologia buławinki czerwonej <i>Claviceps purpurea</i>	9
4. Występowanie <i>Claviceps purpurea</i>	14
5. Alkaloidy sporyszu – budowa i aktywność biologiczna	15
5.1. Alkaloidy niskocząsteczkowe.....	16
5.2. Alkaloidy wysokocząsteczkowe	17
5.2.1. Grupa ergotaminy	18
5.2.2. Grupa ergotoksyny	18
5.3. Zatrucie sporyszem.....	19
6. Analiza zawartości sporyszu i jego alkaloidów.	19
7. Czynniki wpływające na zakażenia sporyszem	21
7.1 Charakterystyka kwiatostanu	22
7.2 Dostępność pyłku	22
7.3 Odporność roślin	23
7.4 Strategie hodowlane w hodowli odpornościowej przeciwko sporyszowi.....	24
7.5 Genetyczne i środowiskowe zmienności w zawartości alkaloidów.....	27
8. Metody zapobiegania i ograniczania obecności sporyszu w ziarnie zbóż	28
8.1. Prawidłowa agrotechnika.....	28
8.2. Zmianowanie	29
8.3. Kontrola dzikich traw, chwastów oraz samosiewów.....	29
8.4. Stosowanie kwalifikowanego materiału siewnego	29
8.5. Stosowanie fungicydów.....	29
8.6. Czyszczenie mechaniczne	30
9. Podsumowanie	300
Spis literatury	311

1. Wstęp

Bezpieczeństwo żywności staje się coraz istotniejszym elementem polityki państw Unii Europejskiej [1]. Żywność powinna być przede wszystkim bezpieczna, a dopiero w następnej kolejności należy oceniać inne jej cechy, takie jak wartość odżywcza czy walory smakowe.

Substancje mogące szkodzić zdrowiu ogólnie nazywamy toksynami. Takie toksyczne właściwości posiadają np. pestycydy, jony metali ciężkich (As, Zn, Cd, Cr, Cu, Hg, Pb, Sn, Co, Ni, Mn, Se, Fe i Ag), mogące powodować zatrucia przewlekłe lub ostre. Do bardzo niebezpiecznych zanieczyszczeń należą również dioksyny, polichlorowane bifenyle, o działaniu podobnym do dioksyn (PCB), wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (PAH), melamina, kwas erukowy, azotany, i inne [2].

Bardzo ważną grupą substancji szkodliwych są mikotoksyny, które są wtórnymi metabolitami wytwarzanymi przez grzyby. Obecnie znanych jest ponad 400 mikotoksyn, które w większym lub mniejszym stopniu szkodzą ludziom, zwierzętom i roślinom. Z tak szerokiego spektrum mikotoksyn szczególnie duże znaczenie posiada grupa, w skład której wchodzi mikotoksyny o najsilniejszym działaniu, jak na przykład aflatoksyny, lub najbardziej rozpowszechnione i mogące przez to w największym stopniu oddziaływać negatywnie na zdrowie zarówno ludzi jak też zwierząt, takie jak mikotoksyny z grupy trichotecenów (deoksyniwalenol, T-2 i HT-2 toksyny), fumonizyny, ochratoksyna A, patulina, zearalenon oraz alkaloidy sporyszu [3]. Substancje te bardzo intensywnie badano pod kątem ich występowania, mechanizmów oddziaływania na człowieka oraz stopnia szkodliwości.

W roku 2002 powołano Europejski Urząd do Spraw Bezpieczeństwa Żywności (European Food Safety Agency, EFSA), który na wniosek Komisji Europejskiej dla każdej z tych grup związków sporządzał wszechstronny raport [1]. Na podstawie raportów Unia Europejska wydała Rozporządzenie Komisji (WE) nr 1881/2006, określające najwyższe dopuszczalne poziomy tych zanieczyszczeń w środkach spożywczych. Rozporządzenie to było już wielokrotnie modyfikowane w zakresie poszczególnych substancji szkodliwych [3]. Równocześnie ustanowiono metody pobierania próbek do badań na obecność poszczególnych substancji toksycznych [4]. Normy unijne są również implementowane do prawodawstwa polskiego [5]. Podobnie jak dla żywności, limity ustanowiono również w przypadku pasz. Określono w nich górne dopuszczalne poziomy zarówno w surowcach używanych do produkcji pasz jak też w gotowych paszach [6].

Jedną z ważniejszych substancji toksycznych ujętych w rozporządzeniach zarówno unijnych jak i polskich jest sporysz (ang. ergot). Sporysz jest formą przetrwalnikową grzyba buławinki czerwonej *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul.. Występuje on w postaci podłużnych sklerocji (sklerot) o długości od kilku milimetrów do 4-6 centymetrów. Sporysz oprócz obniżenia plonów powoduje także skażenie ziarna substancjami toksycznymi – alkaloidami, które działają szkodliwie na organizmy ludzi i zwierząt powodując szereg chorób określanych wspólnym mianem „ergotyizmu”. W roku 2012 panel CONTAM wydał opinię dotyczącą występowania alkaloidów sporyszu w żywności i paszach, i określił grupową ostrą dawkę referencyjną i grupowe tolerowane dzienne pobranie alkaloidów sporyszu [7]. Dlatego też w Rozporządzeniu Komisji (UE) 2015/1940 z dnia 28 października 2015 „Zdecydowanie zaleca się państwom członkowskim i zainteresowanym organizacjom zawodowym monitorowanie obecności alkaloidów sporyszu w zbożach i produktach zbożowych” [8].

Celem niniejszego raportu jest w miarę możliwości szerokie lecz przystępne przedstawienie problemu obecności sporyszu w uprawianych w Polsce gatunkach zbóż, technik oznaczania zawartości alkaloidów w ziarnie i przetworach zbożowych i paszach, oraz możliwości zwalczania sporyszu w trakcie uprawy i zmniejszenia zawartości tych szkodliwych substancji.

2. Historia sporyszu

2.1. Starożytność

Sporysz towarzyszy trawom od początku ich istnienia. Najstarszy okaz sporyszu znaleziono w Birmie, na kłosku trawy zatopionej w bursztynie sprzed 100 mln lat [9]. Problem obecności sporyszu oraz jego szkodliwości w żywieniu człowieka i zwierząt jest znany od wieków, i dotyczy wszystkich cywilizacji, w których uprawiano zboża i trawy. Prawdopodobnie już mieszkańcy pierwszych osad rolniczych uprawiający ponad 9000 lat p.n.e. trawy i pierwsze zboża na terenach Żyznego Półksiężycy, między Eufratem a Tygrysem w Mezopotamii, zetknęli się z grzybami pasożytującymi na jęczmieniu, życie i pszenicy, i musieli odczuwać skutki ich działania.

Około 600 lat p.n.e. na tabliczkach klinowych Asyryjczycy [10] opisywali sporysz jako „szkodliwe krosty w kłosach zboża”. Rzymski historyk Lukrecjusz (98-55 p.n.e.) nazywał te wykwity „*Ignis sacer*”, czyli Świętym Ogniem, które to miano nadano w Średniowieczu powodowanemu przez sporysz ergotyzmowi. W VII w. sporysz był opisywany

przez lud Parsów w jednej ze świętych ksiąg jako „trująca trawa która powoduje u ciężarnych kobiet poronienia i śmierć w połogu”[11,12]. Zapisy o zatruciach i chorobach „pochodzących od ziaren” można również znaleźć w Starym Testamencie (850–550 p.n.e.). W 370 r. p.n.e. Hipokrates opisał chorobę roślin którą nazywa *melanthion*, zauważając wpływ sporyszu na hamowanie krwawień poporodowych.

2.2. Średniowiecze

Słowo „ergot” wywodzi się z języka francuskiego od słowa „argot”, oznaczającego ostrogę koguta. Polska wczesna nazwa sporyszu była bezpośrednim tłumaczeniem tego słowa (ostróżka). Niemiecka mitologia wyjaśniała „nagle” pojawienie się sporyszu poprzez transgresję Kornmutter (niem: Matka ziarna) przez pola w czasie mglistej pogody. Epidemie ergotyzmu pojawiały się w średniowiecznej Europie bardzo często. Miało to związek z bardzo powszechną uprawą żyta, podatnego na zakażenia *C. purpurea*. Mąki żytniej używano powszechnie do wypieku chleba. Skażone sporyszem ziarno użyte do wyrobu mąki zawierało bardzo duże ilości alkaloidów. Jeśli z porażonego ziarna nie usuwano czarno-fioletowych „ostróg”, rozwijała się epidemia ergotyzmu. W rezultacie często dochodziło do zgorzeli kończyn, zaburzeń w funkcjonowaniu ośrodkowego układu nerwowego, a w ostateczności do śmierci[10,11].

Pierwszą wzmiankę o zgorzelinowej formie ergotyzmu można znaleźć w "*Annales Xantenses*" (Niemcy) w 857 n.e.: "Wielka plaga nabrzmiałych pęcherzy pochłaniała ludzi na skutek odrażającej zgnilizny, tak, że ich kończyny były rozluźnione i odpadały przed śmiercią" [13]. Znane są liczne wzmianki o późniejszych epidemiach we Francji, Niemczech i Skandynawii [11].

Pierwszy opis epidemii konwulsyjnej formy ergotyzmu (tzw. rojnicy) pochodzi z Francji z roku 945 [11]. Towarzyszyły jej zaczerwienie, biegunka, wymioty, mrowienie i bolesne pieczenie jak gdyby kończyny paliły, często poprzedzone drgawkami, katalepsją, otępieniem lub maniakalnym podnieceniem, stąd wzmianki o „tańczącej epidemii” lub „tańcu św. Wita”. Większość ofiar zginęła. Ci, którzy uciekli do kościoła Najświętszej Marii Panny lub Martial przeżyli, prawdopodobnie dlatego, że otrzymali żywność bez zanieczyszczeń. Jak odnotowano w kronikach, w epidemii w Akwitanii (Francja) w roku 994 zginęło 40 000 osób [10,12].

Choroba wywoływana przez sporysz i jego alkaloidy określana była mianem „Ognia Świętego Antoniego”. Sam święty Antoni był wczesnochrześcijańskim pustelnikiem żyjącym

w trzecim wieku w Egipcie. W swoim życiu św. Antoni nie miał bezpośredniego związku z zatruciem sporyszem, jednak jego nazwa została przyjęta przez Zakon Szpitalników, założony we Francji około roku 1100. Podróżowali oni po całej średniowiecznej Europie, dzwoniąc w dzwony i dzwonki w celu zebrania datków, a szpitale które w ten sposób ufundowali stały się ośrodkami pielgrzymkowymi dla osób cierpiących z powodu ergotyizmu [13-18]. Zakonnikom tym przypisuje się wiele uzdrowień, i dlatego nazwa i historia życia św. Antoniego związana została z tą chorobą. Sądono, że skrapianie relikwii świętego (kości) święconą wodą lub winem, którym następnie pojono cierpiących, może uleczyć chorych. Jednak wydaje się bardziej prawdopodobne, że kuracja prowadzona przez nich polegała na karmieniu chorych jedzeniem wolnym od skażonego ziarna. Amputowane kończyny były często umieszczane po lewej stronie w sanktuariach św. Antoniego jako ofiary dziękczynne i dowody „sukcesów” świętego. Epidemie zatruc sporyszem nawiedzały Europę przez cały okres Średniowiecza.

2.3. Okres późniejszy.

W okresach późniejszych - od XVI do XIX wieku, sytuacja nie była lepsza. Do epidemii „rojnicy” doszło w Niemczech w roku 1581, 1587 i 1596. Niemiecki lekarz Wendelin Thelius, który dał świadectwo epidemii, która szalała w Królestwie Hesji w 1596 roku, był jednym z pierwszych, którzy skojarzyli zatrucia z ziarnem zbóż. Epidemie były spowodowane po części faktem, że uprawa żyta była w tym czasie bardzo rozpowszechniona, a wiele osób, zwłaszcza mniej zamożnych, spożywało mąkę skażoną.

