

# À propos de la coloration des spores (surtout discomycètes) par le bleu coton lactique = Zur Sporenfärbung (besonders der Discomyceten) mit Baumollblau-Milchsäure

Autor(en): **Brunelli, F.**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Schweizerische Zeitschrift für Pilzkunde = Bulletin suisse de mycologie**

Band (Jahr): **65 (1987)**

Heft 8

PDF erstellt am: **28.06.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-936542>

## **Nutzungsbedingungen**

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern. Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

## **Haftungsausschluss**

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

art das eigentliche Hochmoor vor, während die andere Art nur im Fichtenwaldgürtel wächst? So viele Rätsel, aber auch so viele Fragen, die unsere Gedanken beschäftigen. Aber der Formen- und Farbenreichtum dieser kurzlebigen Pilzgebilde ist nicht weniger faszinierend.

F. Freléhoux, Route des Grottes, 2926 Boncourt

(Übersetzung R. Hotz)

Abbildungen siehe Seite 155

(Für Leser des ins Deutsche übertragenen französischen Originaltextes sind die lateinischen und deutschen Bezeichnungen der betreffenden Pilzart gemäss 5. Auflage des Bestimmungsbuches von Prof. M. Moser «Die Röhrlinge und Blätterpilze» in Klammern beigegefügt.)

## **A propos de la coloration des spores (surtout Discomycètes) par le bleu coton lactique**

### **1. Notions préliminaires**

#### **1.1. Solvants, colorants, supports de colorants**

L'eau est un solvant polaire<sup>1</sup> qui dissout les composés ioniques tels KOH (potasse) et NaOH (soude) ou des composés polaires tels NH<sub>3</sub> (ammoniac, qui est une solution aqueuse de NH<sub>3</sub> avec quelques pour cent d'ions NH<sub>4</sub><sup>+</sup> et OH<sup>-</sup>, mais pas de NH<sub>4</sub>OH) ou encore le glucose ou les acides acétique et lactique. Elle dissout peu des corps non polaires tels l'iode ou le Bleu coton et la plupart des composés organiques.

L'eau n'est pas le solvant idéal, car elle n'est pas isotonique<sup>2</sup> au liquide intracellulaire; si l'on veut faire des observations *in vivo*, il faut ajouter à l'eau du glucose, à raison de 2 à 5% en masse.

L'acide lactique pur (CH<sub>3</sub>-CHOH-CO<sub>2</sub>H) est un acide alcool, miscible à l'eau en toutes proportions, et plus fort que l'acide acétique; il est par conséquent dangereux à manipuler s'il est pur. Il est visqueux à cause des interactions fortes entre molécules au sein du liquide. Par suite, il est très hygroscopique<sup>3</sup>. Il dissout mieux que l'eau les corps peu polaires et à squelette moléculaire carboné comme lui, car il est moins polaire que l'eau.

Le Bleu coton C4B est peu soluble dans l'eau parce que sa molécule contient 3 groupements phényle<sup>4</sup>. On utilise alors son sel de sodium, plus soluble, noté RA4B ou RABBBB (cf.: Donadini 1968). Par extrapolation les teinturiers, qui ont été les premiers à l'utiliser, l'avaient appelé «Bleu soluble pour coton RA4B», puis «Bleu C4B»; il teint la soie, la laine et le coton. Les chimistes, qui s'en sont servi comme indicateur coloré (virage au rouge vers pH = 11), l'ont appelé «Bleu de Poirrier C4B (Formule globale : C<sub>37</sub>H<sub>27</sub>O<sub>9</sub>N<sub>3</sub>S<sub>3</sub>Na<sub>2</sub>). Actuellement, on utilise le Bleu de méthyle («Bleu soluble pour coton 6B»), de structure extrêmement voisine de celle du Bleu C4B et ayant donc les mêmes propriétés; parfois même certains fabricants confondent les deux. Dans tous les cas, c'est leur sel de sodium (cf. Formule globale), mieux soluble dans l'eau, qui est utilisé.

La paroi sporique est constituée de 4 couches: l'endospore, l'exospore, la périspore et l'ectosporie; cette structure n'est pas lisible au microscope photonique. C'est la périspore surtout, et dans une moindre proportion l'exospore, qui sont colorées par le Bleu lactique. La périspore est en effet constituée de polysides du type callose (n fois glucose β) et de composés pectiques (n fois acide D galacturonique, galactane, galacturonane ou/et arabinane): ces matériaux sont analogues à ceux qu'on trouve dans les textiles précités.

