Chemische und kristallographische Untersuchungen an Cystidenkristallen der Gattung Inocybe

H. KOSTYRA

Staatliches Forschungsinstitut für Angewandte Mineralogie Kumpfmühlerstraße 2 – Dörnberg-Palais, D-8400 Regensburg

Eingegangen am 17.11.1992

Kostyra, H. (1993) – Chemical and crystal-optical Analysis on Cystidial crystals in the Genus Inocybe. Z. Mykol. 59(1): 77–98.

Key Words: Agaricales, Inocybe godeyi, Inocybe nitidiuscula, cystidial crystals, calcium oxalate, whewellite, wheddellite, chemical and crystallographic methods of analysis.

Summary: Cystidial crystals of *Inocybe godeyi* and *nitidiuscula* were analysed by various methods. Chromatographic, spectrographic and microchemical analysis unanimously proved the formula of calcium oxalate. Due to the small size of the crystals the water content – the decision if mono- or polyhydrate – could not be determined by X-ray diffraction. On the other hand, crystal-optical analysis in connection with SEM-photographs make the asumption plausible that mono- and polyhydrate exist side by side in crystal aggregates of the analysed types. Position and genesis of the crystals are discussed with regard to the special physiological conditions in the genus Inocybe.

Zu sam men fassung: Cystiden-Kristalle von *Inocybe godeyi* und *nitidiuscula* wurden mit sehr verschiedenen Methoden untersucht. Chromatographische, spektro- und mikrochemische Analysen ergaben übereinstimmend die Formel von Calciumoxalat. Der Wassergehalt, also die Entscheidung ob Monooder Polyhydrat, konnte aufgrund der geringen Kristallgröße nicht durch Röntgenaufnahmen bestimmt werden. Dafür machen kristalloptische Analysen zusammen mit Rasterbildern die Annahme wahrscheinlich, daß in den Kristallaggregaten der untersuchten Arten Mono- und Dihydrat nebeneinander vorkommen. Position und Genese der Kristalle werden im Zusammenhang mit den besonderen physiologischen Bedingungen bei Inocybe diskutiert.

1. Einleitung

Biogene Mineralbildungen haben schon sehr früh Interesse erweckt. MALPIGHI (1675) und auch LEEUWENHOEK (1719) haben erste Hinweise geliefert. Der Ausbau der Mikroskope, speziell mit Polarisation im vorigen Jahrhundert, ermöglichte es Biologen und Mineralogen, den Chemismus und die kristalline Struktur von Biomineralien zu untersuchen. Man entdeckte das Calciumsalz der Oxalsäure, das den Hauptanteil der kristallinen Ablagerungen in Angiospermen ausmacht. Auch Pilze zeigen Kristallbildung. Sie wurden bei Aphyllophorales, Gastromyceten wie *Geastrum*, Discomyceten u. a. beschrieben. Blätterpilze sind selten Träger von kristallinen Ausscheidungen, mit einer Ausnahme allerdings: In der Gattung *Inocybe* ist Kristallbildung die Regel. J. STANGL (1989) hat Vorkommen und Verteilung der Kristalle im Pilzkörper vorbildlich beschrieben und gezeichnet. Chemismus und struktureller Aufbau der Kristalle sind aber noch kaum untersucht worden. Aus dieser Sachlage entstand die Zielsetzung dieser Arbeit: Es sollte versucht werden mit sehr verschiedenen, aber sich ergänzenden Analysenmethoden einen Hinweis auf die Natur der *Inocybe*-Kristalle zu bekommen.



Abb. 1: Eine Lamelle von *Inocybe godeyi* im polarisierten Licht. Jeder Leuchtfleck ist eine Ansammlung von Kristallen am Cystidenende ("Cluster"). (50:1). Anmerkung: Die Vergrößerung wird "in etwa" angegeben, meist als Produkt = V/Objektiv x V/Okular.



Abb. 2: Calciumnachweis mit Schwefelsäure im polarisierten Licht. Neben der Pilzlamelle sind nach Ablösen der Cystidenkristalle Gipsnadeln entstanden. Typisch ist die Form, die geringe Doppelbrechung (graue Farbe) und die Auslöschungsschiefe (37° zur N-S-Richtung im Mikroskop). (500:1).