Dwa różne rodzaje zatrucia (zgorzelowe i konwulsyjne) mogą być uznane za formę przewlekłą i ostrą ergotyizmu. Zgorzelowa forma ergotyizmu obserwowana była głównie we Francji, zaś konwulsyjna w Niemczech. Jako że mrowienie jest typowe dla zatrucia typu konwulsyjnego, zostało nazwane w Niemczech "Kriebelkrankheit" (Kriebeln – mrowienie) [17]. Opisywane były także zatrucia typu mieszanego, szczególnie w innych krajach europejskich. W czasie epidemii w Sologne, we Francji w roku 1630, zmarło ponad 8000 osób.

W roku 1670 doktor Thuillier powiązał obecność sporyszu w chlebie żytnim z epidemiami „ognia św. Antoniego. Przeprowadził doświadczenie żywieniowe: karmił gęsi, kurczęta i świnię „*curricula nigra*”, czyli sporyszem. Wszystkie zwierzęta padły. Niestety nie opublikował wyników swoich badań. W roku 1676 Dodart z pomocą syna Thuillier’a

rozwiązał problem zgorzelinowej formy ergotyzytu. Podobnie, Johann Brunner opisał konwulsyjną formę ergotyzytu w Lipsku, w Niemczech w roku 1695 [10].

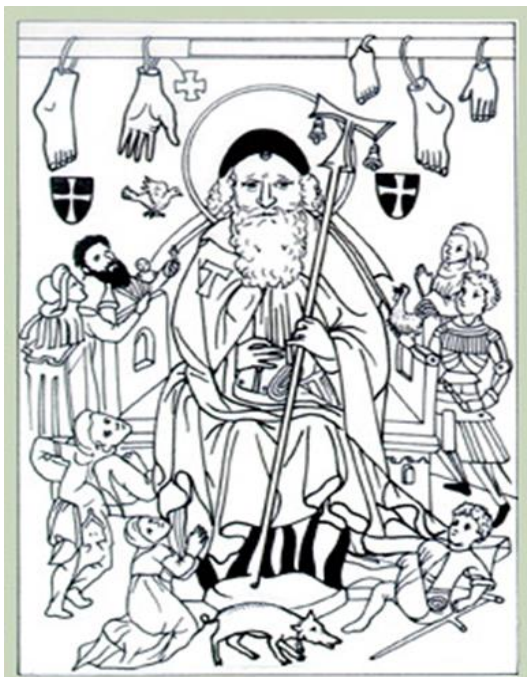
Istnieje podejrzenie, że „opętanie” i następnie proces czarownic z Salem w stanie Massachusetts w USA pod koniec XVII wieku mogło być spowodowane zatruciem sporyszem [19]. Prawdopodobnie inne oskarżenia o czary mogły być również spowodowane spożywaniem przez oskarżonych pokarmów skażonych sporyszem. W XVII wieku wielu naukowców potwierdzało związki między występowaniem sporyszu w ziarnie a chorobami, jednak dopiero pod koniec XVIII wieku L'Abbe Tessier zaproponował sposoby profilaktyki i zwalczania zatrucia sporyszem. Zalecał on drenaż pól, obowiązkowe czyszczenie ziarna, i zastąpienia porażonego ziarna ziemniakami w żywieniu [20]. Prawie do końca XVIII wieku botanicy byli przekonani, że sporysz jest formą „super” żyta o powiększonych ziarniakach. Dopiero w roku 1764 von Münchhausen stwierdził, że sporysz jest grzybem. Epidemie zatrucia nadal występowały sporadycznie w Europie do końca XIX wieku. Ostatnia epidemia konwulsyjnej formy ergotyzytu w Niemczech w Górnej Hesji została opisana przez Siemensa w roku 1879. Zanotował on, że neurologiczne objawy takie jak bolesne skurcze mięśni, bezwład kończyn, epilepsja zawsze poprzedzały zaburzenia psychiczne takie jak osłabiona koncentracja, delirium i halucynacje. Co więcej, takie uszkodzenia były nieodwracalne. Od tego czasu, mimo że ogniska choroby występowały w krajach mniej rozwiniętych [20], ergotyzyt w krajach bardziej rozwiniętych został ograniczony do pojedynczych przypadków przedawkowania ergotaminy. Ostatnia duża epidemia miała miejsce w Rosji w rejonie Uralu w latach 1926-27. Jednak również w II połowie XX wieku we Francji nad Renem odnotowano masowe zatrucie 230 mieszkańców miejscowości Pont-Saint Esprit pieczywem zawierającym sporysz.

Częste epidemie „ognia świętego Antoniego” lub „świętego ognia” znalazły swoje odzwierciedlenie również w sztuce (ryc. 1 i 2).

Oprócz zatruc ludzi dochodziło na dużą skalę również do zatruc zwierząt. Objawy toksykozy zwierzęcych są podobne do objawów obserwowanych u człowieka. Obserwuje się trzy objawy chorobowe: ergotyzyt konwulsyjny, ergotyzyt zgorzelowy, oraz bezmleczność.

Ludzie nauczyli się również wykorzystywać sporysz w celach leczniczych. Zgodnie z mottem XVI-wiecznego niemieckiego lekarza, alchemika i przyrodnika Paracelsusa (1493-1541) „*Omnia sunt venena, nihil est sine veneno. Sola dosis facit venenum.*” (łac.: „wszystko

jest trucizną i nic nie jest trucizną, bo tylko dawka czyni trucizną”). Trucizna użyta w odpowiedniej dawce może okazać się równocześnie lekarstwem.



Rycina 1. Święty Antoni. Drzeworyt wykonany w Niemczech około roku 1215r. Staatliche Graphische Sammlung München, Monachium, Niemcy.



Rycina 2. Kalecy. Obraz flamandzkiego malarza Pietera Bruegla, przedstawia ofiary ergotyzy w Średniowieczu. (Luwr, Francja).

Prawdopodobnie pierwsze celowe użycie alkaloidów sporyszu miało miejsce 4000 lat p.n.e., kiedy Grecy podczas trwania Misteriów Eleuzyjskich używali sporyszu jako środka wywołującego halucynacje. Magiczne zaklęcie znalezione w niewielkiej świątyni w Mezopotamii datowane na 1900-1700 p.n.e. mówi o nienormalnie porażonym ziarnie jako *mehru*. W tzw. Papiirusie Hearsta, znalezionym w Egipcie w sarkofagu mumii pochodzącym z ok. 1550 roku p.n.e. opisano preparat, w którym mieszanka sporyszu, oleju i miodu była polecana jako lek na porost włosów. Pierwsze potwierdzone doniesienia o skutkach celowego stosowania sporyszu pochodzą z okresu ok. 1100 roku p.n.e. z Chin, gdzie użyto go w położnictwie i ginekologii.

W 1582 roku preparat sporyszu, został zastosowany w małych dawkach przez położne w celu wywołania silnych skurczów macicy, co zostało opisane przez Adama Lonicera w jego *Zielniku* [17], a w 1588 r. lekarz Wendelin Thalius stosował sporysz do tamowania krwawień.

Praktyka używania sporyszu jako preparatu pobudzającego skurcze macicy podczas porodu stała się bardzo popularna w Europie (we Francji, Niemczech) oraz w Stanach Zjednoczonych. Pierwsze użycie leku w oficjalnej medycynie zostało opisane przez amerykańskiego lekarza Johna Stearnsa w roku 1808, kiedy donosił o działaniu skurczowym na macicę preparatu sporyszu uzyskanego z poczerńiałego żyta jako środka na "przyspieszenie porodu". Jednak wkrótce potem liczba noworodków martwo urodzonych po zastosowaniu preparatu wzrosła do tego stopnia, że Towarzystwo Medyczne w Nowym Jorku wszczęła dochodzenie. W wyniku tego postępowania zalecono w roku 1824, aby preparat sporyszu był stosowany jedynie w celu tamowania krwotoku poporodowego. Sporysz został wprowadzony do pierwszego wydania Farmakopei Stanów Zjednoczonych w 1820 roku i do Farmakopei w Londynie w roku 1836.

3. **Biologia buławinki czerwonej *Claviceps purpurea***

Zanim Louis Rene Tulasne (1815-1885) opisał cykl rozwojowy grzyba, proponowano wiele teorii wyjaśniających pochodzenie i naturę sporyszu. Początkowo sporysz był uważany za nadmiernie wyrośnięte „super” ziarno zbóż na których pasożytował, zwłaszcza żyta. Od tego przekonania, poprzez teorię, że sporysz jest ziarnem przerośniętym grzybem, do hipotezy o jego czysto grzybowym pochodzeniu minęło wiele lat. Sporysz po raz pierwszy został zidentyfikowany jako choroba grzybowa w 1711 roku, a w roku 1764 von Münchhausen w Niemczech stwierdził dodatkowo, że sporysz nie jest przerośniętym ziarnem żyta lecz formą grzyba. Jednak jego cykl rozwojowy nie był opisany w precyzyjnej formie aż do roku 1853, kiedy badania prowadzone przez Tulasne’a doprowadziły do wyjaśnienia cyklu rozwojowego sporyszu. Tulasne nazwał badany grzyb *Claviceps purpurea* i zaliczył do workowców – *Ascomycetes*. Stwierdził, że może on występować w trzech formach rozwojowych: grzybni pierwotnej - pleśni, oplatającej zarodek zboża (*Sphacelia segetum*); czarno-fioletowego przetrwalnika (zdj. 1) - grzybni zimotrwałej (sklerocji, występującej w nazewnictwie medycznym jako *Secale cornutum*, *Sclerotium clavus* lub sporysz lekarski) oraz grzybka (*Claviceps purpurea*), wyrastającego na wiosnę z przetrwalnika (zdj. 2), który zawiera woreczki z zarodnikami [21,22]. Przez lata klasyfikacja grzyba zmieniała się. Po raz pierwszy takson ten został opisany przez E. F. Fries’a w roku 1823 pod nazwą *Sphaera purpurea*. Tulasne zaklasyfikował go w roku 1853 do rodzaju *Claviceps*[23,24]. Buławinka czerwona posiadała wiele synonimów, np.:

Sclerotium clavus DC. (1815)

Sphaeria purpurea Fr. (Lund 1823),

Sphacelia segetum Lév. (Paryż 1827),

Claviceps purpurea var. *purpurea* (Fr.) Tul. (1853)

Claviceps microcephala (Wallr.) Tul. 1853

Claviceps purpurea var. *agropyri* Tanda 1981

Claviceps purpurea var. *spartinae* R.A. Duncan & J.F. White 2002

Cordyceps microcephala (Wallr.) Berk. & Broome

Termin sporysz (*Secale cornutum*) pochodzi od francuskiego słowa argot (ostroga) i odnosi się do ciemnobrązowej twardej formy przetrwalnikowej o podłużnym różkowatym kształcie, powstającego w dojrzewających kłosach zbóż w miejscu ziarna. Z histologicznego punktu widzenia składa się on ze ściśle upakowanych nitkowatych strzępków grzyba *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul. ale z biologicznego punktu widzenia te zwarte twarde ziarna są sklerocjami-formami przetrwalnikowymi, w postaci których grzyb zimuje.

