

Zeitschrift: Mycologia Helvetica

Band: 7 (1995)

Heft: 1

Artikel: Kernfärbung in Methacrylat-Schnitten von Hymenomyceten

Autor: Clémenton, H.

DOI: <https://doi.org/10.5169/seals-1036366>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. [Siehe Rechtliche Hinweise.](#)

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. [Voir Informations légales.](#)

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. [See Legal notice.](#)

Download PDF: 06.10.2024

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>

Kernfärbung in Methacrylat-Schnitten von Hymenomyceten

H. Cléménçon

Institut de Botanique Systématique
Université de Lausanne, Bâtiment de Biologie
CH-1052 Lausanne, Schweiz

Zusammenfassung. – Nach Aldehyd-Fixierung und Einbettung in Methacrylat können Pilzkerne in Mikrotomschnitten mit einer leicht modifizierten Haemalaunlösung nach schwefelsaurer Hydrolyse blau bis dunkelblau angefärbt werden. Im gleichen Arbeitsgang färben sich die Hyphenwände und Gallerten mauve und das Cytoplasma blass graublau, eventuell vorhandene siderophile Grana tief dunkelblau, und die Chrysocystiden zeigen einen stark violett gefärbten Einschlusskörper. Bakterien im Pilzgeflecht werden kontrastreich dargestellt.

Résumé. – Coloration des noyaux dans du matériel fongique enrobé en méthacrylates et coupé au microtome. Après fixation aldéhydique et inclusion dans des méthacrylates, les noyaux fongiques peuvent être colorés en bleu plus ou moins foncé. Les coupes sont d'abord hydrolysées à l'acide sulfurique, puis colorées avec une solution légèrement modifiée d'hémalum. Simultanément, cette méthode colore les parois et les gélins en mauve, le cytoplasme en gris bleu pâle, les granules sidérophile en bleu très foncé et l'inclusion des chrysocystides en violet foncé. Des bactéries incluses dans la trame des carpophores sont fortement mises en évidence.

Summary. – Staining fungal nuclei in methacrylate sections. Following aldehyde fixation and embedding in methacrylates, fungal nuclei can be stained dark blue in microtome sections. First, the sections are hydrolysed in sulfuric acid and then stained with a slightly modified hemalum solution. This also stains the walls and gelatinous matters in mauve, the cytoplasma a pale grayish blue, siderophilous granules a deep dark blue and the inclusion of the chrysocystidia a deep violet. Bacteria within the fruit body texture are deeply stained.

Mit Glutaraldehyd fixierte, in Methacrylat eingebettete Pilze lassen sich in Dünnschnitten mit verschiedenen Farbstoffen gut anfärben, doch stösst man bei der Kernfärbung auf grosse Schwierigkeiten (Cléménçon 1990). Nach zahlreichen Versuchen gelang es aber schliesslich, die Kerne in allen Phasen kon-

trastreich und wenn nötig selektiv anzufärben. Nur zwei Methoden gaben befriedigende Resultate: Giemsa-Färbung nach saurer Hydrolyse, und Haemalaun nach saurer Hydrolyse. Da aber die Giemsa-Färbung bereits nach ein paar Wochen verblasst, wird hier nur die Färbung mit Haemalaun beschrieben. Diese ist nicht nur einfacher und sicherer in der Durchführung, sie gibt auch kontrastreichere Bilder, färbt im gleichen Arbeitsgang die Hyphenwände und oft auch die Geflechtsgallerten in einer Kontrastfarbe und ist haltbarer.

Material und Methoden

Als Versuchsobjekte dienten Agaricales, die in Glutaraldehyd-Lösung oder mit Aldehyddämpfen fixiert und anschliessend in Methoxyäthanol aufbewahrt wurden. Zum Teil lagen die Pilze bis zu 12 Jahren im Methoxyäthanol bei $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Fixierung, Einbettung in Methacrylat, Schneiden der Blöcke und Aufkleben der Schnitte wurden bereits beschrieben (Cléménçon 1990).

In den Schnitten können die Kerne mit der folgenden Methode gut angefärbt werden.