2. Geräte – Proben – Analysengang

Die Schwierigkeiten bei der Untersuchung der Inocyben-Kristalle erfordern eine Vielzahl von Methoden. Dementsprechend umfangreich war der Gerätepark, an dem die Institute der Universitäten Regensburg, München und Erlangen beteiligt waren. Zum Einsatz kamen in

Spektralanalyse:

4-m-Gitterspektrograph für Feststoffanalyse im Gleichstrombogen

Geräte für Atomabsorption

Ionenaustauschchromatographie:

Gerät Chromatopac mit Leitfähigkeitsdetektion

Kristalloptik:

Zeiß Photomikroskop für Durchlicht und Auflicht.

Verwendet wurden: Hellfeld, einfach polarisiertes (1pol) und kreuzpolarisiertes (2pol) Licht.

Hilfsobjekt Rot I und Kompensator von Ehringhaus Elektronenmikroskopie:

Rasterelektronenmikroskop mit Feldemissionskathode

Elektronenstrahlröntgenmikrosonde für energiedisperse Analyse

Transmissions-Elektronenmikroskop

Röntgenbeugung:

Röntgendiffraktometer und Debye-Scherrer-Apparatur

Das Probematerial

Die Beschaffung ausreichender Pilzmengen war durch die Trockenheit der letzten Jahre zum Engpaß geworden, ein Mangel, der eine Probenvorbereitung, wie z. B. die Gewinnung von Kristallkonzentraten für Röntgenaufnahmen, unmöglich machte. Zur Untersuchung standen nur die etwas spärlichen Proben von Herbarmaterial in Form von Exsikkaten zur Verfügung und zwar die Arten *Inocybe godeyi, nitidiuscula* und *assimilata*. Davon zeigte *I. godeyi* die stärkste Kristallansammlung.

Einen ersten Einblick über das Vorkommen von Kristallen im Pilzkörper findet man in den Zeichnungen von J. STANGL (1989). Zur Beobachtung im polarisierten Licht (2pol) genügt es, eine Lamelle in Glycerin einzuschließen und bei etwa 50facher Vergrößerung zu beobachten (Abb. 1). Die Kristallaggregate ("Cluster") leuchten auffällig im Weiß der I. Ordnung¹ und markieren so das Verteilernetz der Pleurocystiden auf der Lamellenfläche. Sie bilden auch eine Reihe von Leuchtpunkten, die im Abstand der Cheilocystiden den Lamellenrand nachzeichnen. Beim Einschieben eines Quarzplättchens (Rot I) in den Strahlengang des Mikroskops heben sich die Einzelkristalle aus dem Cluster heraus und zwar – je nach Stellung des Drehtisches – blau (Addition) oder gelblich (Subtraktion). Dieser Tatbetand ermöglicht eine erste Aussage: Die Cystiden-Kristalle sind anisotrop, sie können also nicht dem kubischen Kristallsystem angehören. Außerdem wird durch ihr Leuchten eine relativ hohe Doppelbrechung angezeigt. Weitere Erklärungen in Kapitel 4.2.

¹ Fachbegriffe der Kristalloptik können hier nicht näher erläutert werden. Einzelheiten z. B. in Nickel: Grundwissen in Mineralogie.

Wegen der Schwierigkeit einer ausschließlichen kristalloptischen Bestimmung wurde der folgende Analysengang auf Festkörper- und Lösungsanalysen abgestellt, so daß die Ergebnisse insgesamt eine Aussage über die Natur der Cystidenkristalle ermöglichen.

3. Spektochemische und mikrochemische Untersuchungen

Bei der Suche nach der Konstitution der Pilzkristalle waren zwei Aspekte vorab zu entscheiden: Entweder enthalten die Kristalle eine metallische Komponente, ähnlich dem Calcium in Pflanzenkristallen oder sie sind rein organischer Natur, wie sie bei *Heterobasidion annosum* (HOLDENRIEDER, 1982) nachgewiesen wurden. Einen ersten Hinweis lieferte die Spektralanalyse (OES). Dazu wurden der innere Teil vom Stiel sowie Lamellen von *Inocybe godeyi* im Plasma eines Gleichstrombogens abgebrannt, die entstehende UV-Emission registriert und auf ihren Metallgehalt untersucht² (KOSTYRA, 1955).