Buławinka czerwona występuje w dwóch stadiach:

- *Sphacelia segetum* Lev. – stadium konidialne (niedoskonałe)

- *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul. - stadium workowe (stadium doskonałe)

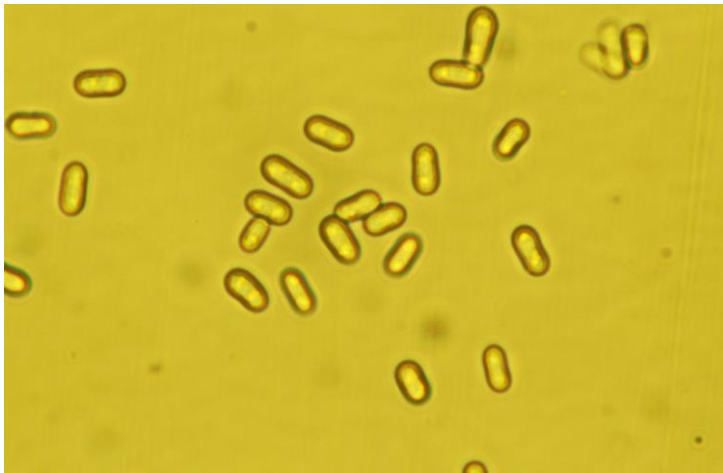
Wiosną, gdy wraz z nadejściem ciepłych i wilgotnych dni na powierzchni znajdujących się w glebie sklerocjów (sporyszu) wytwarzane są nowe organy - różowe, buławkowate podkładki (zdj. 1, 2).



Zdjęcie 1. Sklerocja *Claviceps purpurea* w fazie spoczynku [Fot. P. Ochodzki]

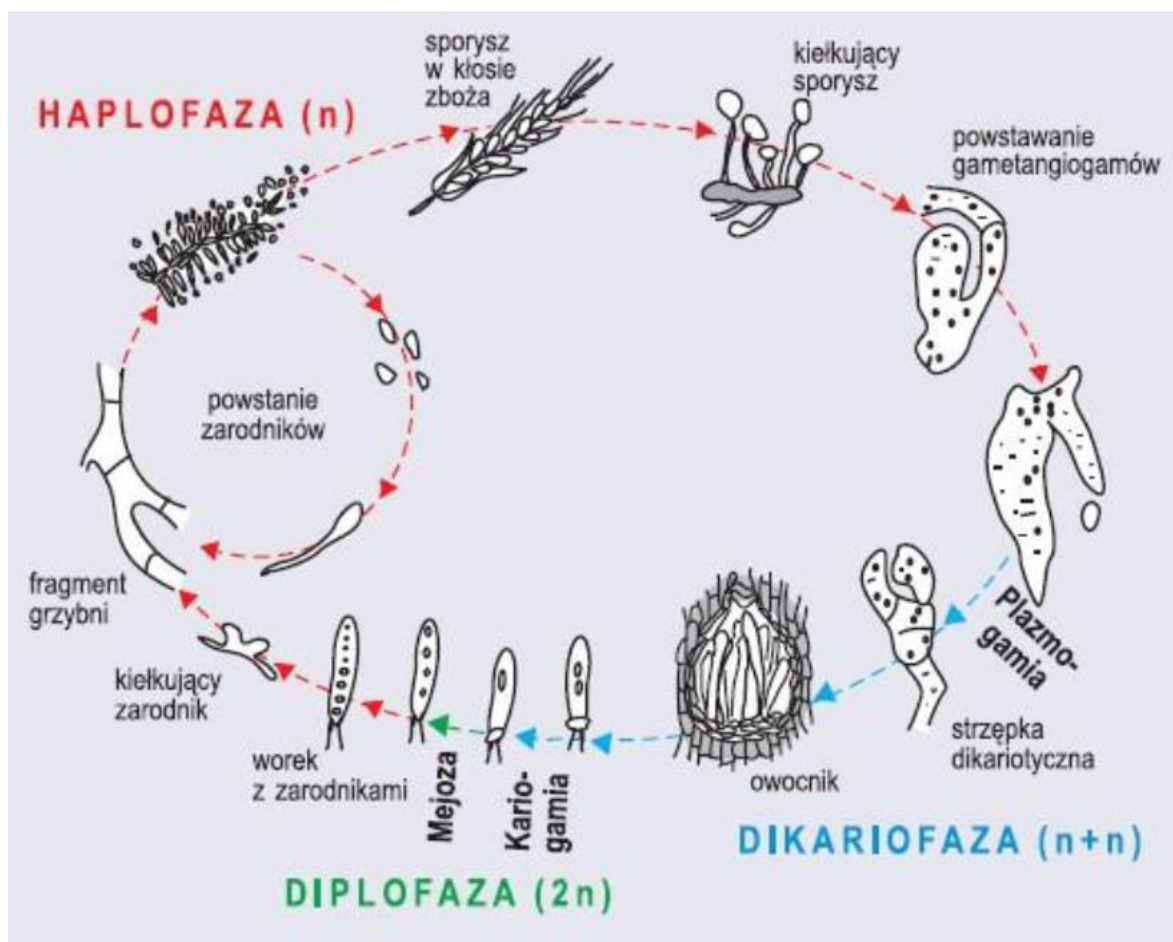


Zdjęcie 2. Kiełkujące sklerocja *C. purpurea* [25]



Zdjęcie 3. Zarodniki *C. purpurea* [Fot. I. Kolasińska]

Na podkładkach formuje się szereg otoczni z workami w środku. W każdym worku znajduje się 8 długich, nitkowatych zarodników workowych. Owocniki dojrzewają w okresie kwitnienia zbóż i traw, a uwolnione z nich zarodniki (zdz. 3) są silnie wyrzucane i roznoszone z wiatrem.

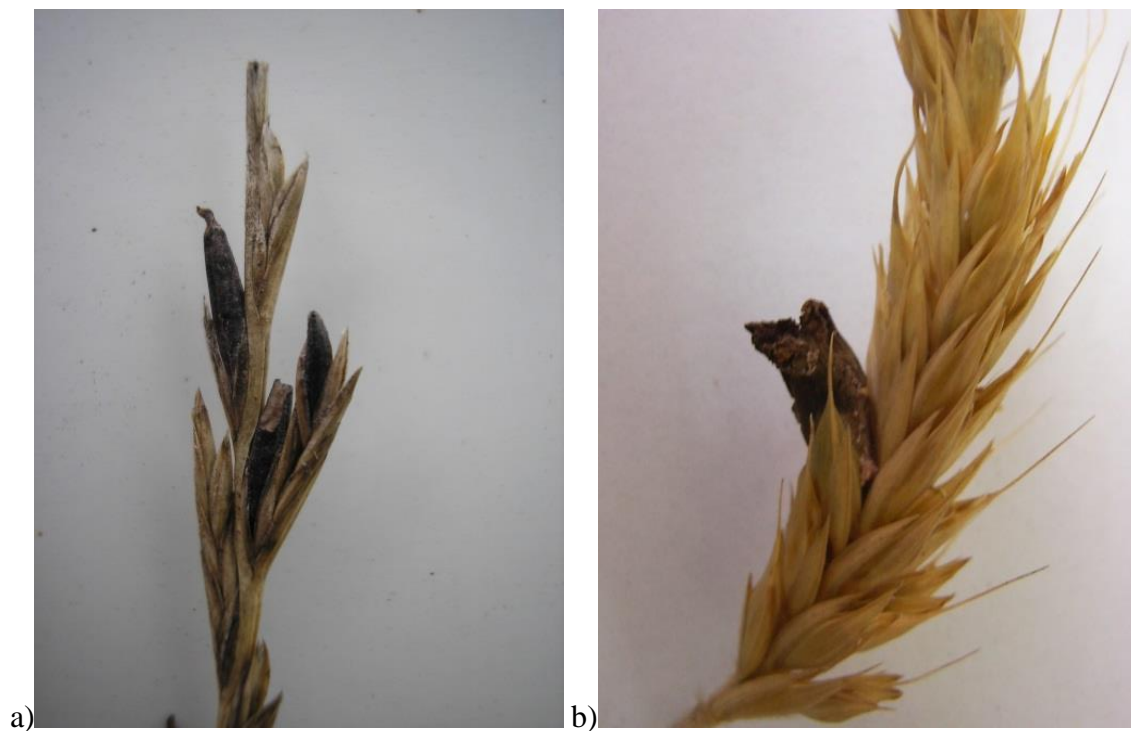


Rycina 3. Cykl rozwojowy buławinki czerwonej [26].

Cykl rozwojowy grzyba (ryc.3). rozpoczyna się gdy niesione wiatrem zarodniki (askospory) trafią na znamię słupka kwiatowego i w sprzyjających warunkach zakażą go. Znamiona podczas kwitnienia są gotowe na przyjęcie zarówno pyłku własnego gatunku jak i zarodników. Askospory są pierwotnym źródłem zakażenia, kiełkują i zakażają zalążnię w ciągu jednej doby. Strzępki grzybni przerastają wyłącznie tkanki słupka i zalążni i wytwarzają bardzo specyficzny układ między żywicielem i patogenem, imitujący proces zapylenia. Na powierzchni zalążni grzybnia wytwarza bardzo duże ilości jednokomórkowych zarodników konidialnych zawieszonych w słodkiej i lepkiej cieczy zwanej rosą miodową. Skład chemiczny rosy jest różny i charakterystyczny dla poszczególnych gatunków *Claviceps*. Rosa miodowa jest wydzielana na zewnątrz zakażonych kwiatków, a zwabione jej zapachem owady zbierają ją wraz z zarodnikami, i w ten sposób w trakcie żerowania zakażają następne rośliny tego samego gatunku lub gatunków kwitnących nieco później. Powoduje to szybkie rozprzestrzenianie się infekcji. Dodatkowo, rosa miodowa z zarodnikami może być rozpryskiwana przez krople deszczu lub maszyny rolnicze. Najczęściej pierwsze kwitną i są infekowane dzikie trawy, a zboża rosnące w pobliżu lub w łanie porażane są inokulum wtórnym w drugiej kolejności. Odporność na porażenie *C. purpurea* rozwija się u zbóż w kilka dni po zapyleniu. Wszystkie czynniki opóźniające proces kwitnienia lub go wydłużające, np. duża wilgotność, opady deszczu połączone z obniżeniem temperatury, powodują zwiększoną podatność na zakażenie sporyszem. Podobnie jest w sytuacji zmniejszonej dostępności pyłku, spowodowanej zbyt upalnymi dniami i zmniejszeniem żywotności pyłku, lub zmniejszeniem dostępności pyłku spowodowane np. przeredzeniem łanu na skutek wymarznienia części roślin. Wytwarzanie rosy miodowej trwa do momentu rozpoczęcia formowania się sklerocjów. W porażonym kłosku następuje proces rozkładu tkanki słupka i dalszego przerastania zalążni grzybnią, gdzie tworzy się i rozwija forma przetrwalnikowa - sklerocja. Widoczna jest ona w postaci fioletowo-czarnego rożkowatego słupka (sporyszu) o długości dochodzącej nawet do 4-6 cm, wyrastającego z niektórych kłosek w miejscu ziarniaków. Proces dojrzewania sklerocji trwa 4 do 5 tygodni. Sklerocja wewnątrz zbudowane są z gęsto upakowanej białawej tkanki grzybni z komórkami zapasowymi (przechowalniczymi, ang. storage cells). Grzybnia ta jest otoczona ciemną i twardą warstwą zewnętrzną, chroniącą grzybnię przed wyschnięciem, światłem ultrafioletowym i innymi niekorzystnymi warunkami zewnętrznymi. Jesienią dojrzałe sklerocje wypadają z kłosów do gleby lub są zbierane wraz ziarnem. Znajdujące się w glebie sklerocje pozostają w niej przez zimę. Dla wernalizacji (jarowizacji) sporysz potrzebuje co najmniej 25 dni w temperaturze 0-10°C [27,28]. Wiosną cykl rozpoczyna się od początku.