Benötigte Lösungen

1. **Verdünnte Schwefelsäure**, 20 Volumenprozent (= ca. 30 Gewichtsprozent).
2. **Haemalaun**, modifiziert: 500 mg Hämatoxylin Merck werden in 10 ml Äthanol 96% und 5 g Kalium-Aluminiumsulfat in 190 ml dest. Wasser aufgelöst. Dann werden die beiden Lösungen vereinigt und 100 mg Natriumjodat darin aufgelöst. Zuletzt setzt man noch 200 mg Zitronensäure zu.

Die Lösung ist sofort gebrauchsfertig und lange haltbar. Sie setzt nach ein paar Monaten einen farbigen Belag an der Innenseite der Flasche ab, der aber die Brauchbarkeit der Lösung nicht beeinträchtigt. Vor jedem Gebrauch filtrieren.

3. **Ammoniak-Stammlösung**: 5 ml konzentrierte Lösung mit destilliertem Wasser auf 100 ml verdünnen.

Die Färbung

1. Hydrolyse: Die auf dem Objektträger aufgezogenen Schnitte werden bei Raumtemperatur während 45–75 Minuten in die 20%ige Schwefelsäure eingestellt. Empfohlene Dauer für noch unbekanntes Material: 1 Stunde.
2. Spülen mit Leitungswasser und dest. Wasser während je 5–10 Minuten.

3. Färben mit der Haemalaunlösung 1–2 Stunden bei Raumtemperatur. Empfohlene Dauer für noch unbekanntes Material: 90 Minuten.
4. Spülen mit einmal gewechseltem dest. Wasser während 5–10 Minuten.
5. Einstellen in Ammoniakwasser während 10–20 Minuten.
Das Ammoniakwasser stellt man sich her, indem man 1 ml der Ammoniak-Stammlösung mit destilliertem Wasser auf 100 ml verdünnt.
6. An der Luft oder auf einer Wärmebank trocknen lassen, mit Xylol befeuchten und mit Entellan oder einem gleichwertigen Medium eindecken.

Die Pilze

Als Versuchsobjekte dienten 90 Hymenomyceten, die in den Jahren zwischen 1972 und 1991 mit Glutaraldehyd fixiert und anschliessend bei -15° bis -20° C in Methoxyaethanol aufbewahrt wurden. Eingebettet, geschnitten und gefärbt wurden sie im Herbst und Winter 1991/1992. Der lange Aufenthalt im Methoxyaethanol hatte keinen Verlust der Färbbarkeit zur Folge.

Resultate und Diskussion

Färbe-Ergebnisse:

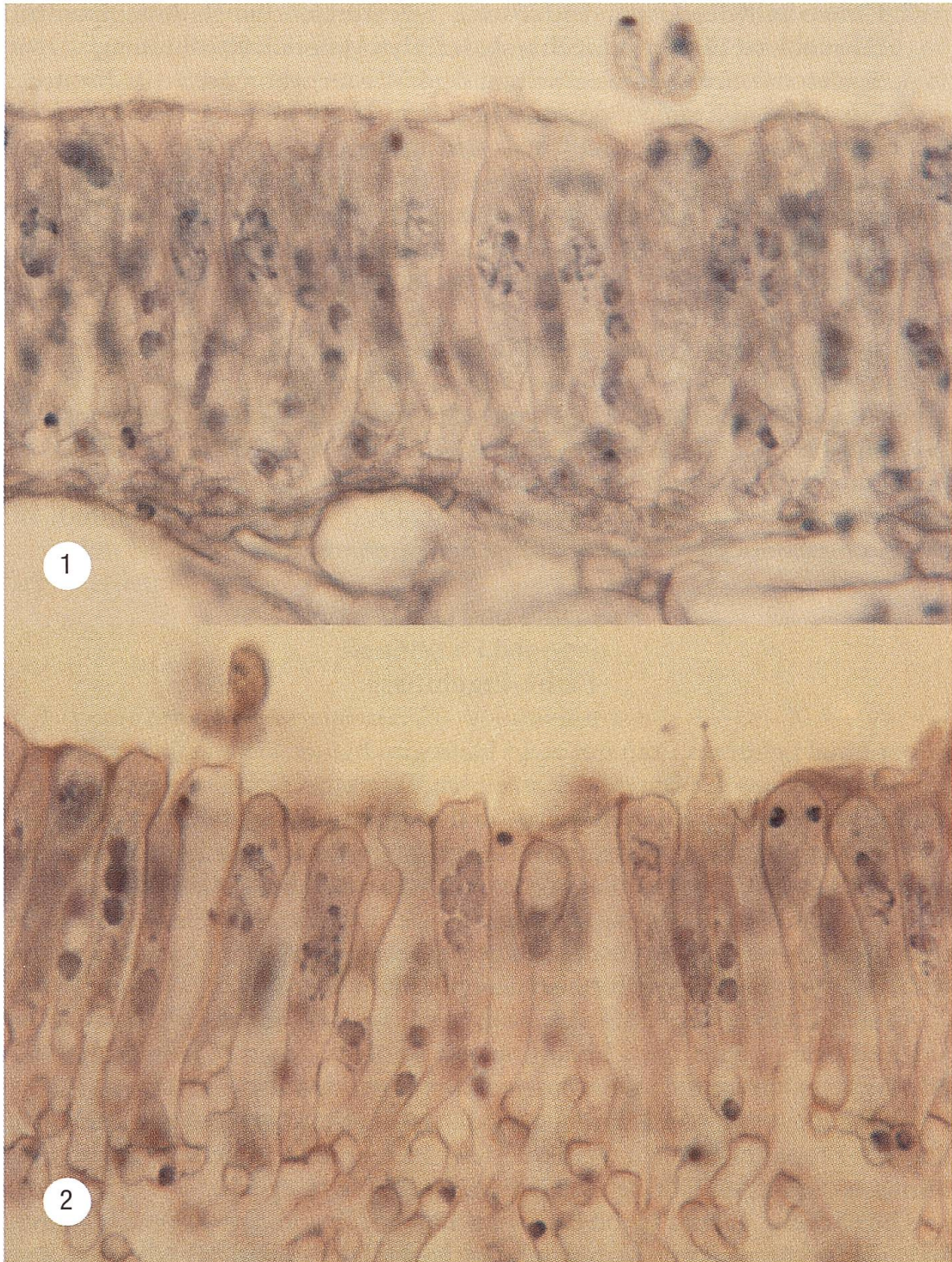
Ein optimal gefärbtes Präparat zeigt blass graublaues Plasma, himmelblaues bis dunkelblaues Chromatin, dunkelblaue bis schwarzblaue Nukleoli und mauve Wände und Gallerten. Kerne in der Prophase der Meiose zeigen stark gefärbte Chromatiden auf fast farblosem Hintergrund, die siderophile Granulation der *Lyophyllum*-Basidie färbt sich scharf und klar tief dunkelblau. Der Sekret-Inhalt der Gloeocystiden von *Russula* und *Lactarius* bleibt ungefärbt, aber die Chrysocystiden von *Hypholoma* zeigen einen intensiv violett gefärbten Einschluss neben dem blasser blau gefärbten Kern.

Die Färbung gelingt nach der üblichen Fixierung mit gepufferter Glutaraldehydlösung, aber nach Fixierung mit Aldehydgasen (Clémenton 1990) fällt sie etwas intensiver aus. Andere Fixierungen wurden nicht versucht.

Die Methacrylatmasse wird mehr oder weniger gelblich gefärbt, kann aber durch n-Propanol entfärbt werden. Meist ist dies jedoch nicht nötig, und bei dünneren Schnitten fällt der gelbliche Ton nicht ins Gewicht.

Die Färbung gelang schön bis sehr schön bei 89 von den 90 verschiedenen Arten (Hervorgehobene Arten in den Farbtafeln illustriert. Nomenklatur, ausser *Melanoleuca decembris*, nach Moser 1983 und Jülich 1984):

