

Die Seite für den Pilzmikroskopiker

4. Folge Mikroskopieren von Kernpilzen

von Hans-Dieter Zehfuß, Pirmasens

In der Folge 3 der „Seite für den Pilzmikroskopiker“ bin ich auf das Mikroskopieren von weichfleischigen Ascomyceten eingegangen. Diese Folge beschäftigt sich nun mit den „hartfleischigen Ascomyceten“, den sog. Kernpilzen. Pyrenomyceten nehmen im Bewusstsein der Pilzfreunde eine gespaltene Stellung ein. Einerseits dürften die Stromata der bei uns häufigen Arten jedem Pilzinteressierten bekannt sein, da man ihnen das ganze Jahr über in den Wäldern begegnen kann, andererseits bleibt die ganz überwiegende Anzahl der weltweit auf ca. 20 000 Arten geschätzten Gruppe auch vielen vertieft arbeitenden Mykologen unbekannt.

Die Hauptwachstumsphase dieser Pilze liegt wie die vieler Corticiaceae in den Monaten Novem-

ber bis März. Sie eignen sich deshalb zusammen mit diesen hervorragend für mikroskopische Studien an Winterabenden.

Pyrenomyceten sind Saprobionten, die ihren Substraten in optimaler Weise angepasst sind. Substrate sind abgestorbene Blätter, Stengel von Gefäßpflanzen, Zweige und Ästchen von Sträuchern und Bäumen sowie Kot von Tieren (Paarhufer). Sowohl von ihrer eigenen Masse her, wie durch die sehr begrenzte Fähigkeit zur Speicherung von Wasser, vermögen diese oft nur kleine und speziell angepasste Pilze zu tragen. Die in Frage kommenden Arten sollten neben anderen Eigenschaften auch die Fähigkeit besitzen, soviel wie möglich von der nur vorübergehend vorhan-

denen Feuchtigkeit festzuhalten. Die Perithezieren der Pyrenomyceten entsprechen genau diesen Anforderungen. Es handelt sich dabei um kleine bis kleinste kugelförmige Hohlkörper aus einem verdunstungshemmenden Wandgewebe (Peridium), deren Innenseite mit dem Hymenium, bestehend aus Ascii und Paraphysen ausgekleidet ist. Solchermaßen gestaltet, erinnern sie etwas an das Bauprinzip von Bauchpilzen.

Die notwendigerweise kleinen Hymenien vermögen nur verhältnismäßig wenige Sporen zu produ-

Standortaufnahme vom Rasig-krustigen Buchen-Kugelpilz *Melanomphora spiniferum* (Wall.) Lafl. (Syn. *Melogramma spiniferum* (Wallr.) De Not.).

Der Pilz wächst an der Stammbasis bis schenkeldicker, abgestorbener Buchen. Foto: H.-D. Zehfuß

kein Speisepilz



Hymenialstrukturen von *Melanomphora spiniferum*: Asci mit Sporen, präpariert in Chloralhydrat. Weiteres siehe Erb/Matheis: Pilzmikroskopie.

zieren (selbst einige tausend sind wenig). Diese werden nach der Reife durch eine Öffnung, im Scheitel der Perithezien, dem Ostiolum, in die Außenwelt entlassen. Zum Verdunstungsschutz sind Ostiolen innen mit sehr feinen, frei endenden Hyphen, sog. Periphysen ausgekleidet. Das Manko der Keinfrüchtigkeit gleichen die Ascohymeniales (Asci einwandig) durch eine größere Anzahl beieinander stehender Perithezien aus. Bei einigen Arten der Ordnung Ascoloculares (Asci doppelwandig) sind die Hymenien in die Peripherie eines Stroma eingebettet, andere sitzen ihm auf. Bei den Esteren punktieren die Ostiolen die Stromata oder ragen als kleine Wäzchen aus ihnen hervor (Lupe). Solche Stromata, die als ganzes dem Substrat aufgewachsen oder darin eingebettet sein können, erreichen bis mehrere Zentimeter Durchmesser (z.B. beim Brandkrustenpilz *Hypoxylon deustum* (Hoffm.: Fr.) Grev. Dezimetergröße). Sie sind dann auffällig und werden häufig als „Fruchtkörper“ fehlgedeutet. Die Stromata weisen vor allem in trockenen Jahreszeiten und als Exsikkate eine kohlig-bröckelige Konsistenz auf.