4. Występowanie *Claviceps purpurea*

Rodzaj *Claviceps sp.* jest grupą fitopatogennych grzybów należących do workowców (*Ascomycetes*), rodziny buławinkowatych (*Clavicipitaceae*) i składa się z 12 gatunków [29]. Najważniejszym gatunkiem, z powodu szkód powodowanych w rolnictwie, jest *Claviceps purpurea*, rozpowszechniony na całym świecie, w regionach o klimacie umiarkowanym. Inne gatunki *Claviceps* występują głównie w obszarach tropikalnych i subtropikalnych, i prawie wszystkie są ograniczają się do jednego rodzaju gospodarza lub kilku ściśle związanych rodzajów. Sporysz sorgo, powodowany przez *C. africana* i *C. sorghi*, są powszechne we wszystkich obszarach uprawy sorgo (*Sorghum bicolor*) [31]. Ten gatunek dawniej był ograniczony do Afryki i Azji, gdzie po raz pierwszy opisano go ponad 90 lat temu. W połowie lat 1990. sporysz sorgo rozprzestrzenił się do Brazylii, Południowej Afryki i Australii. Do 1997 roku, choroba rozprzestrzeniła się na większość krajów Ameryki Południowej i Karaibów, w tym Meksyk, i dotarła do Teksasu w USA. Jesienią 1997 roku sporysz ten znaleziono w całym Teksasie, i odnotowano w Georgii, Kansas i Nebrasce [19].



Zdjęcie 4. Porażone sporyszem kłosa trawy (a) i żyta populacyjnego (b) [Fot. B. Wiewióra]



Zdjęcie 5. Ziarno żyta porażone sporyszem [Fot. P. Ochodzki]

Grzyby *Claviceps* pasożytują na ponad 600 gatunkach roślin jednoliściennych należących do trzech rodzin: sitowatych (*Juncaceae*), turzycowatych (*Cyperaceae*) i traw właściwych (*Poaceae*) [29,30] (zdj. 4, 5.). Grzyb atakuje w pierwszym rzędzie gatunki obcopolne traw i zbóż, w tym żyto [32,33] i kukurydzę, ale również gatunki samopylne takie jak pszenżyto [34], pszenicę [35], jęczmień [36], owies, proso, ryż, sorgo [37-40].

W Europie problem występowania sporyszu ma największe znaczenie w uprawie żyta, które jest zbożem obcopolnym [33,39]. Problem ten występuje również w przypadku pszenżyta, które mimo że jest zbożem teoretycznie samopylnym, to jednak w pewnym stopniu również wykazuje cechy obcopolności pochodzące od genów żytnich [34]. W pozostałych wymienionych gatunkach jest to problem o mniejszym znaczeniu.

5. Alkaloidy sporyszu – budowa i aktywność biologiczna

Sporysz od wielu lat jest zarówno przyczyną chorób określanych mianem ergotyzmu, jak też preparatem medycznym wykorzystywanym w tamowaniu krwotoków podczas porodów, co opisano we wcześniejszych rozdziałach. Czynniki sprawczymi biologicznej aktywności sporyszu są związki określane wspólnym mianem alkaloidów sporyszu. Alkaloidy stanowią grupę ponad 40 związków o charakterze zasadowym, zawierającymi azot. Są

pochodnymi dwóch kwasów: lizergowego i izolizergowego, których wspólnym elementem jest czteropierścieniowy związek nazywany ergoliną (ryc. 4.). Kwasy te są izomerami optycznymi, i różnią się jedynie położeniem grupy karboksylowej przy 8 atomie węgla (ryc. 4.). Istnienie izomerów optycznych lewo- i prawoskrętnych jest bardzo ważne z punktu widzenia zarówno analitycznego jak aktywności biologicznej. Izomery lewoskrętne posiadają zdecydowanie silniejsze działanie biologiczne niż ich prawoskrętne odpowiedniki. Różnice w budowie przekładają się również w nazewnictwie tych związków. Izomery lewoskrętne mają nazwy kończące się na „ina”, zaś odpowiedniki prawoskrętne „-inina” (np. ergotamina i ergotaminina). Wszystkie izomery lewoskrętne mają swoje odpowiedniki prawoskrętne, i mogą w roztworach ulegać epimeryzacji - przekształcać się w swoje odpowiedniki.

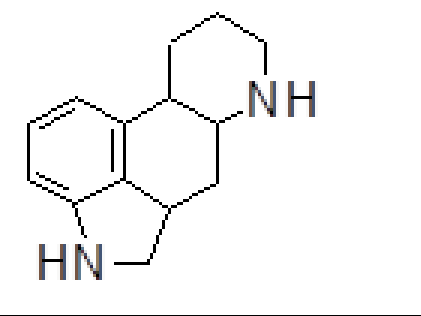
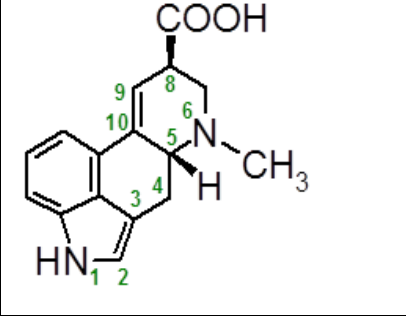
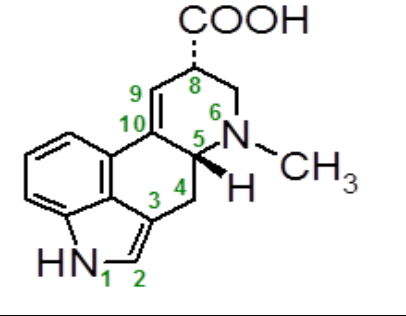
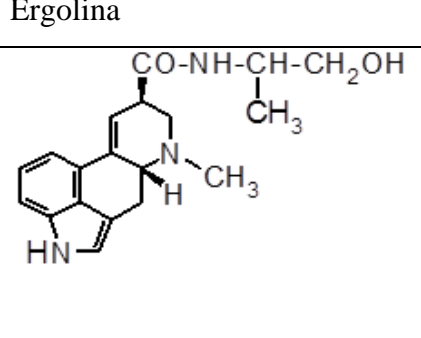
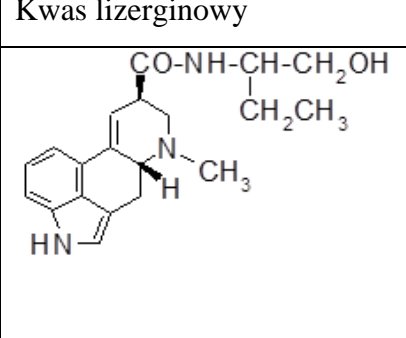
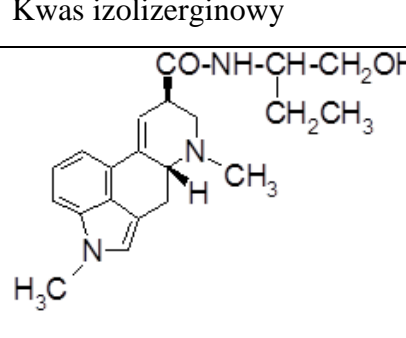
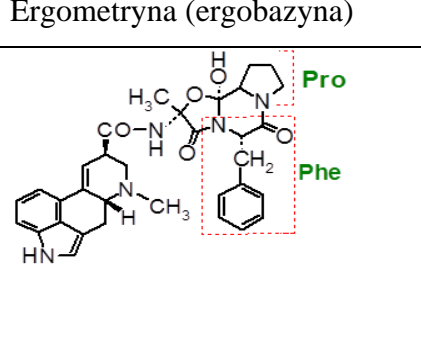
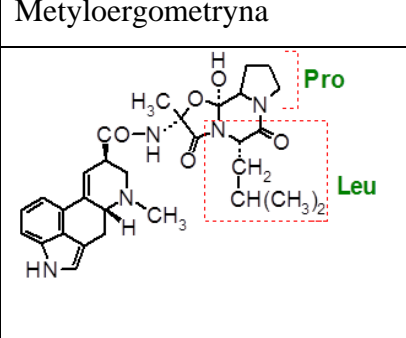
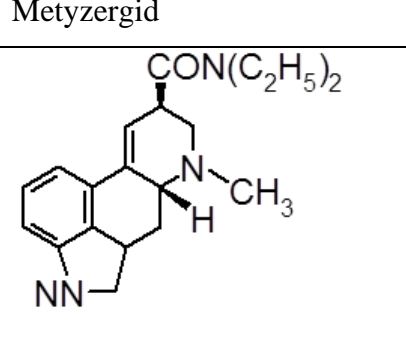
Alkaloidy sporyszu możemy podzielić na kilka grup ze względu na ich budowę i właściwości:

5.1. Alkaloidy niskocząsteczkowe

są amidami kwasu lizergowego (lub izolizergowego) i aminoalkoholi. Ergometryna (ergobazyna, ergonowina) jest amidem 2-aminopropanolu i kwasu D(-) lizergowego, a ergometrynina (ergobazynina) kwasu izolizergowego. Do grupy tej należą jeszcze metyloergometryna i metyzergid (oraz ich izomery prawoskrętne).

Ergometryna (α -hydroksy- β -metyloetyloamid kwasu D(-)lizergowego) należy do alkaloidów niskocząsteczkowych, rozpuszczalnych w wodzie. Stosowana jest w leczeniu pod postacią wodoromaleinianu ergometryny (*Ergometrium hydromaleinicum*). Wykazuje silny wpływ kurczący na macicę, wywołuje fale rytmicznych skurczów, zwiększa napięcie jej ścian. Wykorzystywana jest w położnictwie w celu wzmożenia skurczów porodowych i w ostatnim okresie porodu po oddzieleniu się łożyska. Stosowana też jako środek hamujący krwawienia maciczne. Hamuje wydzielanie prolaktyny, nie wykazuje działania sympatykolitycznego. W przypadkach ostrego zatrucia stosuje się atropinę i nitroglicerynę [43].

Rycina 4. Podstawowe alkaloidy występujące w sporyszu (na podstawie [44])

		
Ergolina	Kwas lizerginowy	Kwas izolizerginowy
		
Ergometryna (ergobazyna)	Metyloergometryna	Metyzergid
		
Ergotamina	Ergozyna	LSD-25 dietylowy amid kwasu lizergowego

5.2. Alkaloidy wysokocząsteczkowe

są oligopeptydami zbudowanymi z pierścienia składającego się z 3 aminokwasów, połączonego z kwasem lizerginowym. Są one trudno rozpuszczalne i wysokotoksyczne. Możemy wyróżnić pośród nich trzy grupy:

- grupa ergotaminy (ergotamina, ergotyna, ergozyna)
- grupa ergotoksyny (ergotoksyna, ergokryptyna, ergokryptyna)
- alkaloidy klawinowe: ergoklawina, peniklawina, chanoklawina

Połączenia kwasu D-lizergowego z kilkoma aminokwasami połączonymi wiązaniami peptydowymi w struktury cykliczne. Zawsze obecny jest aminokwas prolina.

5.2.1. Grupa ergotaminy

Ergotamina

Zbudowana jest z kwasu D(-) lizergowego i fragmentu peptydowego złożonego z α -hydroksyalaniny, L-feniloalaniny, L-proliny. W leczeniu stosowana jest w postaci winianu. Działa skurczowo na mięśnie gładkie macicy, działa porażająco na układ współczulny (sympatykolityk), blokuje receptory α -adrenergiczne, zwiększa napięcie ścian naczyń mózgowych i obwodowych. Jest stosowana w ginekologii oraz przy napadach migreny. Działanie naczynioskurczowe jest na tyle duże, że może doprowadzić do bólów wieńcowych, drętwienia kończyn, niedokrwienia palców. W większych dawkach wykazuje działanie toksyczne. Przy zatruciu stosuje się atropinę i nitroglicerynę.

Pochodna ergotaminy- 9,10-dihydroergotamina działa przeciwmigrenowo, nie działa natomiast kurcząco na macicę i jest mniej toksyczna.

Ergotyna wywołuje skurcze macicy, dlatego też stosuje się ją jako środek poronny.