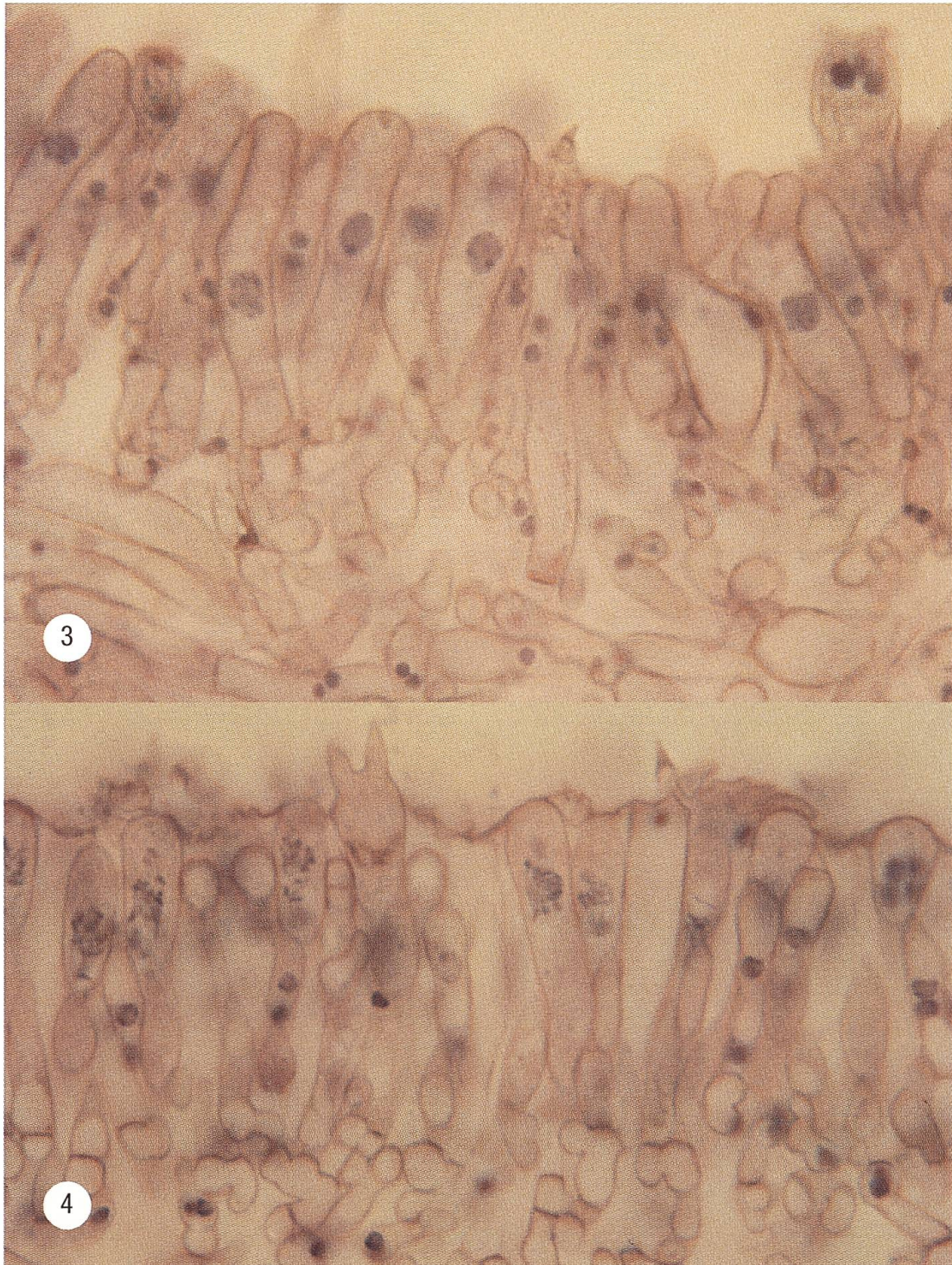
Agrocybe vervacti, *Auriscalpium vulgare*, *Boletus radicans*, *Calocybe constricta*, *Camarophyllum russocoriaceus*, *Cantharellus cibarius*, *Chamaemyces fracidus*, *Cli-*