Ergebnis: Die Calciumintensität im Lamellengewebe liegt deutlich höher als im Stiel. Der Befund spricht für die Annahme, daß Cystidenkristalle Calciumsalze organischer oder anorganischer Säuren sind.³

3.1 Mikrochemie

Zur weiteren Klärung wurde das mikroskopisch beobachtbare Löslichkeitsverhalten der Kristalle untersucht. Man arbeitet dabei unter Deckglas; Lösungsmittel werden mit Filterstreifen durchgesaugt. Polarisiertes Licht zeigt am besten wie und wieweit eine Auflösung der etwa 1 µm großen Kristalle erfolgt.

(+ = 10 slich; sauren etwa 1-2 normal)						
Lösungs- mittel	Wasser	Oxal- säure	Essig- säure	Salz- säure	Schwefel- säure	Salpeter- säure
Löslich- keit	_	_	_	+	+	+
Reaktions- produkte	-	_		- -	Kristalle	-

Tabelle	1:	Löslichkeit	von	Inocybe-Kristallen

Auswertung

Das Verhalten der Pilzkristalle gegen Lösungsagentien ist typisch für die Verbindung Calciumoxalat. Dafür spricht die Beständigkeit in organischen Säuren, auch der Oxalsäure und die durchgehende Auflösung in Mineralsäuren. Beweiskräftig ist auch das Fehlen gasförmiger Reaktionsprodukte, eine Tatsache, die Carbonate ausschließt. Andere pflanzliche Metabolite wie Calciumsulfat, -tartrat und -malat können aufgrund des Löseverhaltens ebenfalls ausgeschieden werden (FREY, 1929). Das Auftreten von Gipskristallen,

² Die Probe wird nach einem in unserem Institut entwickelten Verfahren 1:10 mit Kohlepulver verpreßt. Kontaminierungen durch Probenvorbereitung entfallen auf diese Weise. Der 4n-Gitterspektrograph nach E. Preuß ermöglicht durch seine enorme Dispersion eine sehr sichere und empfindliche Bestimmung von Calcium in langwelligen UV bei geringster Probemenge (= 1-5 mg) Spektralinien: Ca I 4226,73 A und Ca II 3944,0 A. OES = optische Emissionsspektralanalyse.

³ Die Unlöslichkeit der Kristalle in Chloroform ist ein weiteres Indiz für ihren ionaren Aufbau und spricht gegen die Annahme einer rein organischen, d. h. molekularen Konstitution.



Abb. 3: Eine Pilzlamelle in essigsaurer Permanganatlösung. Hellfeld. – Deutliche Farbaufhellung und CO2-Entwicklung um die Kristalle der Cheilocystiden am Lamellenrand. (30:1).



Abb. 4: Nachweis der Karbonatisierung nach dem Erhitzen. Bei Säurezusatz wandern die Gasblasen aus der Lammellenasche (rechts in der Abbildung) unter Vergrößerung nach links. Hellfeld. (40:1).

einzeln oder in Büscheln bei Schwefelsäurezusatz, spricht für Calcium. Wegen der minimalen Menge an Calciumoxalat können die Nadeln erst nach Stunden am Deckglasrand oder nach Tagen im Präparat entstehen (Abb. 2).

Zur Absicherung der Calciumoxalatnatur der Cystidenkristalle eignen sich zwei chemische Umsetzungen, die unter Mikroskopkontrolle sehr spezifisch sind.

- 1. Der Oxalsäurenachweis (JANDER, 1944: 381)
 - Chemischer Vorgang:

Permanganat wird im sauren Milieu durch Oxalsäure zu farblosen Mn^{2+} reduziert, wobei die Säure zu CO_2 oxidiert wird. Der Versuch, unter Deckglas durchgeführt, zeigt folgende beweiskräftigen Situationen (Abb. 3):

- Pilzlamellen in 2n-Essigsäure, keine Kristallösung (s. o.!).
- Zugabe von festem Permanganat am Deckglasrand; die Kristalle am Lamellenrand werden zuerst aufgelöst; Beginn der Umsetzung.
- Entfärbung der Permanganatlösung (gelb bis farblos) an den Cheilocystiden.
- Auftreten von CO₂-Blasen, die sich, vom Deckglas gehalten, um die Spitze der Cheilocystiden entwickeln. Die Reaktion findet also im Kristallcluster und nicht im organischen Material der Lamelle statt.