Pyrenomyceten sind also keine „primitiven“, sondern optimal entwickelte Pilze. Die Wirksamkeit dieser Anpassung wird durch die große Zahl von Arten, die sie hervorgebracht haben, unterstrichen.

Die Kernpilze haben keine sehr unterschiedlich gestalteten Fruchtkörpertypen hervorgebracht, wie viele der anderen Pilzgruppen. Daher ist mit makroskopischer Bestimmung wenig bei ihnen auszurichten. Eine erfolgreiche Bestimmung der Arten ist nur unter dem Einsatz eines Mikroskopes möglich. Von Bedeutung dabei sind im wesentlichen Größe und Form der Sporen, die Form der Paraphysen und vor allem die Beschaffenheit der Asci mit dem Apikalapparat.

Wegen der Konsistenz des Untersuchungsmaterials ist man häufig auf Handschnitte angewiesen, weil wohl nur in den seltensten Fällen und nur bei Profis ein Mikrotom zur Verfügung steht.



Man bedient sich also einer (neuen) Rasierklinge und hebt im ziehenden Schnitt kleine Scheibchen vom Pilzgewebe ab. Bei einiger Übung ist dies leicht möglich. Durch die Struktur der so gewonnenen Partikel kann es leicht vorkommen, dass sich bei ihrer Übertragung in das Untersuchungsmedium Luftblasen bilden.

Ich untersuche deshalb alle Proben zunächst in „entspanntem Wasser“. Dazu habe ich ein Fläschchen mit Leitungswasser, mit 1-2 Tropfen Lenor (Spülmittel) versetzt. Bei Trockenmaterial nehme ich 5% Kalilauge zum aufquellen. Danach lässt sich das Material quetschen. Grundsätzlich ist es vorteilhafter Frischmaterial zu untersuchen.

Sind alle für eine Bestimmung wichtige Strukturen eigengefärbt, erübrigt sich eine Anfärbung des Präparates. Ist dies nicht der Fall, empfiehlt sich eine Färbung mit Baumwollblau in Lactophenol. Exsikkate können direkt in 3-5% Kalilauge aufgequollen werden, der man Baumwollblau bis zur Sättigung zugegeben hat (Herstellung wie bei Technik c. in der Folge 3 beschrieben). Zur Feststellung der Jod-positiv- resp. Jodnegativ-Reaktion der Ascusspitzen wird Melzers Reagens (in der Anwendung wie in Folge 3 beschrieben) empfohlen Teilweise erreicht man damit auch eine Anfärbung des Gewebes.

wird fortgesetzt

Einwurf: Unfug mit Melzer

von Prof. H. Clemençon, Lausanne aus: Schweizerische Zeitschrift für Pilzkunde 2000 (6); von H.-D. Zehfuss in unwesentlichen Teilen gekürzt und leicht abgeändert.

Ich weiss nicht, woher die Unsitte stammt, aber sie ist weit verbreitet, von Österreich bis England - und leider auch bei uns. Neuerdings tritt sie in Form von <<Melzer I und Melzer II>> auf und beruht auf der Irrmeinung, Melzers Reagenz sei nicht haltbar, und das Chloralhydrat müsse erst kurz vor Gebrauch zugesetzt werden. Aber das ist falsch und führt zu Komplikationen und manchmal zu Fehlern.

Etwa 75 Jahre lang wurde Melzers Reagenz von allen Mykologen mit Erfolg gebraucht, so wie sie von Melzer (1924) angegeben wurde: In 20 ml dest. Wasser werden nacheinander (und in dieser Reihenfolge) 1,5 g Kaliumjodid, 0,5 g Jod und 22 g Chloralhydrat aufgelöst. W. MATTHEIS (1972:42) schrieb: „Diese Lösung ist nach meinen Erfahrungen mehrere Jahre haltbar, d.h. das Chloralhydrat muss nicht erst kurz vor Gebrauch zugesetzt werden.“ Auch H.O. BARAL (1987: 410) fand keinen Unterschied in der Färbekraft einer vier Jahre alten Lösung und einer frisch zubereiteten.