Tafel 1: Kernfärbungen mit Haemalaun nach schwefelsaurer Hydrolyse.
1325:1

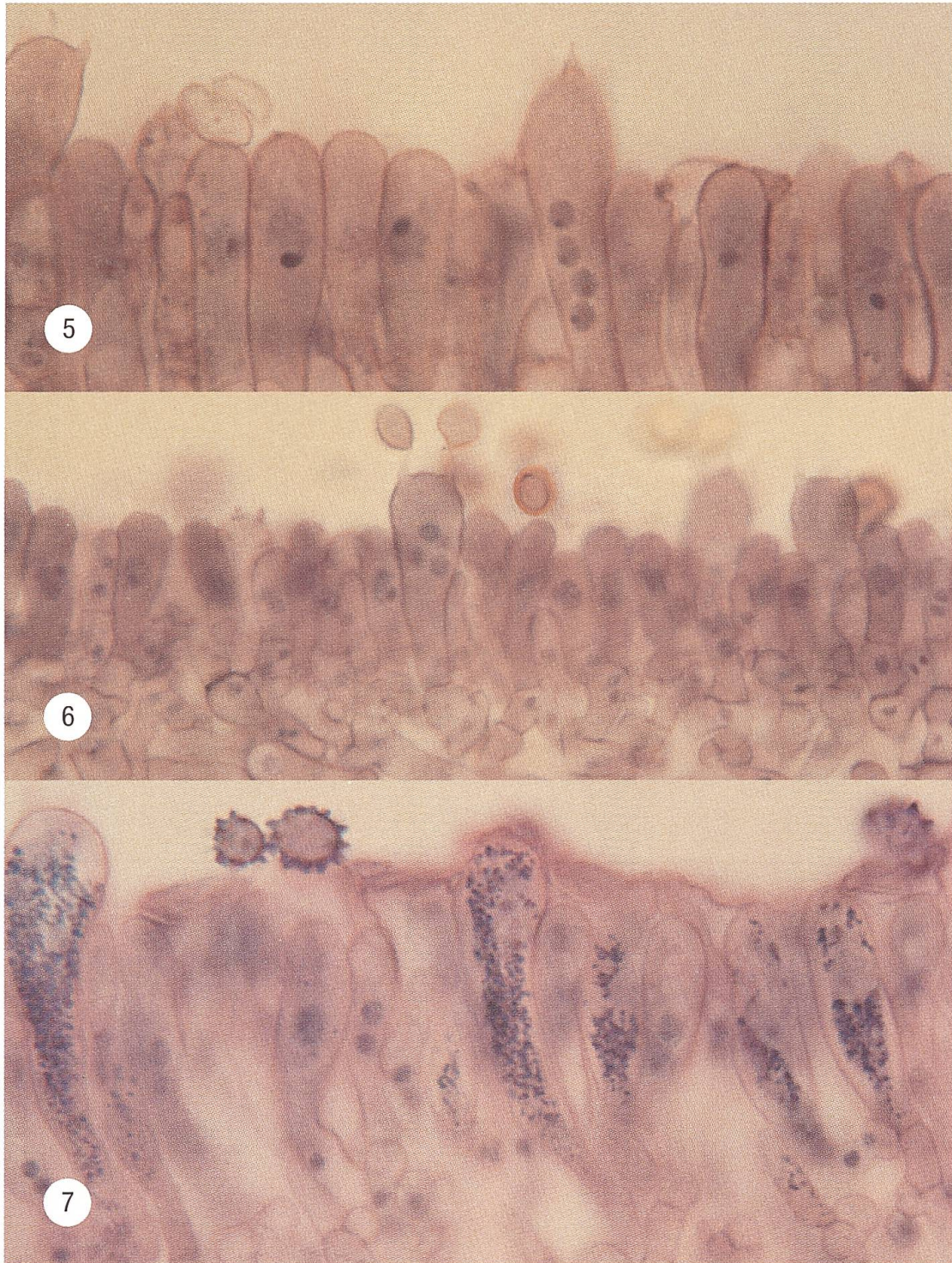
Figur 1: Hymenium von *Mycena galopus* mit zahlreichen Kernen während der meiotischen Prophase. Chromosomen gut erkennbar.

Figur 2: Hymenium von *Mycena aetites* mit Kernen in verschiedenen Phasen der Meiose.



Tafel 2: Kernfärbungen mit Haemalaun nach schwefelsaurer Hydrolyse.
1325:1

Figur 3: *Laccaria amethystina*, Basidiolen mit 2 haploiden und Basidien mit 1 diploiden Kern.
Figur 4: Hymenium von *Mycena aetites* mit Kernen in verschiedenen Phasen der Meiose.



Tafel 3: Kernfärbungen mit Haemalaun nach schwefelsaurer Hydrolyse.
1325:1

Figur 5: *Melanoleuca decembris*. Nucleolus gut sichtbar.

Figur 6: *Psilocybe rhombispora*.