Ergozyna

Część peptydowa ergozyny składa się z α -hydroksyalaniny, L-leucyny i L-proliny

5.2.2. Grupa ergotoksyny

Te alkaloidy wielocząsteczkowe posiadają budowę zbliżoną do alkaloidów z grupy ergotaminy:

Ergokryptyna: α -hydroksywalina, L-prolina, L-feniloalanina

Ergokryptyna: α -hydroksywalina, L-prolina, L-leucyna

Ergokornina: α -hydroksywalina, L-prolina, L-walina

Ergokryptyna i ergokryptyna

Pomimo budowy podobnej do alkaloidów z grupy ergotaminy, związki te oraz ich syntetyczne pochodne wykazują odmienne działanie. Powodują zahamowanie w przednim płacie hormonu odpowiedzialnego za laktację – prolaktyny. Same ergokryptyna i ergokryptyna nie są stosowane w leczeniu, ponieważ ich pochodne są znacznie bezpieczniejsze i działają lepiej niż naturalne alkaloidy np. 2-bromo- α -kryptyna poza

leczeniem hiperprolaktynemii stosowana jest w znoszeniu objawów choroby Parkinsona – stymuluje receptory dopaminowe.

5.3. Zatrucie sporyszem

Stężenie alkaloidów w sporyszu zwykle jest małe (0,05%-0,3%) i stanowią one mieszaninę kilkunastu lub nawet kilkudziesięciu związków. Główną część alkaloidowej frakcji sporyszu stanowi 6 stereoizomerycznych par alkaloidów: lewoskrętne - ergokrystyna, ergotamina, ergokryptyna, ergometryna (ergonowina), ergozyna i ergokornina, oraz ich prawoskrętne izomery „-ininowe”, które są znacznie mniej toksyczne [45, 46]. Poszczególne alkaloidy wykazują odmienne działanie, dlatego są rozdzielane i stosowane oddzielnie. Dla przemysłowego pozyskiwania alkaloidów sporyszu wyselekcjonowano szczepy grzyba zawierające do 1% alkaloidów. Oprócz alkaloidów naturalnych otrzymano także alkaloidy półsyntetyczne. Najbardziej znanym jest dietylowy amid kwasu lizerginowego, popularnie nazywany LSD-25. Jest to najsilniejszy środek psychotropowy i halucynogeny, działający w dawce mikrogramowej.

Przemysłowa produkcja alkaloidów sporyszu rozpoczęła się w roku 1918, kiedy Artur Stoll opatentował izolowanie ergotaminy w postaci soli winianowej (ergotaminum tartaricum). Alkaloidy sporyszu podobnie jak i sam sproszkowany sporysz, przedawkowane powodują ciężkie zatrucie grożące śmiercią. Jak wspomniano wcześniej, zatrucie sporyszem może przyjmować dwie formy:

Postać skurczową (*ergotismus convulsus*) nazywana w Średniowieczu „tańcem św. Wita”, powodująca zaburzenia czucia, drżenie mięśni, drgawki, ból głowy, brzucha, drgawki, brunatne wymioty, biegunkę, przeczulicę kończyn, rozszerzenie źrenic, sinicę, zwolnienie akcji serca, silne pobudzenie nerwowe, gonitwę myśli.

Postać zgorzelinową (*ergotismus gangrenosus*) czyli „ogień św. Antoniego” – powodująca zaburzenia czucia, zwolnienie akcji serca, ataki duszności, niedokrwienie tkanek na skutek nadmiernego i długotrwałego obkurczenia naczyń krwionośnych, zakrzepy, martwicę tkanek (zgorzel suchą tkanek niedokrwionych), porażenie ośrodkowego oddechowego, śmierć.

6. Analiza zawartości sporyszu i jego alkaloidów.

Normy w UE określają jedynie zawartość wagową sklerocjów sporyszu w ziarnie. Dopuszczalny górny limit to 0,05% wagowego (500 mg/kg) w zbożu przeznaczonym do konsumpcji, oraz 0,1% wagowego (1000 mg/kg) w paszach. Normy nie precyzują zawartości sumarycznej alkaloidów ani zawartości poszczególnych alkaloidów, mimo ich bardzo zróżnicowanej zawartości i różnej aktywności biologicznej. W celu oznaczenia zawartości sporyszu z porcji ziarna wybiera się sklerocja, liczy je i waży.

Jednak w najnowszym rozporządzeniu Komisji (UE) 2015/1940 [8] stwierdzono: „Panel naukowy ds. środków trujących w łańcuchu żywnościowym („CONTAM”) Europejskiego Urzędu ds. Bezpieczeństwa Żywności („EFSA”) przyjął opinię dotyczącą występowania alkaloidów sporyszu w żywności i paszach (6). Panel CONTAM określił grupową ostrą dawkę referencyjną w wysokości 1 µg/kg masy ciała i grupowe tolerowane dzienne pobranie w wysokości 0,6 µg/kg masy ciała. (...) Obecność alkaloidów sporyszu w ziarnach zbóż jest w pewnym stopniu związana z obecnością przetrwalników buławinki czerwonej w ziarnach zbóż. Związek ten nie ma charakteru bezwzględny, ponieważ alkaloidy sporyszu mogą być również obecne w pyłach z przetrwalników buławinki czerwonej adsorbowanych przez ziarna zbóż. Ważne jest zatem określenie w pierwszej kolejności najwyższych dopuszczalnych poziomów przetrwalników buławinki czerwonej, a jednocześnie gromadzenie dalszych danych na temat obecności alkaloidów sporyszu w zbożach i produktach zbożowych. Uznaje się jednak, że zgodność z najwyższym dopuszczalnym poziomem przetrwalników buławinki czerwonej niekoniecznie gwarantuje bezpieczeństwo żywności w odniesieniu do obecności alkaloidów sporyszu. W związku z tym właściwe organy mogą wprowadzić odpowiednie środki, zgodnie z art. 14 ust. 8 rozporządzenia (WE) nr 178/2002 Parlamentu Europejskiego i Rady, w celu nałożenia ograniczeń dotyczących wprowadzenia żywności na rynek lub zażądania wycofania takiej żywności z rynku, jeżeli zostanie ona uznana za niebezpieczną ze względu na poziom alkaloidów sporyszu mimo zgodności z najwyższym dopuszczalnym poziomem przetrwalników buławinki czerwonej. (...) Ważne jest gromadzenie danych na temat obecności alkaloidów sporyszu w zbożach i produktach zbożowych w celu ustalenia związku pomiędzy obecnością alkaloidów sporyszu a obecnością przetrwalników buławinki czerwonej. Ustalenia dotyczące alkaloidów sporyszu powinny zostać przekazane do dnia 30 września 2016 r., aby umożliwić określenie odpowiednich i możliwych do osiągnięcia najwyższych dopuszczalnych poziomów alkaloidów sporyszu, zapewniających wysoki poziom ochrony zdrowia ludzkiego”

Sumaryczną zawartość alkaloidów sporyszu można oznaczyć za pomocą metod kolorymetrycznych, wykorzystujących reakcje barwne alkaloidów z różnymi odczynnikami. Pierwsza kolorymetryczna metoda opisana przez Manreta w 1875 wykorzystywała barwną reakcję roztworu kwasu siarkowego z alkaloidami. W roku 1929 van Urk jako substancję barwiącą zastosował p-dimetyloaminobenzaldehyd [48]. Metoda ta była umieszczona w Europejskiej Farmakopei nawet w 1997 r. do szybkiej ilościowej oceny produkcji alkaloidów sporyszu. Ten sam związek jest wykorzystywany w odczynniku Ehrlicha do wizualizacji płytek w chromatografii cienkowarstwowej (TLC). Obecnie jako alternatywę dla p-dimetyloaminobenzaldehydu stosuje się ninhydrynę.

Szereg alkaloidów wykazuje właściwość fluorescencji po naświetleniu światłem ultrafioletowym. Tę właściwość wykorzystuje się w detekcji i ilościowej analizie alkaloidów metodą chromatografii cienkowarstwowej i wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC). Właściwość fluorescencji jest także wykorzystywana w bezpośredniej metodzie fluorymetrycznej oznaczania sumy alkaloidów w roztworze, bez jakichkolwiek wcześniejszych rozdziałów chromatograficznych [48, 49]. Wadą wszystkich bezpośrednich metod analizy kolorymetrycznej, spektrofotometrycznej i fluorymetrycznej jest ich niespecyficzność, nie pozwalająca na określenie składu jakościowego alkaloidów. W rezultacie większość z tych metod została zarzucona, lecz właściwości fizyczne poszczególnych alkaloidów są wykorzystywane w technikach detekcji w analizach TLC i wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC). Technika HPLC jest jedną z najpowszechniej stosowanych obecnie do analizy zarówno jakościowej jak i ilościowej [7, 50].

Najnowsze techniki stosowane do wykrywania i analizy mikotoksyn, w tym również alkaloidów, opierają się na wysokosprawnej chromatografii cieczowej połączonej z detekcją spektrometrii mas (LC-MS, LC-MS/MS). Podejście takie umożliwia jednoczesne oznaczenie zawartości kilkudziesięciu mikotoksyn, przy równoczesnej eliminacji możliwych błędów identyfikacji poszczególnych związków [51]. Pozwala jednocześnie na poznanie budowy strukturalnej nieznanego dotychczas alkaloidów. Jednak w chwili obecnej jest to technika bardzo kosztowna, dostępna jedynie w dobrze wyposażonych laboratoriach, i wymagająca wysokich kwalifikacji od obsługujących ją operatorów

7. Czynniki wpływające na zakażenia sporyszem

Dla infekcji sporyszu podstawowym czynnikiem jest biologia kwitnienia rośliny na której pasożytuje. Zarodniki w chwili zakażenia rośliny starają się imitować proces zapylenia. Po wnikięciu do słupka grzyb wrasta w dół zgodnie z łagiewką, na zewnątrz zalążni albo wnikając do zalążni z boku [39,52,53].

Na podatność rośliny na porażenie sporyszem wpływają co najmniej trzy czynniki:

- charakterystyka kwitnienia, wpływająca na wrażliwość (podatność) znamienia słupka, np. czas kiedy kwiaty są otwarte, wielkość znamienia, początek zasuszenia znamienia po zapyleniu
- zdolność rośliny do zapylenia i zapłodnienia nim nastąpi infekcja, głównie zależna od dostępności pyłku
- odporność polegająca na utrudnianiu procesu zakażenia lub w rozprzestrzenianiu się zakażenia w zalążni.

Dodatkowo na te mechanizmy nakładają się zmienne warunki pogodowe panujące na krótko przed kwitnieniem i w jego trakcie. Dlatego też w ocenie odporności genotypu należy brać pod uwagę złożone interakcje między warunkami pogodowymi, infekcją grzybiczą i jej rozprzestrzenianiem się a dostępnością pyłku.

7.1 Charakterystyka kwiatostanu

U żyta nie badano dokładnie wpływu charakterystyki kwiatów, jednak wykazano, że sporysz może zainfekować już zapyłone zalążnie [39, 53]. Z drugiej strony, kwiaty otwierają się na bardzo krótki okres i natychmiast po zapyleniu szczelnie się zamykają. Następnie znamiona szybko zasychają. Otwarcie kwiatów rozpoczyna się od środkowej części kłosa i postępuje w ciągu 2-3 dni. Duże pola żyta kwitną w przeciągu jednego do dwóch tygodni [39,54]. Późne formy mogą kwitnąć nawet po tym okresie, stanowiąc idealny cel dla zakażeń przez sporysz. Dlatego też dobra synchronizacja kwitnienia między formami rodzicielskimi u żyta mieszańcowego i krótki czas kiedy otwarte kwiaty są dostępne dla infekcji z pewnością mogą zredukować stopień zakażenia sporyszem.