2. Karbonatisierung von Calciumoxalat

Nur Calciumoxalat wandelt sich beim Erhitzen auf etwa 400°C in Carbonat (s. PHI-LIPSBORN, 1954, HOLZNER, 1864 u. a.). Das Erhitzen kann auf sehr teuren Quarzobjekträgern, z. B. der Firma Zeiß, durchgeführt werden. Billiger ist folgende Versuchsvariante: Man erhitzt über der Spiritusflamme ein Deckglas mit aufgelegten Pilzlamellen und legt es nach Abkühlen umgedreht auf den Objektträger. Nach Zusatz von Essig- oder Salzsäure entstehen nach einiger Zeit kleine, aber deutlich sichtbare Blasen (CO₂), welche die gelungene Carbonatisierung der Cystidenkristalle anzeigen (Abb. 4).

Ergebnis der mikrochemischen Untersuchung

Löslichkeit und chemische Umsetzungen bei Inocybenkristallen weisen eindeutig auf kristallisiertes Calciumoxalat. Metallfreie, rein organische Kristallbildung ist deshalb auszuschließen. Von dieser Sachlage aus erschien der Versuch sinnvoll, die Calcium- und Oxalationen mit modernen Analyseverfahren nachzuweisen und – falls möglich – das Mengenverhältnis resp. das Zahlenverhältnis der Ionen im Molekül zu bestimmen. Bei den minimalen Kristallmengen auf den Pilzlamellen stand die Empfindlichkeit des Analysenverfahrens an erster Stelle.

3.2 Apparative Analytik

3.21 Elektronenmikroskopie

Die Anordnung der Pilzkristalle frei und unverdeckt auf der Spitze der Cystiden erlaubt ein sehr einfaches Verfahren der Probenvorbereitung. Die Lamellen der Exsikkate werden mit Leitsilber auf einem Metallblock befestigt und mit Graphit besprüht, um Aufladungen unter dem abtastenden Elektronenstrahl zu vermeiden. Die Ergebnisse der Aufnahmen mit der Mikrosonde sind in den Abb. 5–13 zusammengefaßt. Sie ergeben zwei wichtige Aufschlüsse:

1. Punktanalysen (Abb. 5–8)

Positionen des Sondenstrahls zwischen den Cystiden zeigen die zu erwartende Verteilung der Aschenelemente im organischen Material, aber ohne Calcium. Über den Kristallen steigt die Calciumintensität sprunghaft an und erreicht ein Maximum.

2. Flächenverteilung

Diese Tatsache kommt sehr eindrucksvoll in der Flächenverteilung der Calciumintensität zum Ausdruck (Abb. 10). Die hellen Calcium-Felder markieren durch ihren Materialkontrast genau die fünf Positionen der im Rasterbild 9 sichtbaren Kristallcluster und damit auch die zugehörigen Cystiden. Mit diesen Positionen decken sich wiederum die Profilflächen der Sauerstoffverteilung (Abb. 11) nach Lage und sogar Form der Calciumflächen, so daß auch durch Sondenaufnahmen Cystidenkristalle als Ca-O-Verbindungen ausgewiesen werden und aufgrund mikrochemischer Voruntersuchungen nur Calciumoxalat sein können.⁴

Sehr aufschlußreich ist die Abwesenheit von Calcium im organischen Substrat, eine Erscheinung, die in Punkt- und Flächenanalysen gleichermaßen zum Ausdruck kommt. Bei einer Eindringtiefe des Sondenstrahls von etwa 1 μ m werden die Zellwände fast vollständig in die Analyse mit einbezogen, und man kann davon ausgehen, daß sich die gesamte Menge an Calcium, entsprechend auch Oxalat, im ausgeschiedenem Kristall wiederfindet, während das Substrat frei von kristallbildenden Ionen angenommen werden darf. Diese Annahme bezieht sich speziell auf die hier verwendeten Exsikkate, weil beim Trockenprozeß auch die plasmainternen Ionen an den Zellmembranen niedergeschlagen werden und – falls vorhanden – in den Analysenbereich der Sonde gelangen müßten. Gerade diese Überlegungen bilden die Voraussetzung für die Auswahl der folgenden Analysenverfahren.