Figur 7: *Calocybe constricta*. Neben den Kernen sind auch die siderophile Granulation in den Basidien und die Sporenornamente stark gefärbt.

tocybe angustissima, *Clitocybe clavipes*, *Clitocybe fuligineipes*, *Clitocybe martiorum*, *Clitocybe nebularis*, *Clitocybula lacerata*, *Collybia butyracea*, *Conocybe lactea*, *Coprinus disseminatus*, *Coprinus radicans*, *Coprinus silvaticus*, *Coprinus truncorum*, *Cortinarius speciosissimus*, *Crepidotus mollis*, *Cystoderma carcharias*, *Entoloma juncinum*, *Entoloma neglectum*, *Entoloma nitidum*, *Entoloma sericellum*, *Entoloma turbidum*, *Galerina marginata*, *Gymnopilus hybridus*, *Hemimycena gracilis*, *Hydropus floccipes*, *Hydropus subalpinus*, *Hygrophoropsis aurantiacus*, *Hygrophorus agathosmus*, *Hygrophorus atramentosus*, *Hygrophorus penarius*, *Hygrophorus pustulatus*, *Hypholoma capnoides*, *Hypholoma marginatum*, *Inocybe geophylla*, *Inocybe napipes*, *Inocybe queletii*, ***Laccaria amethystina***, *Laccaria laccata*, *Lactarius deterrimus*, *Lepiota cristata*, *Lepista irina*, *Leucopaxillus giganteus*, *Leucopaxillus mirabile*, *Macrocyttidia cucumis*, *Marasmius cohaerens*, *Marasmius graminum*, *Marasmius wynnei*, ***Melanoleuca decembris*** Métrod, *Melanoleuca spec.*, *Micromphale brassicolens*, *Micromphale foetidum*, *Micromphale perforans*, ***Mycena aetites***, *Mycena epipterygia*, *Mycena flavoalba*, *Mycena floccifera*, ***Mycena galopus***, *Mycena vitilis*, *Omphaliaster asterosporus*, *Omphalina ericetorum*, *Omphalina grossula*, *Omphalina sphagnicola*, *Omphalotus olearius*, *Oudemansiella nigra*, *Oudemansiella radicata*, *Panellus stypticus*, *Paxillus involutus*, *Phaeolepiota aurea*, *Pholiota lenta*, *Pholiotina striaepes*, *Phyllotopsis nidulans*, *Porphyrellus pseudoscaber*, *Psathyrella candolleana*, ***Psilocybe rhombispora***, *Rhodocybe truncata*, *Rickenella fibula*, *Ripartites metrodii*, *Russula rosacea*, *Strobilurus stephanocystis*, *Stropharia cyanea*, *Tricholoma inamoenum*, *Tricholoma vaccinum*, *Tricholomopsis rutilans*, *Xerocomus chrysenteron*.

Auffallend ist das schlechte oder gar negative Resultat mit einer nicht näher bestimmten Art von *Hebeloma*. Die blass gefärbten Kerne heben sich mit unbefriedigendem Kontrast vom homogen erscheinenden Cytoplasma ab, das im gleichen Farbton wie die Kerne erscheint, oder die Kerne bleiben in andern Basidien desselben Schnittes ganz unsichtbar. Gleich verhalten sich auch die Hyphen der Lamellentrama. Die Bedeutung dieser Ausnahme ist unbekannt, sowohl im technischen, als auch im mykologischen Sinn.

Bemerkungen zur Hydrolyse:

Je länger hydrolysiert wird, desto blasser wird das Cytoplasma angefärbt. Die Kerne jedoch zeigen im angegebenen Zeitintervall nur einen geringen Verlust der Anfärbbarkeit. Dadurch wird der Kontrast zwischen Cytoplasma und Kernen umso grösser, je länger hydrolysiert wird.

Die optimale Hydrolysezeit muss für jede Art neu bestimmt werden. Sie hängt nicht nur von der Pilzart, sondern auch vom gewünschten Grad der Plasmafärbung ab. Zu kurze Zeiten geben stark gefärbte, oft recht undurchsichtige Präparate.

Statt Schwefelsäure kann mit gleichem Erfolg auch halbkonzentrierte Salzsäure oder Salpetersäure verwendet werden (halbkonzentriert = konzentrierte Lösung mit dem gleichen Volumen Wasser verdünnt). Aber diese Lösungen geben störende Säuredämpfe ab, weshalb von ihrem Gebrauch abgeraten wird. Halbkonzentrierte Ortho-Phosphorsäure gibt zwar keine störenden Dämpfe ab, hat aber sehr oft die unangenehme Eigenschaft, die Schnitte unregelmässig zu quellen und stellenweise vom Glas abzulösen, was scheckige Färbung und grobe Verunreinigungen zur Folge hat.