7.2 Dostępność pyłku

Ponieważ sporysz może najefektywniej porażać kwiatki jeszcze nie zapyłone lub tuż po zapyleniu, występuje współzawodnictwo między zapyleniem a zakażeniem, a zmniejszona

ilość ziaren pyłku stawia w uprzywilejowanej sytuacji zarodniki *C. purpurea* [39,55]. Taka sytuacja ma miejsce kiedy:

- nie jest w pełni przywrócona płodność odmiany mieszańcowej
- w czasie produkcji nasiennej mieszańców nie została osiągnięta pełna synchronizacja terminu kwitnienia
- gdy warunki pogodowe w czasie kwitnienia są niesprzyjające, tzn., jest niska temperatura i występują opady deszczu. Deszczowa pogoda zmniejsza pylenie i przemieszczanie się pyłku. Wilgotny pyłek zlepia się i jest przenoszony na krótkie odległości. Dlatego też kwiaty pozostają otwarte dłużej, ponieważ nie zostały zapłodnione. Niezapłodnione kwiaty żyta mogą pozostawać otwarte przez kilka dni. W tym czasie znamię rośnie i zwiększa swoją powierzchnię w celu efektywniejszego wylapywania pyłku, ale jednocześnie i askospor sporyszu. Równocześnie taka pogoda faworyzuje roznoszenie rosy miodowej przez owady lub wiatr i deszcz, zwiększając ryzyko i stopień infekcji. W czasie ciepłych i słonecznych dni rosa miodowa gęstnieje i prowadzi to do skrócenia przedziału czasowego w którym znamię jest podatne na infekcję, a przez to zmniejsza niebezpieczeństwo zakażenia rośliny konidiami sporyszu. Temperatura i wilgotność odmiennie wpływają na rozwój grzyba w znamieniu w porównaniu z rozwojem zarodka. Sporysz może rozwijać się w szerokim zakresie temperatur, lecz najbardziej optymalne warunki panują w zakresie 20-30 °C [47]. Poniżej 10 °C kiełkowanie i rozwój strzępek grzyba jest silnie hamowany. Jak pokazują badania laboratoryjne, powyżej tego progu szybkość rozwoju i jego wigor są skorelowane dodatnio z temperaturą otoczenia. W konsekwencji niskie temperatury w trakcie kwitnienia mogą zmniejszyć częstotliwość infekcji oraz ograniczyć wzrost grzyba, a zarodek uzyskuje przewagę w rozwoju nad patogenem.

Interakcja genotypowo-środowiskowa odgrywać może dużą rolę w sytuacji, gdy genotypy roślin są zróżnicowane pod kątem terminu kwitnienia. W badaniach nad męskosterylnym żytem w warunkach sztucznej inokulacji *C. purpurea*, interakcja genotypowo-środowiskowa miała większy wkład w zmienność niż efekty genotypowe. Podobne wyniki osiągnięto w badaniach nad żytem męsko-płodnym, gdzie interakcja taka była również istotna. Oznacza to konieczność testowania badanych form w kilku lokalizacjach i latach. Co za tym idzie, ranking genotypów pod względem odporności na porażenie przez *C. purpurea* w jednej lokalizacji niekoniecznie musi się dokładnie powtarzać w innych środowiskach. Jednocześnie wybrane środowisko w którym testowane są genotypy niekoniecznie musi dobrze różnicować

je pod kątem pełnej zmienności genetycznej. Podobne wyniki do tych uzyskanych dla żyta, uzyskano również dla sorga infekowanego *Claviceps africana* Frederickson, Mantle, & de Miliano .

7.3 Odporność roślin

Odporność roślin może być oparta na mechanizmach pasywnych, aktywnych, lub kombinacji obu mechanizmów [39]. Najefektywniejszym mechanizmem pasywnym jest ochrona przez klejstogamię. Rośliny samopylne, takie jak pszenica, jęczmień czy sorgo, u których zapylenie zachodzi przy zamkniętych kwiatach, obserwuje się bardzo niski stopień zakażeń sporyszem. U roślin obcopolnych, takich jak żyto czy proso, lub u mieszańców samo- i obcopolnych zbóż, kwiaty muszą pozostawać otwarte w celu zapewnienia zapylenia krzyżowego.

Aktywne mechanizmy odporności oparte na reakcji „gen na gen” (odporność jakościowa) lub na kilku genach o mniejszych efektach każdego genu (odporność ilościowa) nie zostały dotychczas znalezione. W przypadku znalezienia odporności genotypu na porażenie sporyszem pozostaje otwartą kwestią czy jest to skutek budowy kwiatu, jego zachowania czy dostępności pyłku. Sugeruje się, że w przypadku żyta jednym ze składników odporności na sporysz jest tworzenie się kalozy w obrębie załączni. Spekuluje się też, że grzyb wykorzystuje związki chemiczne biorące udział w komunikacji między pyłkiem a znamieniem dla swoich własnych korzyści [52]. Jeżeli grzyb zbyt mocno zakłócałby wzrost pyłku, reakcja odpornościowa rośliny mogłaby przeciwdziałać zapłodnieniu, a prawdopodobnie taka reakcja nie powstałaby w trakcie ewolucji. To samo odnosi się do nadwrażliwej odpowiedzi nekrotycznej załączni w stosunku do infekcji sporyszu.

7.4 Strategie hodowlane w hodowli odpornościowej przeciwko sporyszowi

W celu poprawy odporności na choroby w produkcji roślinnej konieczne są trzy etapy:

- ocena zasobów genowych i wybranie odpornej plazmy zarodkowej
- krzyżowanie wybranych genotypów z najlepszymi materiałami hodowlanymi oraz ocena segregującego potomstwa
- selekcja najbardziej obiecujących materiałów i użycie najlepszych z nich jako dawców w hodowli

Planując i zakładając doświadczenia poletkowe należy zachować szczególne warunki doświadczalne, uwzględniające poziom męskiej płodności badanych genotypów: w pełni

płodnych (np. odmiany populacyjne), o zróżnicowanej płodności (odmiany mieszańcowe i syntetyczne, materiały częściowo płodne) lub formy o zupełnej męskiej sterility (linie CMS).

W badaniach nad poszukiwaniem źródeł zmienności i odporności na sporysz, po przebadaniu ponad 250 obiektów- starych odmian i lokalnych populacji pochodzących z 5 populacji wyjściowych z Europy Środkowej i Wschodniej (Niemcy, Rosja, Ukraina) stwierdzono obecność sporyszu w przedziale 1,2%-8,1% wagowego sklerocjów w ziarnie [39,56]. Nie znaleziono żadnej plazmy zarodkowej charakteryzującej się wysoką odpornością. Powtórzenie badań na szerszym materiale również nie przyniosło efektów w postaci odpornych form, lecz stwierdzono znaczące różnice ilościowe między badanymi obiektami. Jednak zmienność ta nie była większa niż wśród wytworzonych odmian obcopylnych. Odmiany syntetyczne i mieszańcowe, użyte jako wzorce w doświadczeniach, wykazały jeszcze większą podatność niż badane stare odmiany populacyjne z powodu słabo zrestorowanych roślin wytwarzających mniej pyłku. Analiza wariancji ujawniła wysoką odziedziczalność odporności, mimo silnej interakcji genotypowo-środowiskowej. Tak więc wielokrotna selekcja materiałów oparta na wielośrodowiskowych doświadczeniach może znacznie poprawić poziom odporności. Jednocześnie wyselekcjonowane genotypy mogą być bezpośrednio użyte w bieżącej hodowli odmian o zmniejszonej podatności na sporysz.



Zdjęcie 6. Porażone sporyszem kłosa linii męskosterylnej żyta w warunkach braku dostępu ziaren pyłku [Fot. I. Kolasińska]

Zakażenia sporyszem stanowią również poważny problem w hodowli mieszańcowej i w produkcji nasiennej mieszańców (zdj. 6.). W hodowli mieszańcowej dwie lub więcej wstępnie wybranych linii wsobnych o zróżnicowanej puli genowej są stosowane jako materiał rodzicielski dla uzyskania nasion pokolenia F₁. Uzyskane hybrydy znacznie przewyższają linie rodzicielskie, a efekt ten jest określany mianem efektu heterozji (bujności). Jako że heterozja daje najwyższy efekt w pokoleniu F₁, nasiona tych odmian powinny być wytwarzane co roku na nowo z linii rodzicielskich. W zbożach takich jak żyto, sorgo czy proso, w których pręciki i słupki znajdują się w tym samym kwiecie, cytoplazmatyczna męska sterylność (CMS) jest podstawą hodowli mieszańcowej. Formy męskie CMS, które nie posiadają pyłku są używane do wyprodukowania dużych ilości nasion. W celu przywrócenia płodności w odmianie hybrydowej, forma ojcowska (zapyłacz) powinna posiadać specjalny gen przywracający płodność pyłku. W sytuacji idealnej odmiana mieszańcowa powinna wytwarzać taką samą ilość pyłku co genotyp o normalnej cytoplazmie. Jednak w praktyce w obecnie hodowanych odmianach mieszańcowych przywracanie płodności pyłku nie jest w pełni skuteczne. Stopień przywrócenia płodności zależy od użytej cytoplazmy CMS, genotypu materiałów rodzicielskich, efektywności przywrócenia płodności pyłku oraz warunków środowiskowych przed i w trakcie kwitnienia. Wyprodukowany materiał nasienny odmian mieszańcowych może zostać oczyszczony z zanieczyszczeń sklerocjami za pomocą urządzeń czyszczących, np. sortowników optyczno-elektronicznych. Jednak przy dużym stopniu zanieczyszczenia nasion produkcja nasion staje się nieopłacalna.

W innym doświadczeniu [32] potwierdzono bardzo istotny wpływ zapyłacza na zawartość sporyszu w męskosterylnych liniach żyta i pokazały konieczność dalszej pracy nad wyodrębnieniem komponentów ojcowskich oraz linii CMS mniej podatnych na porażenie [33].

Rozpoczęto również komercyjną hodowlę mieszańcową pszenicy, pszenżyta i jęczmienia, w oparciu o gametocyty (w pszenicy) lub CMS (jęczmień i pszenżyto). Mieszańce oparte na CMS mogą mocno ucierpieć z powodu sporyszu w przypadku gdy przywrócenie płodności pyłku będzie niewystarczające. Pokazano, że niezapyłona, ręcznie kastrowana pszenica wykazuje dużą podatność na *C. purpurea*, a nasilenie choroby wahało się od 16% do 82%. Niższa podatność niektórych genotypów wynikała z szybkiego wzrostu odporności po zapyleniu. Podobnie w CMS pszenicy i jęczmienia badane linie wykazywały olbrzymie różnice w porażeniu przez sporysz. Doświadczenia te pokazały, że możliwa jest odporność na

sporysz nie związana z obecnością pyłku, a polegająca na spowolnieniu rozwoju grzyba w zalążni [57,58].

Po uzyskaniu pierwszych odmian mieszańcowych zaobserwowano mniejsze wyrzucanie pyłku niż w odmianach populacyjnych [39, 59]. Średnio uzyskiwano ok. 7,5% porażenie odmian mieszańcowych przy 2,2% porażeniu odmian populacyjnych. Pylniki mieszańców były mniejsze i zawierały mniej pyłku w porównaniu do form populacyjnych.

Duże różnice w tej grupie wynikają z różnej zdolności materiału matecznego do przywrócenia płodności. Zmieszanie nasion mieszańcowych z 10% nasion odmiany populacyjnej zmniejszyło stopień porażenia ziarna sporyszem wśród odmian bardzo podatnych. Nie jest to jednak metoda wystarczająco skuteczna dla kontrolowania porażenia przez sporysz w środowiskach o silnej presji choroby. Główna przyczyna słabego przywracania płodności (restoracji) tkwi w niskiej zdolności restoracyjnej europejskich źródeł restoracji dla szeroko stosowanej cytoplazmy Pampa, pochodzącej z Argentyny. Wyższą zdolność przywracania płodności stwierdzono w zasobach genowych z Iranu i Argentyny. Geny te wprowadzono do plazmy zarodkowej elitarnych zapyłaczy. Wprowadzone geny podniosły płodność pyłku do znacznie wyższego poziomu (55%-90%) w porównaniu do poprzednich (2%-74%) [60].

W latach 2005 -2006 zarejestrowano w Niemczech nowe odmiany, zawierające nowe bardzo efektywne geny restorujące, pochodzące z populacji IRAN IX [39]. Niektóre z odmian mieszańcowych osiągnęły podobnie niski poziom porażenia przez sporysz jak odmiany populacyjne. Pokazuje to istotny postęp w redukcji podatności nowych odmian mieszańcowych na sporysz.