3.2.2 Spektrale und chromatographische Bestimmungen

Calcium: Für quantitative Spurenanalysen wäre Die OES-Analyse im elektrischen Bogen (s. o.!) durchaus geeignet. Soweit aber Lösungen vorliegen, arbeitet ein Verfahren mit Atomabsorption genauer, und die Ergebnisse sind besser zu interpretieren. Verschiedene Verfahren erhöhen auch die Sicherheit der erhaltenen Werte.

Herstellung einer Stammlösung: Das Hutexsikkat von *Inocybe godeyi* wird zwei Stunden in 0,1 n spektralreiner Salzsäure eluiert und das Verschwinden der Kristalle mikroskopisch kontrolliert. Die entstandene Lösung – auf 50 ml aufgefüllt – wird mit einem Absorptionsflammenfotometer in der Azetylen-Sauerstoff-Flamme auf Calcium (Linie 423 nm) vermessen.

Ergebnis: In der Lösung war Calcium eindeutig nachzuweisen. Der Gehalt wurde durch den Vergleich mit einer gepufferten Eichreihe ermittelt. Der abgelesene Wert betrug 5,94 mg/l. Dementsprechend sollte die Stammlösung auch eine äquivalente Menge an Oxalat enthalten.

Der Oxalatnachweis: Nur wenige Verfahren sind empfindlich genug, die zu erwartenden Minimalmengen an Oxalsäure zu erfassen. Dies gelang mit Hilfe der Ionenaustauschchromatographie. Wie Abbildung 14 zeigt, liegt im Chromatogramm der Oxalatpeak bei etwa 13 min. Retentionszeit. Aus dem geeichten Flächenareal ergab sich ein abgelesener Gehalt von 17,6 mg/l Oxalat.⁵

⁴ Der Firma Siemens, München, Abteilung Analytik, sei an dieser Stelle gedankt für die Möglichkeit, Analysen mit der Mikrosonde und der SEM-Anlage durchführen zu können. Besonderer Dank gilt Herrn Dr. A. Meyer für die Genehmigung der Untersuchungen und Herrn Dr. R. Weyl, der sie mit großer Sorgfalt durchführte.

⁵ Systematisch genauere Durchschnittswete hätten zeitraubende Untersuchungen erfordert. Dazu stand das Gerät nicht zur Verfügung. Der quantitative Nachweis der minimalen Oxalatmengen wurde von Herrn Berghausen am Institut für Physikalische und Makromolekulare Chemie der Universität Regensburg durchgeführt. Für die Präzision seiner Analyse möchte ich mich sehr bedanken.



Abb. 5–8: Calciumnachweis mit der Mikrosonde. Lamellen von *Inocybe godeyi*. – Die Diagramme zeigen die Intensitäten der Elemente gemessen auf den Kristallkronen zweier Cystiden (Abb. 5 und 6), am Fuß einer Cystide (Abb. 7) und im Hohlraum ("Napf") einer Spore (Abb. 8.). – Sonde mit energiedisperser Analyse. (Auflösung d = $0,2 \mu m$, Eindringtiefe etwa 1 μm . KA=K α -, KB=K β -Strahlung).

9

Abb. 9: Rasterbild des Analysenareals. Die Positionspunkte des Sondenstrahls sind mit den entsprechenden Abb.-Nummern eingetragen.



Abb. 10-13: Flächenverteilung der Elemente auf einer Pilzlamelle. 10 – Calcium; 11 – Sauerstoff; 12 – Kohlenstoff; 13 – Kalium

Formel: Im Calciumoxalat-Kristall stehen die Molzahlen der Ionen im Verhältnis 1:1. Dieses Verhältnis müßte sich auch aus den oben gefundenen Meßwerten ergeben, falls die Lösung der Kristalle verlustfrei erfogte und die Mengen der Lösungsionen nicht durch Residuen aus dem organischen Teil des Pilzes verfälscht wurden (vgl. Kap. 3.2.1).