#### **1.2. Vitesse de réaction**

La vitesse d'une réaction quelconque est fonction de trois facteurs; elle dépend de la concentration des constituants entrant en réaction, de la température à laquelle on opère et du solvant dans lequel on effectue la réaction.

Le Bleu lactique concentré agit plus vite que le Bleu lactique dilué. Mode de préparation du réactif: une

«pointe de couteau» de Bleu C4B dans 10 ml d'acide lactique pur; laisser reposer 24 h; filtrer; la solution doit être quasiment opaque sur une épaisseur de 1 cm. On pourra toujours diluer ensuite. La paroi sporique se colore plus vite par chauffage.

Le Bleu coton, lui même acide, est rendu plus réactif par dilution dans un acide solvant, ici l'acide lactique.

## 2. Usage et inconvénients

### 2.1. Bleu lactique utilisé à froid

Nous utilisons le Bleu lactique concentré pour une première observation; dans ce cas, le plus souvent, les spores sont collapsées. On peut expliquer sommairement ce phénomène comme suit:

La paroi sporique est semi perméable; l'eau passe le solvant car les molécules sont petites, tandis que les molécules d'acide lactique, plus grosses et de plus avides d'eau, ne passent pas.

Résultats: L'ornementation est parfaitement colorée (cyanophilie) surtout dans les creux. Deux exemples: *Peziza subviolacea* Svrček (= *P. praetervisa* ss. Dennis, nom non valide); nous avons créé une forme *terricola* car dans ce cas la taille des verrues varie énormément d'une spore à l'autre. *Hydnangium caroticolor* ou encore *Laccaria* sp.

Ce type d'observation est très bien visible à sec: observer une sporée sous une lame couvre-objet avec huile d'immersion (objectif  $\times 100$ ); on remarquera que les spores de 3 «espèces» de morilles ont des stries longitudinales; de même pour plusieurs *Cheilymenia* ou pour *Peziza gerardii*.

Encore faut-il savoir utiliser un microscope: De nombreuses espèces sont décrites comme étant verruqueuses alors qu'elles présentent des trous dans la périspore; par exemple les Hébéloïdes du groupe saccharioloïdes. L'observation doit être «mobile», pour que l'impression rétinienne soit «volumique», sinon on ne voit qu'un plan. En jouant ainsi sur la profondeur de champ, on observe de plus l'ornementation aux antipodes de la spore, donc à l'envers, ce qui donne souvent de précieuses indications.

### 2.2. Bleu lactique utilisé à chaud

Dans ce type d'observation, il vaut mieux diluer le colorant dans 50% d'eau environ: sur la lame porte-objet, on place la pièce à examiner, puis on écrase délicatement avec une lame couvre-objet (sauf s'il s'agit de spores!). Retirer le couvre-objet; de part et d'autre de la pièce, on place une goutte d'eau et une goutte de Bleu coton; on remet le couvre-objet et on observe à froid: On crée ainsi un gradient de concentration de Bleu lactique; les spores ne sont pas collapsées — si elles ne sont pas sèches au début — à collapsées, de plus en plus colorées également. On chauffe ensuite doucement la lame jusqu'à apparition de la première bulle (écraser la flamme du briquet pour éviter le noircissement), puis on observe. On est contraint d'utiliser cette dernière technique lorsque les spores sont contenues dans les asques.

Résultats: Les spores mûres ont seulement l'ornementation de la périspore colorée. Un trop long chauffage colore toute la plaque péri- et endosporique et alors l'ornementation ne se voit plus. Les spores immatures ont leur sporoplasme coloré en bleu.

Les asques mûrs sont hyalins et vides d'ascoplasme.

Par chauffage, on risque de détruire le périascus de l'asque, partie colorable par l'iode chez les *Peziza*. On pourra utiliser cette méthode pour *Peziza lobulata*, *P. vesiculosa* (spores lisses mais à plaque colorable) et pour certains *Thecoteus*. On remarquera, en travaillant bien, sans «supermicroscope», que des Discomycètes décrits avec des spores lisses ont en réalité des spores ornées de «fines» verrues: *Parascuttellinia violacea*, *P. carneosanguinea*, *Trichophaeopsis tetraspora*, *T. bicuspis*, etc.

## 3. Techniques associées

Actuellement, beaucoup de mycologues professionnels utilisent le Bleu coton phéno-lactique (= dissolution de Bleu C4B dans acide lactique + phénol), mais en chauffant légèrement la préparation. Le lactophénol éclaircit la préparation parce que le phénol est caustique<sup>5</sup>; ce réactif est plus dangereux à manipuler et à préparer. Nous ne l'utilisons que très rarement car il ne présente aucun avantage notable sur le Bleu C4B lactique simple.