7.5 Genetyczne i środowiskowe zmienności w zawartości alkaloidów.

Szczepki *C. purpurea* wykazują bardzo duże zróżnicowanie w profilu wytwarzanych alkaloidów. Zróżnicowanie to ma podłoże zarówno genetyczne jak i środowiskowe. Dla celów porównawczych mierzona jest całkowita ilość alkaloidów. Badania zawartości sześciu podstawowych alkaloidów i ich izomerów w sklerocjach zebranych z 25 linii wsobnych żyta [61] wykazały jedynie niewielką zmienność lub jej brak w ilości i składzie alkaloidów, mimo że stopień porażenia linii był bardzo różny. Również w innych badaniach [62] nie znaleziono związku między całkowitą zawartością alkaloidów a podatnością genotypów żyta. Dlatego też dla celów hodowlanych czasochłonna i kosztowna analiza alkaloidów nie jest konieczna. Głównym celem hodowli w tym zakresie jest redukcja stopnia porażenia ziarna przez sporysz. Jednak znaleziono duży wpływ środowiska (kombinacja miejscowość x rok) na stężenie

i względne proporcje między poszczególnymi alkaloidami, mimo że używano do zakażenie tego samego inokulum [45]. Na ten wynik mógł wpłynąć fakt, że stosowano mieszaninę kilku izolatów *C. purpurea*. W jednym roku dominowały ergotamina i ergozyna (odpowiednio 25% i 18% wszystkich alkaloidów), a w następnym ergozyna i ergokrystyna (25% i 24%), zaś ergotamina stanowiła jedynie 11%. Dlatego też biorąc to pod uwagę można spodziewać się, że ziarno żyta zebrane w różnych rejonach i w różnych latach mogą różnić się pod względem całkowitej zawartości alkaloidów oraz ich składu jakościowego, przy jednoczesnym spełnieniu norm zawartości procentowej sklerocjów w ziarnie.

8. Metody zapobiegania i ograniczania obecności sporyszu w ziarnie zbóż

Jedną z metod zapobiegania powstawaniu sporyszu została opisana powyżej. Polega ona na wytworzeniu odmian mieszańcowych o zwiększonej produkcji pyłku, co w pewien sposób zapobiega nadmiernemu porażeniu kłosów odmian mieszańcowych zbóż. Odnosi się zarówno do produkcji materiału siewnego jak i do produkcji ziarna. Jednak ta metoda jedynie obniża obecność sporyszu do poziomu odmian mieszańcowych. Aby skutecznie walczyć ze sporyszem i jego alkaloidami należy prowadzić działania dodatkowe, polegające na:

- ograniczaniu obecności przetrwalników sporyszu w glebie
- ograniczaniu możliwości zakażenia kłosów zarodnikami.

Do najważniejszych metod ochrony należą:

8.1. Prawidłowa agrotechnika

Siew gęsty: pędy boczne i pędy o opóźnionym kwitnieniu w stosunku do całego stanowiska są bardziej narażone na porażenie sporyszem, zwłaszcza jeżeli stanowisko jest przerzedzone z powodu niekorzystnych warunków agrotechnicznych [63]. Pędy późne zawierają znacznie więcej sklerocjów niż pędy główne ponieważ nie dysponują tak dużą ilością pyłku jak pędy główne. Późno zainfekowane kłoski nadal mogą wytwarzać rosę miodową, mimo że główny plon jest już dojrzały, wnosząc znaczącą ilość sporyszu do zbieranego ziarna. Dlatego też najważniejsze jest zadbanie o dobrze przygotowane, zasilone nawozami stanowisko, w szczególności zaś przez zastosowanie odpowiedniej gęstości siewu i nawożenia azotem. Odmiany populacyjne wymagają średnio wysiewu 300-400 ziaren/m²,

a odmiany mieszańcowe o ok. 50 ziaren mniej. Gęstość siewu powinna oczywiście uwzględniać również jakość gleb i ich nawożenie. Zwarty łan zmniejsza rozpiętość terminu kwitnienia na danym stanowisku i zmniejsza wytwarzanie późnych pędów. Opóźnienie terminu siewu powoduje przesunięcie części fazy krzewienia z jesieni na wiosnę, co powoduje powstawanie wiosną słabszych pędów bocznych, bardziej podatnych na porażenie. Jeżeli porażenie sporyszem objawia się na skrajnych fragmentach pola, należy je zebrać osobno, żeby zmniejszyć ilość sporyszu w głównym zbiorze.

8.2. Zmianowanie

Ponieważ sklerocja sporyszu nie przeżywa w glebie z reguły dłużej niż rok, zmianowanie z użyciem gatunku odpornego (nie porażanego przez sporysz), bardzo zmniejsza presję infekcyjną na polu. Duże znaczenie ma dokładne przyorywanie resztek poźniwnych, niszczenie samosiewów, terminowe stosowanie podorywki i głębokiej orki, przykrywających sklerocja znajdujące się na polu. Głęboko przykryte sklerocja nie mogą na wiosnę wytwarzać askospor, lub askospory nie mogą być wyrzucane w powietrze. Odpowiednie zmianowanie ma szczególne znaczenie przy stosowaniu uprawy bezorkowej.

8.3. Kontrola dzikich traw, chwastów oraz samosiewów

Bardzo często pierwotnym źródłem zakażenia sporyszem są dzikie trawy oraz chwasty z rodziny traw rosnące na polu uprawnym lub wokół niego. Na wiosnę z przezimowanych sklerocjów sporyszu pochodzących z porażonych traw mogą być uwalniane askospory. Porażone trawy, kwitnące przez zbożami, mogą być również źródłem zakażenia poprzez wytwarzaną rosę miodową. Zawarte w niej zarodniki sporyszu mogą być przenoszone przez owady na kwitnące na polu zboża, i infekować je. Dlatego też warto usuwać to źródło infekcji poprzez kontrolę fungicydową wokół obrzeży pól. Można także obkaszać pola, rowy i miedze przed kwitnieniem traw. Podobnie jak trawy mogą funkcjonować samosiewy żyta w pszenicy lub w pszenżycie z powodu braku pyłku do przepylenia.

8.4. Stosowanie kwalifikowanego materiału siewnego

Polskie normy, podobnie jak w Niemczech i Wielkiej Brytanii, są bardzo restrykcyjne. Obecność sporyszu w materiale przedbazowym PBIII i PBII jest niedopuszczalna. Materiał bazowy B może zawierać 1 sklerocję, materiał kwalifikowany C może zawierać do 3 sztuk (mieszańcowy 4 szt.) w 500 g nasion [64].

8.5. Stosowanie fungicydów

W Polsce nie ma zarejestrowanego oficjalnie żadnego środka dedykowanego do zwalczania sporyszu w zbożach. Jednak z doświadczeń w innych krajach wiadomo, że niektóre preparaty zawierające strobiluryny zapobiegają kiełkowaniu konidiów, a tebukonazol i inne azole redukują wzrost grzybni sporyszu o 70-90%. Generalnie najwyższą skuteczność uzyskuje się stosując fungicydy przy niskiej presji infekcyjnej w sezonach suchych, i przy stosowaniu zapobiegawczym – przed kwitnieniem zbóż lub na początku tego okresu. Problemem staje się ekonomiczna opłacalność stosowania zabiegów chemicznych, zwłaszcza jeżeli trzeba je stosować dwukrotnie.

8.6. Czyszczenie mechaniczne

Usuwanie sklerocjów przed mieleniem ziarna na mąkę jest standardową praktyką w większych młynach. Stosowane są różne techniki: stoły grawitacyjne usuwające sklerocja o mniejszej gęstości niż ziarno za pomocą strumienia powietrza, optyczno-elektroniczne separatory odróżniające ciemniejsze sklerocja od jaśniejszych ziaren i oddzielające je za pomocą wydmuchiwanego powietrza. Te ostatnie urządzenia są głównie wykorzystywane przy produkcji wysokiej klasy materiału siewnego.

Informacje o wpływie nawadniania na porażenie sporyszem są nieliczne. Jednak można przypuszczać, że nawadnianie pola w początkowym okresie kwitnienia może zwiększyć presję infekcyjną. Wypalanie ściernisk, mimo skuteczności w niszczeniu inokulum sporyszu i innych chorób oraz szkodników, z powodu szkód jakie powoduje w ekosystemie, nie jest niedopuszczalne w Unii Europejskiej.

9. Podsumowanie

Mimo że od pierwszych kontaktów człowieka ze sporyszem upłynęło kilka tysięcy lat, i mimo dobrego zrozumienia budowy, biologii oraz właściwości chemicznych alkaloidów przez niego produkowanych, nadal stanowi on zagrożenie dla zdrowia ludzi i zwierząt. Zagrożenie to jest nieporównanie mniejsze niż do początku XX wieku, jednak coraz pełniejsza wiedza i możliwości oceny zawartości alkaloidów w ziarnie zbóż i produktów spożywczych pokazują, że problem jest ciągle aktualny, tonie tylko w krajach rozwijających się, ale również w krajach Unii Europejskiej. Wprowadzenie do hodowli mieszańcowych odmian zbóż, zwłaszcza żyta, w początkowym okresie nasiliło zanieczyszczenie ziarna sporyszem, jednak w chwili obecnej problem jest mocno ograniczony. Prawidłowe stosowanie dobrze opracowanych zaleceń dotyczących ochrony pól przed porażeniem przez

C. purpurea, oraz warunki przetwórstwa spożywczego pozwalają na stwierdzenie, że ziarno polskich zbóż, w tym najbardziej narażonego na zanieczyszczenie żyta, jest bezpieczne w kontekście obecności sporyszu i jego alkaloidów w środkach spożywczych. Nie zwalnia to jednak z obowiązku dalszego ciągłego monitorowania sytuacji, w tym również kontrolowania zanieczyszczenia ziarna przeznaczonego na paszę.

Spis literatury

1. Rozporządzenie (WE) nr 178/2002 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 28 stycznia 2002 r. Ustanawiające ogólne zasady i wymagania prawa żywnościowego, powołujące Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności oraz ustanawiające procedury w zakresie bezpieczeństwa żywności (OJ L 31/1 28.1.2002)
2. Rozporządzenie (WE) Nr 396/2005 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 23 lutego 2005 r. w sprawie najwyższych dopuszczalnych poziomów pozostałości pestycydów w żywności i paszy pochodzenia roślinnego i zwierzęcego oraz na ich powierzchni, zmieniające dyrektywę Rady 91/414/EWG
3. Rozporządzenie Komisji (WE) Nr 1881/2006 z 19.12.2006 ustalające najwyższe dopuszczalne poziomy niektórych zanieczyszczeń w środkach spożywczych (zastępuje rozporządzenie (WE) nr 466/2001) (Dz.U. L 364/5 z 20.12.2006).
4. Rozporządzenie Komisji (WE) nr 401/2006, ustanawiające metody pobierania próbek i analizy do celów urzędowej kontroli poziomów mikotoksyn w środkach spożywczych
5. Ustawa z dnia 25 sierpnia 2006 r. o bezpieczeństwie żywności i żywienia (Dz.U.06.171.1225).
6. Dyrektywa 2002/32/WE Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 7 maja 2002 r. w sprawie niepożądanych substancji w paszach zwierzęcych.
7. Panel EFSA ds. środków trujących w łańcuchu żywnościowym (CONTAM); opinia naukowa dotycząca występowania alkaloidów sporyszu w żywności i paszach. Dziennik EFSA 2012;10(7):2798. [158 s.] doi:10.2903/j.efsa.2012.2798. Dostępna na stronie internetowej: www.efsa.europa.eu/efsajournal.
8. Rozporządzenie Komisji (UE) 2015/1940 z dnia 28 października 2015 r. zmieniające rozporządzenie (WE) nr 1881/2006 w odniesieniu do najwyższych dopuszczalnych poziomów przetrwalników buławinki czerwonej w niektórych nieprzetworzonych

zbożach oraz w odniesieniu do przepisów dotyczących monitorowania i sprawozdawczości. (Dz.U. L 283/3 z 29.10.2015)