Aber Meixner (1975: 7) schrieb: „Das Chloralhydrat gibt man am besten erst kurz vor Gebrauch zu“, und Moser (1978: 5, 1983: 5) doppelte nach: „Chloralhydrat am besten erst kurz vor Gebrauch zusetzen“: Ein Grund weshalb das Chloralhydrat nicht von Anfang an zugegeben werden soll, wird nicht genannt. Wahrscheinlich ist dieser im Sauerwerden der Lösung zu suchen. Chloralhydrat ist Trichloroacetaldehyd, das zu Trichloressigsäure oxidiert werden kann. Damit wird die Lösung sauer. Ich habe dies roh gemessen (mit Universalindikator pH 0 - 14 von Merck). Frisch angesetzte 50%ige Chloralhydratlösung hat einen pH-Wert von 3, eine 30 Monate alte Lösung eine pH-Wert von etwa 1 und ist damit rund hundertmal saurer (leider konnte ich nicht Melzers Reagenz direkt messen, denn das Jod färbt die Teststreifen schwarzbraun). Saures Melzers Reagenz ist aber voll wirksam. Chloralhydrat wurde ursprünglich aus optischen Gründen der Jodlösung beigegeben, um die Sporenornamente der Täublinge klarer sichtbar zu machen. Wenn nun die Lösung sauer und das Chloralhydrat zum grossen Teil zu Trichloressigsäure geworden ist, so ändert sich der Säuregrad stark, aber die optischen Eigenschaften (der Brechungsindex) nur wenig. In diesem Sinne ist Melzers Reagenz stabil, haltbar und auf Jahre hinaus uneingeschränkt brauchbar.

Chloralhydrat ist ein kristallines Pulver, nicht eine Flüssigkeit, aber sowohl Meixner (1975) als auch Moser (1978, 1983) haben unverständlicherweise 20 ml Chloralhydrat, statt 22 g Chloralhydrat. Dies hat wohl zu einer gewissen Konfusion geführt und gipfelt in der neuerlichen Unsitte, zwei Lösungen in Umlauf zu bringen, Melzer I und Melzer II. Ich habe diese Lösungen auf einer mykologischen Studientagung in der Schweiz gesehen. Melzer I war eine (zu schwache) Jodlösung, Melzer II eine Chloralhydratlösung, beide waren ohne Angabe der Konzentration und ohne Gebrauchsanweisung.

Dies führte dazu, dass die Lösungen vor Gebrauch auf dem Objektträger gemischt werden, oder dass der Pilz zuerst in Melzer I getränkt und dann in Melzer II untersucht wurde. Beides ist falsch, denn in beiden Fällen stimmen die Konzentrationen nicht mehr. Diese sind aber wichtig, denn sowohl die Jod-Konzentration als auch die Gegenwart von Chloralhydrat spielen eine ganz wichtige Rolle in der Farbreaktion (Baral 1987). Die entstehenden Farben hängen stark von der Jod-Konzentration ab, und gewisse Reaktionen laufen nur in Gegenwart von Chloralhydrat ab. Teilweise entstanden auch Verwirrungen dadurch, dass nicht die Jodlösung, sondern die Chloralhydratlösung mit Melzer I angeschrieben war! Melzer I und Melzer II ist nicht nur eine Unsitte, es ist ein Unfug!

Fazit: Man mache Melzers Reagenz wie oben angegeben (mit dem Chloralhydrat von Anfang an drin). Dies verhindert Irrtümer und spart Zeit.

Bibliographie:

- Baral, H.O.** (1987): Lugol's solution/IKI versus Melzers reagent: Hemiamyloidity, a universal feature of the ascus wall. - Mycotaxon 29: 399-450.
- Matheis, W.** (1972): Chemische Reaktionen in der Hand des Mykologen. - Zeitschr. f. Pilzkunde 30: 33-47.
- Meixner, A.** (1975): Chemische Farbreaktionen von Pilzen. - Cramer Verlag Vaduz.
- Melzer, M.V.** (1924): L'ornamentation des Spores des Russules. - Bul.. Soc. myc. France 40: 78-81.
- Moser, M.** (1978, 1983): Die Röhrlinge und Blätterpilze. 4. und 5. Auflage. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Abdruck mit freundlicher Genehmigung des Autors und der Reaktion der SZP.**