Le Giemsa est un réactif composé de: Bleu azur, Bleu de méthylène, Eosine, le tout en solution dans le complexe méthanol-éthanol-glycérol. A un pH faible (4 et au-dessous), les bleus se comportent comme le Bleu coton: il n'y a plus coloration des noyaux, mais de l'ornementation; à un pH élevé (pH = 11), c'est l'éosine qui colore la même ornementation en rouge.

Nous n'avons fait qu'effleurer le problème du Bleu lactique et de ses usages. Nous espérons tout de même avoir rendu service à nos collègues mycologues en écrivant cet article sans grande prétention.

### Notes

- <sup>1</sup> Une substance est dite *polaire* si sa molécule est caractérisée par un champ magnétique induit par sa structure propre.
- <sup>2</sup> Si deux substances séparées par une paroi semi-perméable sont *isotoniques*, il ne se produit pas de phénomène osmotique ni dans un sens ni dans l'autre. Si par exemple un liquide est isotonique au contenu cellulaire d'une spore, celle-ci ne se collapse pas ni ne grossit par échanges transmembranaires.
- <sup>3</sup> Un corps est dit *hygroscopique* s'il est «avide d'eau». Une cellule hygroscopique a tendance à gonfler en présence d'eau.
- <sup>4</sup> Le radical *phényle* ( $C_6H_5-$ ) est un groupe dérivé du cycle du benzène par suppression de l'hydroxyle (-OH).
- <sup>5</sup> Quelques grains de phénol placés sur la peau détériorent rapidement celle-ci: elle blanchit, puis fait des cloques. Il faut se laver les mains avec de la soude diluée, puis avec du bicarbonate de sodium. Pour les yeux, les laver au bicarbonate de sodium, puis consulter un médecin.

### Bibliographie

Donadini J. C. et Donadini G. 1968. Lexique technique des produits chimiques. 2 tomes. 2000 p. Rousset éd. Paris.

Donadini J. C. et Escoffier J. 1973. Additif au Lexique. 700 p.

J. C. Donadini, Laboratoire de Chimie générale, Université de Provence, Marseille  
F. Brunelli, Rue du Tunnel 18, 13288 Sion

## Zur Sporenfärbung (besonders der Discomyceten) mit Baumwollblau-Milchsäure

### 1. Vorbemerkungen

#### 1.1. Lösungsmittel, Färbemittel, Farbträger

Wasser ist ein polares<sup>1</sup> Lösungsmittel; es löst Ionen-Verbindungen wie KOH (Kalilauge) und NaOH (Natronlauge) oder polare Verbindungen wie  $NH_3$  (Ammoniak — enthält in wässriger Lösung einige Prozent  $NH_4^+$ - und  $OH^-$ -Ionen aber kein  $NH_4OH$ ) sowie auch Glucose oder Essigsäure und Milchsäure. Nicht oder nur wenig wasserlöslich sind unpolare Stoffe wie Jod, Baumwollblau und die Mehrzahl der organischen Verbindungen.

Wasser ist kein ideales Lösungsmittel, weil es sich zur intrazellulären Flüssigkeit nicht isotonisch<sup>2</sup> verhält; für Beobachtungen in vivo muss man ihm 2—5% (Gewicht) Glucose zusetzen.

Reine Milchsäure ( $CH_3-CHOH-CO_2H$ ) ist ein Säurealkohol; sie ist sehr hygroscopisch<sup>3</sup> und mit Wasser in jedem Verhältnis mischbar. Da sie stärker sauer ist als Essigsäure, ist ihre Handhabung in reiner Form nicht ungefährlich. Infolge starker Wechselwirkungen zwischen den Molekülen in der Flüssigkeit ist sie viskos. Da sie weniger polar ist als Wasser, hat sie ein besseres Lösungsvermögen für Stoffe von geringer Polarität und für Verbindungen mit kohlenstoffhaltiger Molekularstruktur, zu denen sie ebenfalls gehört. Das Baumwollblau ist wenig löslich in Wasser, da sein Molekül 3 Phenylgruppen<sup>4</sup> enthält. Man verwendet deshalb sein besser lösliches Natriumsalz, bezeichnet als RA4B oder RABBBB (cf.: Donadini 1968). Die Färber, die es als erste benutzten, nannten es deshalb «Wasserblau für Baumwolle RA4B», später «Blau

C4B»; es färbt Seide, Wolle und Baumwolle. Die Chemiker verwendeten es als Farbindikator (Umschlag nach rot gegen pH=11) und nannten es «Poirrier-Blau C4B» (Summenformel:  $C_{37}H_{27}O_9N_3S_3Na_2$ ). Neuerdings braucht man das Methylblau («Wasserblau für Baumwolle 6B»), das dem «Blau C4B» strukturell sehr nahe verwandt ist und deshalb die gleichen Eigenschaften aufweist; gelegentlich werden die beiden von gewissen Herstellern auch verwechselt. In jedem Fall kommen ihre besser löslichen Natriumsalze (siehe Summenformel) zur Anwendung.