9. Poinar G. JR., Alderman S. & J. Wunderlich 2015. One hundred million year old ergot: psychotropic compounds in the Cretaceous? *Palaeodiversity* 8: 13–19
10. van Dongen, P.W. J. & de Groot, A.N.J.A. 1995. History of ergot alkaloids from ergotism to ergometrine. *European Journal of Obstetrics & Gynaecology and Reproductive Biology*, 60: 109-116. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0028-2243\(95\)02104-Z](http://dx.doi.org/10.1016/0028-2243(95)02104-Z)
11. Ramsbotham F. 1841. *The principles and practice of obstetric medicine and surgery*. London: Churchill,: 702–06.
12. Barger G. 1931. *Ergot and ergotism. A monograph*. London, Edinburgh: Gurney and Jackson, eds.
13. Fuchs CH. 1834. Das heilige Feuer des Mittelalters (The Holy Fire of the Middle Ages). *Hecker's Wissenschaftliche Annalen der gesammten Heilkunde*; 28: 1-81.
14. Schiff P.L. Jr. 2006. Ergot and its alkaloids. *Am. J. Pharm. Educ.*70, 98.
15. Holstege C.P. 2005. Ergot. *Encyclopedia of Toxicology* 2, 235–236.
16. Farrer D. 1978. *The Oxford dictionary of saints*. Oxford, Clarendon: 19–20.
17. Clark BJ. 1984. The versatile ergot of rye. In: Parnham M J, Bruinvels J, eds. *Discoveries in Pharmacology. Haemodynamics, Hormones & Inflammation. Vol. 2*. Amsterdam, New York, Oxford, Elsevier Science Publishers BV, 3-33
18. De Costa C. 2002. St Anthony's fire and living ligatures: a short history of ergometrine. *Lancet*; 359: 1768–70
19. Schmale, D.G., and G.P. Munkvold 2009. *Mycotoxins in Crops. The Plant Health Instructor*. DOI: 10.1094/PHI-I-2009-0715-01. Reviewed 2014.
20. King B. Outbreak of ergotism in Wollo, Ethiopia. *Lancet* 1979; 2: 1411.
21. Percebois G., 1977. L'Abbe Tessier. la Societe Royale de medecine et l'ergotisme. Etude d'une mycotoxicose au XVIIIe Siecle. *Bull Acad Soe Lor Sci*; 3: 105-16.
22. Shelby RA. 1999. Toxicology of ergot alkaloids in agriculture. In: Kren V, Cvak L, eds. *Ergot, the Genus Claviceps. Medicinal and Aromatic Plants, Vol. 6*. Amsterdam, The Netherlands: Harwood Academic Publishers:469-478.
23. Trojanowska A. 2004. Spory wokół biologii sporyszu (*secale cornutum*) w publikacjach polskich XIX wiecznych przyrodników. *Kwartalnik Historii Nauki i Techniki*, 49/2, 113-126

24. Tulasne, L.R. 1853. Mémoire sur l'Ergot des Glumacées. Ann Sci Nat Botanique. 20: 5–56.
25. <http://www.pilzopilze.de/galerie/d/2017-2/5>
26. Szweykowska A., Szweykowski J. 1992. Botanika. T. 1, Morfologia. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa
27. Mitchell, D.T.; Cooke, R.C. 1968. Some effects of temperature on germination and longevity of sclerotia in *Claviceps purpurea*. Trans. Br. Mycol. Soc. 51:, 721–729.
28. Tudzynski, P., Tenberge, K.B., Oeser, B. 1995. *Claviceps purpurea*. In Pathogenesis and Host Specificity in Plant Diseases; Kohmoto, K., Singh, U.S., Singh, R.P., Eds.; Pergamon Press (Elsevier Science Ltd.): Oxford, UK. pp. 161–187
29. Prończuk M., Wiewióra B., 1999. Badania nad występowaniem sporyszu (*Claviceps purpurea* (Fr.)Tul.) w nasionach traw. Biul. IHAR 212, 257-270.
30. Wiewióra B., Prończuk M. 2003. Occurrence of ergot in grasses seed harvested in different regions of Poland 1999-2001. Vortr. Pflanzenzuchtg, 59, 256-260.
31. Thakur R.P., King S. B. 1988. Ergot disease of Pearl Millet. ICRISAT Information Bulletin no 24.
32. Małuszuńska E., Kolasińska I, Madej L. 1998, Występowanie sporyszu w ziarnie linii męskosterylnych żyta. Biul. IHAR, 205/206, 117-123.
33. Kolasińska I, Małuszuńska E. 2004. Factors influencing the ergot infection of male sterile rye. Phytopathol. Pol. 31:15-24
34. Małuszuńska E. 1992. Występowanie sporyszu (*Claviceps purpurea* (Fr.)Tul.) w materiale nasiennym pszenżyta ozimego (X Triticosecale Wittmack). Biul. IHAR 212, 257-270.
35. Ratanopas Supachai, 1973. Evaluation of Resistance to *Claviceps Purpurea* in Two Wheat Cultivars and Effect of Fertilization on the Disease Reaction of Resistant and Susceptible Cereal Cultivars. Thesis (M.Sc.).University of Manitoba
36. S.B. Puranik, D.E. Mathre, 1971. Biology and Control of *Claviceps Purpurea* (Fr.) Tul. on Male Sterile Wheat and Barley. Phytopathology. 61: 1075-1080
37. Bandyopadhyay, R. 1992. Sorghum ergot. In: Sorghum and Millets Diseases — A Second World Review (Eds W.A.J. De Milliano, R.A. Frederiksen and G.D. Bengston), pp. 235–244. ICRISAT, Patancheru, Andra Pradesh, India.
38. Frederickson, D.E., Mantle, P.G. and De Milliano, W.A. J. 1991. *Claviceps africana* sp. nov.; the distinctive ergot pathogen of sorghum in Africa. Mycological Research 95: 1101–7.

39. Miedaner T. and H. H. Geiger 2015. Biology, Genetics, and Management of Ergot (*Claviceps* spp.) in Rye, Sorghum, and Pearl Millet. *Toxins*, 7, 659-678
40. Bandyopadhyay, R.; Frederickson, D.E.; McLaren, N.W.; Odvody, G.N.; Ryley, M.J. Ergot: A new disease threat to sorghum in the Americas and Australias. *Plant Dis.* 1998, 82, 356–367.
41. Isakeit, T.; Odvody, G.N.; Shelby, R.A. First report of Sorghum ergot caused by *Claviceps africana* in the United States. *Plant Dis.* 1998, 82, 592.
42. Tenberge, K.B. 1999. Biology and life strategy of the ergot fungi. In *Ergot the Genus Claviceps*; Křen, V., Cvak, L., Eds.; Harwood Academic Publishers: Amsterdam, The Netherlands. pp. 25–56.
43. <http://www.farmakognozja.farmacja.pl/alkaloid/index.php?alka=ergome>
44. <http://www.pg.gda.pl/chem/Katedry/Organa/attachments/article/122/9.%20Alkaloidy.ppt>.
45. Miedaner, T., Dänicke, S., Schmiedchen, B., Wilde, P., Wortmann, H., Dhillon, B.S., Geiger, H.H., Mirdita, V. 2010. Genetic variation for ergot (*Claviceps purpurea*) resistance and alkaloid concentrations in cytoplasmic-male sterile winter rye under pollen isolation. *Euphytica*, 173: 299–306.
46. Zalecenie komisji z dnia 15 marca 2012 r. w sprawie monitorowania występowania alkaloidów sporyszu w paszy i żywności (2012/154/UE) (Dz. U. L 77/20 16.3.2012)
47. McCrea, A. The reactions of *Claviceps purpurea* to variations of environment. *Am. J. Bot.* 1931, 18: 50–80.
48. Komarova E. L., and Tolkachev O. N. 2001. Medicinal plants. The chemistry of peptide ergot alkaloids. Part 2. Analytical methods for determining ergot alkaloids. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. Vol. 35, No. 10
49. Schild H. O., and B. Berde (eds.) 1978. *Ergot Alkaloids and Related Compounds* Springer Verlag, Berlin, Neid, New York, Vol. 1, p. 420, Vol. 2, p. 1003
50. Rottinghaus GE, Schultz LM, Ross PF, Hill NS 1993. An HPLC method for the detection of ergot in ground and pelleted feeds. *J Vet Diagn Invest.* 5(2):242-7.
51. Di Mavungu J.D., Malysheva S.V., Sanders M., Larionova D., Robbens J., Dubruel P., Van Peteghem C., De Saeger S. 2012 Development and validation of a new LC–MS/MS method for the simultaneous determination of six major ergot alkaloids and their corresponding epimers. Application to some food and feed commodities. *Food Chemistry* 135: 292–303

52. Hambrock, A.; Peveling, E.; Tudzynski, P. Lokalisation von Callose in verschiedenen Stadien der Entwicklung von *Claviceps purpurea* auf *Secale cereale*. In Botanikertagung 1992 Deutsche Botanische Gesellschaft, Vereinigung für Angewandte Botanik; Haschke, H.P., Schnarrenberger, C., Eds; Akademie Verlag: Berlin, Germany, 1992.
53. Kirchhoff, H. 1929. Beiträge zur Biologie und Physiologie des Mutterkornpilzes. *Centralbl. Bakteriol. Parasitenk. Abt. II*, 77, 310–369.
54. Tenberge, K.B. 1999. Biology and life strategy of the ergot fungi. In *Ergot the Genus Claviceps*; Křen, V., Cvak, L., Eds.; Harwood Academic Publishers: Amsterdam, The Netherlands,; pp. 25–56
55. Engelke, T. Ansätze für Eine Integrierte Bekämpfung des Mutterkorns (*Claviceps purpurea* [Fr.] Tul.) im Roggen. Ph.D. Thesis, University of Göttingen, Germany, 2002
56. Mirdita, V.; Dhillon, B.S.; Geiger, H.H.; Miedaner, T. 2008. Genetic variation for resistance to ergot (*Claviceps. purpurea* [Fr.] Tul.) among full-sib families of winter rye (*Secale. cereale* L.). *Theor. Appl. Genet.*, 118, 85–90.
57. Darlington, L.C.; Mathre, D.E. 1976. Resistance of male sterile wheat to ergot as related to pollination and host genotype. *Crop. Sci.* 16, 728–730
58. Darlington, L.C.; Mathre, D.E.; Johnston, R.H. 1977. Variation in pathogenicity between isolates of *Claviceps. purpurea*. *Can. J. Plant Sci.* 57, 729–733.
59. Mielke, H. 1993. Untersuchungen zur Bekämpfung des Mutterkorns. *Nachr. Deut. Pflanzenschutzd.*, 45, 97–102.
60. Miedaner, T.; Wilde, P.; Wortmann, H. 2005. Combining ability of non-adapted sources for male-fertility restoration in Pampa CMS of hybrid rye. *Plant Breed.*, 124, 39–43.
61. Miedaner, T., Mirdita, V., Rodemann, B., Drobeck, T., Rentel, D. 2010. Genetic variation of winter rye cultivars for their ergot (*Claviceps. purpurea*) reaction tested in a field design with minimized interplot interference. *Plant Breed.* 129: 58–62.
62. Mainka, S., Dänicke, S., Böhme, H., Ueberschär, K.-H., Liebert, F. 2007. On the composition of ergot and the effects of feeding two different ergot sources on piglets. *Anim. Feed Sci. Tech.* 139, 52–68.
63. Wegulo, S.N.; Carlson, M.P. Ergot of small grain cereals and grasses and its health effects on humans and livestock. 2011. University of Nebraska, Extension, EC1880. Available online: <http://ianrpubs.unl.edu/live/ec1880/build/ec1880.pdf>

64. Dz. U. z 2007 r., Nr 29, poz. 189