Bemerkungen zur Färbung:

Die angegebene Haemalaunlösung ist eine Modifikation der sauren Lösung nach Mayer, wie sie bei Romeis (1968, § 648) angegeben wird. Die wesentlichsten Unterschiede liegen in der höheren Farbstoffkonzentration und im Fehlen des Chloralhydrates. Von 9 verschiedenen Varianten der Haemalaunlösung hat sie sich am besten bewährt. Zusatz von Essigsäure oder Chloralhydrat haben eine blässere Anfärbung der Pilze zur Folge und können nicht empfohlen werden.

Wird während 30–60 Minuten gefärbt, so bleiben die Hyphenwände meist farblos. Bei längeren Zeiten werden die Wände und Gallerten mauve bis lila gefärbt und zwar umso intensiver, je länger man färbt. Für die meisten untersuchten Pilze genügen etwa 90 Minuten zur klaren Darstellung der Wände; Gallerten benötigen oft etwa 2 Stunden Färbedauer. Man kann auch über Nacht färben, etwa 12–16 Stunden lang, aber dann sind die Wände so intensiv gefärbt, dass nur dünne Schnitte (unter 4–5 μm) die nötige Transparenz zeigen. Der Zellinhalt wird durch die längere Färbezeit nicht merkbar stärker angefärbt.

Die Behandlung mit Ammoniakwasser darf nicht ausgelassen werden. Erst durch diese bekommen die Schnitte ihre richtigen Farben. Wird sie abgekürzt oder gar weggelassen, so verblassen die Präparate innerhalb einiger Wochen. Dickere Schnitte (über 10 μm) sollten länger behandelt werden; man rechne etwa 2 Minuten pro 1 μm Schnittstärke, in Ganzen aber mindestens 10 Minuten.

Oft werden natürliche gefärbte Wände, z.B. braune Sporenwände, vom Haemalaun nicht angefärbt. Junge Sporen und auch gewisse Sporenornamente jedoch zeigen oft eine blaugraue, recht intensive Färbung.

In der Gallerte, in der Huttrama oder auch in der Lamellentrama verschiedener Pilze wurden Nester von Bakterien angetroffen, die durch das Haemalaun schwarzblau hervorgehoben werden. Um welche Bakterien es sich handelt und welche Rolle sie spielen, ist mir unbekannt. Bakterien scheinen normale Bewohner von Pilzen zu sein, die auch in frischen Fruchtkörpern regelmässig vorkommen (Danell & al, 1993). Sie entgehen meist der direkten

Beobachtung, aber nach der Hämatoxylinfärbung werden sie in ihrer normalen plectologischen Lage im Basidiom kräftig sichtbar gemacht.

Bemerkungen zum Eindecken:

Die Färbung ist nur dann haltbar, wenn in ein modernes, völlig neutrales Medium eingedeckt wird. Sehr gute Erfahrungen habe ich mit Entellan und Eukitt gemacht, aber andere Medien ähnlicher Beschaffenheit dürften sich ebensogut eignen. Zu vermeiden ist Kanadabalsam.

Bibliographie

Clémençon, H., 1990: Fixierung, Einbettung und Schnitffärbungen für die plectologische Untersuchung von Hymenomyceten mit dem Lichtmikroskop. – Mycol. Helv. 3: 451–466.

Danell, E., S. Alström & A. Ternström, 1993: *Pseudomonas fluorescens* in association with fruit bodies of the ectomycorrhizal mushroom *Cantharellus cibarius*. – Mycological Res. 97: 1148–1152.

Jülich, W., 1984: Die Nichtblätterpilze, Gallertpilze und Bauchpilze. Kleine Kryptogamenflora Band II b/1. Fischer, Stuttgart.

Moser, M. 1983: Die Röhrlinge und Blätterpilze. Kleine Kryptogamenflora Band IIb/2. Fischer, Stuttgart. 5. Auflage

Romeis, B. 1968: Mikroskopische Technik. Verlag Oldenburg, München.