Die Sporenwand besteht aus 4 Schichten : Endospor, Exospor, Perispor und Ektospor; diese Struktur kann im Lichtmikroskop nicht beobachtet werden. Mit Baumwollblau- Milchsäure lässt sich vor allem das Perispor anfärben, in geringerem Masse auch das Exospor. Tatsächlich ist das Perispor aus Polyosen vom Typ Kallose (n-mal  $\beta$ - Glucose) und aus pektinartigen Verbindungen (n-mal Galakturonsäure, Galaktan, Galakturonan und/oder Arabinan) aufgebaut, also aus gleichartigen Stoffen, wie man sie in den oben erwähnten Textilfasern findet.

## 1.2. Reaktionsgeschwindigkeit

Die Geschwindigkeit irgend einer Reaktion ist die Funktion von drei Faktoren; sie ist abhängig von der Konzentration der Reaktionsteilnehmer, von der Temperatur beim Arbeitsvorgang und vom für die Reaktion verwendeten Lösungsmittel.

Baumwollblau-Milchsäure reagiert in konzentrierter Form schneller als in Verdünnung, die Sporenwände lassen sich durch Erwärmen rascher anfärben und Zugabe eines sauren Lösungsmittels (wie hier Milchsäure) erhöht die Reaktionsgeschwindigkeit des an sich schon sauer reagierenden Baumwollblaus. Herstellungsvorschrift für das Reagens: Eine «Messerspitze» Blau C4B zu 10 ml reine Milchsäure geben, 24 Stunden stehen lassen und dann filtrieren. Die Lösung muss in einer Dicke von 1 cm schwach durchscheinend sein; nötigenfalls kann man sie nachher noch verdünnen.

## 2. Verwendung und Nachteile

### 2.1. Baumwollblau-Milchsäure bei kalter Anwendung

Für eine erste Beobachtung verwenden wir das konzentrierte Reagens, wobei dann aber die Sporen mehrheitlich kollabieren. Dieses Phänomen lässt sich kurz zusammengefasst wie folgt erklären: Die Sporenwand ist halbdurchlässig; wegen seiner kleinen Moleküle dringt das Wasser durch, während die grösseren und zudem wasseranziehenden Moleküle der Milchsäure nicht passieren können.

Resultate: Die Ornamente werden sehr gut angefärbt (Cyanophilie), besonders in den Vertiefungen. Beispiele: *Peziza subviolacea* Svrček (= *P. praetervisa* ss. Dennis, ungültiger Name); wir haben eine forma *terricola* geschaffen, da in diesem Fall die Grösse der Warzen von einer zur andern Spore stark variiert. Weiter *Hydnangium caroticolor* oder auch *Laccaria* spec.

Diese Art der Beobachtung kann sehr gut trocken vorgenommen werden: Betrachten eines Sporenabwurfs unter einem Objektträger-Deckglas mit Immersionsöl (Objektiv  $\times 100$ ); man wird feststellen, dass die Sporen bei 3 «Arten» von Morcheln längsgestreift sind, ebenso bei mehreren *Cheilymenia* oder bei *Peziza gerardii*.

Auch der Gebrauch des Mikroskops muss gelernt sein: Viele als warzig beschriebene Arten haben tatsächlich Höhlungen im Perispor, wie z. B. *Hebeloma*-Arten der Gruppe *sacchariolens*. Die Beobachtung muss «beweglich» erfolgen, damit der optische Eindruck dreidimensional wird, da man sonst nur eine Fläche sieht. Wenn man so mit der Tiefenschärfe arbeitet, kann man zusätzlich auch die Ornamentierung auf der Gegen- bzw. Rückseite der Spore beobachten, was oft wertvolle Hinweise geben kann.

### 2.2. Baumwollblau-Milchsäure bei warmer Anwendung

Bei dieser Art der Beobachtung wird das Reagens zweckmässigerweise mit etwa 50% Wasser verdünnt. Man bringt das zu prüfende Stück auf einen Objektträger, dann quetscht man vorsichtig mit einem Deckglas (ausgenommen bei Sporen!). Man entfernt das Deckglas, bringt auf die eine Seite der Probe einen



Tropfen Wasser, auf die andere einen Tropfen Baumwollblau-Milchsäure, setzt das Deckglas wieder auf und beobachtet in der Kälte: Man erreicht so ein Konzentrationsgefälle an Baumwollblau. Die Sporen sind nicht kollabiert — wenn sie nicht von Anfang an trocken sind — bis kollabiert und auch immer stärker gefärbt. Man erwärmt nun langsam den Objektträger, bis das erste Bläschen erscheint (Flamme löschen, um ein Schwarzwerden zu vermeiden) und beobachtet. Man muss diese letztere Technik anwenden, wenn die Sporen sich in den Schläuchen befinden.

Resultate: Bei reifen Sporen werden nur die Ornamente des Perispor gefärbt. Zu langes Erwärmen färbt die ganze Perispor- und Endosporschicht, womit keine Ornamentierung mehr sichtbar ist. Bei unreifen Sporen wird das Sporoplasma blau gefärbt. Reife Schläuche sind hyalin und enthalten kein Ascoplasma. Durch Erwärmen riskiert man eine Zerstörung des Periascus, den durch Jod anfärbbaren Teil des Ascus bei *Peziza*. Diese Methode ist anwendbar für *Peziza lobulata*, *Peziza vesiculosa* (Sporen glatt aber mit färbbarer Oberflächenschicht) und für gewisse *Thecoteus*. Man wird bei sorgfältigem Arbeiten auch ohne «Supermikroskop» feststellen, dass z. T. als glattsporig beschriebene Discomyceten tatsächlich Sporen mit ganz feinen Warzen haben: *Parascutellinia violacea*, *P. carneosanguinea*, *Trichophaeopsis tetraspora*, *T. bicuspis*, usw.

### 3. Verwandte Techniken

Neuerdings verwenden viele professionelle Mykologen das Baumwollblau mit Lactophenol (= Lösung von Blau C4B in Milchsäure + Phenol), aber mit leichtem Erwärmen des Präparates. Das Lactophenol hellt die Probe auf, weil das Phenol ätzend<sup>5</sup> wirkt; dieses Reagens ist bezüglich Handhabung und Herstellung gefährlicher. Wir brauchen es nur sehr selten, da es keinen merklichen Vorteil gegenüber dem gewöhnlichen Baumwollblau (mit Milchsäure) aufweist.

Giemsa ist ein Reagens zusammengesetzt aus Azurblau, Methylenblau und Eosin gelöst in einer Mischung von Methanol, Aethanol und Glycerin. Bei einem niedrigen pH (=4 und darunter) verhalten sich die blauen Komponenten wie Baumwollblau: keine Färbung des Kerns, nur der Ornamente; bei erhöhtem pH (=11) werden dieselben Ornamente durch das Eosin rot gefärbt.

Wir haben hier das Problem des Baumwollblaus und seiner Verwendung nur gestreift, hoffen aber, mit diesem ohne besondere Ansprüche verfassten Artikel unseren mykologischen Kollegen trotzdem einen Dienst erwiesen zu haben.

#### Anmerkungen

- <sup>1</sup> Eine *polare* Verbindung ist charakterisiert durch ein Magnetfeld, das durch die ihr eigene Molekularstruktur hervorgerufen wird.
- <sup>2</sup> Wenn zwei durch eine halbdurchlässige Membran getrennte Substanzen *isotonisch* sind, tritt keine Osmose ein, weder in der einen noch der andern Richtung. Wenn z. B. eine Flüssigkeit zum Zellinhalt einer Spore isotonisch ist, findet kein Austausch durch die Zellwand statt, und die Spore wird weder schrumpfen noch sich ausdehnen.
- <sup>3</sup> *Hygroskopisch* bedeutet wasseranziehend. Eine hygroskopische Zelle hat in Gegenwart von Wasser die Tendenz anzuschwellen.
- <sup>4</sup> mit *Phenyl* bezeichnet man ein Radikal (einwertiger Benzolrest), das aus Phenol durch Abspaltung der Hydroxylgruppe (-OH) entstanden ist.
- <sup>5</sup> Einige Körnchen Phenol auf der Haut bewirken eine rasche Zerstörung: zuerst Ausbleichen und dann Blasenbildung. Bei Kontakt muss man die Hände zuerst mit verdünnter Natronlauge, dann mit Natriumbikarbonat-Lösung waschen. In den Augen sofort mit Natriumbikarbonat-Lösung spülen, dann einen Arzt aufsuchen.

J. C. Donadini, Laboratoire de Chimie générale, Université de Provence, Marseille  
F. Brunelli, Rue du Tunnel 18, 1950 Sion

(Übers.: H. Baumgartner)

*Literatur:* siehe französischen Text