Abb. 14: Ionen-Austauschchromatogramme. a – Eichung der Oxalatposition; b-c – Analysenlösungen unter verschiedenen Bedingungen aufgenommen. – Die Matrixionen sind in der Spalte "TIME" mit ihren Retentionszeiten positioniert.

	Ca ²⁺	$C_2O_4^{2-}$
Meßwert in mg/l	5,49	17,6
Molmasse	40	88
Molzahlen	0,149	0,2

Die gefundenen Molzahlen stehen im Verhältnis

 $[Ca^{2+}] : [C_2O_4^{2-}] = 1 : 1,36$

Dieser Quotient stimmt unter den gegebenen Verhältnissen recht gut mit dem errechneten Wert überein. Somit ist die Formel der Inocybenkristalle mit CaC_2O_4 bestimmt. Der Kristallwassergehalt von 1 oder 2 Mol H₂O kann weder chemisch noch thermoanalytisch erfaßt werden. Im folgenden sollen dazu kristallographische und strukturelle Untersuchungen dienen.

4. Kristalluntersuchung bei Inocybe

Pilzkristalle sind in der Literatur schon oft beschrieben worden (s. AGERER, GRAU-STEIN, HORNER, KELLER, KRISAI, LAPEYRIE u. v. a.). Wie zahlreiche Rasterbilder belegen, dominieren in den publizierten Pilzgruppen die Kristalle des tetragonalen Systems so eindeutig, daß die beigefügten Röntgendaten fast einer Überbestimmung gleichkommen. Bei *Inocybe* Kristallen kann von solcher Eindeutigkeit keine Rede sein. Weder sind die Formen einfach noch liefern Strukturuntersuchungen Anhaltspunkte zum Kristallsystem. Dafür sind folgende Besonderheiten verantwortlich:

- 1. Größe der Einzelkristalle (1-2 μm),
- 2. Sehr geringer Mengenanteil am organischen Pilzgewebe,
- 3. Mangel an Probematerial für Anreicherungsversuche.

4.1 Versuche zur Strukturbestimmung

Die oben angeführten Besonderheiten zeigen die Schwierigkeit, eine für Röntgenaufnahmen erforderliche Kristallmenge von etwa 1 mg zu gewinnen. Die Aufnahmen konnten deshalb nur in situ, d. h. an den Pilzlamellen selbst, vorgenommen werden. Aber weder Röntgendiffraktometrie noch Debye-Scherrer-Aufnahmen erbrachten Signale oder Beugungsbilder. Mehrfache Versuche mit einem Transmissionselektronenmikroskop der Universität Regensburg scheiterten u. a. daran, daß bei nicht präparierten Pilzlamellen der Sondenstrahl durch Aufladung abgelenkt wurde oder daß die sachgemäße Präparation der Probe einen nicht mehr zumutbaren Arbeitsaufwand für den zuständigen Spezialisten bedeutet hätte. Andere Verfahren, die mit fokussierenden Röntgenstrahlen Aufnahmequerschnitte bis auf 10 µm verengen, sind noch in der Entwicklung. Für die weiteren Untersuchungen wurden Strukturbestimmungen vorläufig zurückgestellt und dafür kristalloptische und rasterelektronische Bilder verwendet.

4.2 Untersuchungen im polarisierten Licht

FREY (1929) und PHILIPSBORN (1954) plädieren in ihren Arbeiten für die kristalloptische Methode zur sicheren und schnellen Bestimmung biologisch gebildeter Kristalle. Auch im 1-µm-Bereich der *Inocybe*-Kristalle bringt ein entsprechend angepaßtes Verfahren brauchbare Daten. Die Substanz Calciumoxalat kommt in zwei Modifikationen vor, die sich durch ihren Wassergehalt unterscheiden und zwar als Monohydrat, Whewellit und als Dihydrat, Weddellit, bei FREY-WYSSLING und HONEGGER als Polyhydrat bezeichnet. Die kristalloptischen Daten zeigt folgende Tabelle:

1 Name	2 Kristall- wasser	3 Kristall- system	4 Kristall- klasse ⁶	5 Brechungs- kompo- nenten	6 Doppel- brechung (nγ - nα)	7 opt. Char. ⁷
Whewellit	Monohydr	at monoklin	C _{2h} (2/m)	$n\alpha = X = 1,490$ $n\beta = Y = 1,555$ $n\gamma = Z = 1,650$	0,159	+
Weddellit	Dihydrat	tetra- gonal	C _{4h} (4/m)	$n\alpha = X = 1,526$ $n\gamma = Z = 1,547$	0,021	+

Tabelle 2

Im Rahmen dieser Angaben soll versucht werden, eine Zuordnung für die eine oder andere Kristallklasse zu treffen, wobei zunächst die Suche nach Tetragonalität im Vordergrund steht.

Kristallformen im Mikroskop

Wie die Bilder zeigen, sind mikroskopisch Formen oder gar Flächen nicht auszumachen, auch bei tausendfacher Vergrößerung nicht. Die einzig brauchbaren Bezugsformen sind gestreckte, d. h. zonar gebaute Kristallite, die oft eine Art Gerüst im Haufen der Cystidenkristalle bilden (Abb. 15–18). Diese Zonenkristallite sollen im folgenden auf ihre Tetragonalität geprüft werden, wobei die untersuchten Effekte im µm-Bereich nur durch ein intensives Sehtraining auszumachen sind.

Kristalloptik von I. godeyi-Kristallen

Aus einer Reihe von Beobachtungen, die einzeln nicht aufgeführt werden können, ergibt sich folgendes Bild:

Der Zonencharakter (= optischer Charakter) der Kristalle (Spalte 7, Tab. 2) ist positiv. Die Helligkeit der Kristalle im kreuzpolarisierten Licht (2pol) entspricht dem Weiß der I. Ordnung (s. MICHEL-LEVY-Tafeln), so daß in der Regel die hellen Zonenkrisallite die graudunklen Restkristalle des Clusters überstrahlen. Nach Messung mit einem Komparator findet man den Wert der **Doppelbrechung** > 0,1, bei einer angenommenen Dicke von etwa 1 µm (vgl. Spalte 6, Tabelle 2).

Der Wert der Lichtbrechung ist, wie die Tabelle zeigt, von der Richtung (XYZ) abhängig. Die einzelnen Brechungsvektoren können durch Eintauchen der fraglichen Kristalle in entsprechende Brechungsflüssigkeiten bei einfach polarisiertem Licht bestimmt werden. Es ist aber fast aussichtslos in einem Gewirr von Kristalliten und zwischen fünf in Frage

 C_{4h}^{-1} = (4/m) = tetragonal-bipyramidale Klasse.

⁶ Symbolik nach SCHOENFLIES, in Klammern nach HERMANN-MAUGIN. C_{2h}= (2/m) = monoklin-prismatische Klasse.

⁷ Die Zonierung bei Calciumoxalat-Kristallen erfolgt nach der c-Achse. Daher tragen Zonen- und optische Charakter des Kristalls das gleiche Vorzeichen.



Abb. 15–18: Mikroskopische Aspekte von *Inocybe godeyi* Lamellen im polarisierten Licht und bei steigender Vergrößerung. 15 – 300:1, Cheilocystiden (2pol+Rotl); 16 – 400:1, Pleuro- und Cheilocystiden (1,5pol); 17 – 870:1; eine Gruppe von Cystiden (2pol+Rotl). Deutlicher Zonencharakter der Kristalle; blau und gelbe Färbung im Farboriginal zeigt den optischen Charakter der Kristalle (+). 18 – 1200:1, Ölimmersion, 1,5pol. Ausgeprägte Zonenkristalle als Gruppe rechts unten. Die Grenze der Auflösung ist erreicht; trotz starker Vergrößerung sind Einzelheiten nicht mehr erkennbar.

kommenden n-Werten eine Entscheidung für oder gegen Weddellit zu suchen. Selbst der Gebrauch der in der Literatur gern zitierten "Becke-Linie" (HORNER, 1983 u. a.) hilft hier nicht weiter. Benützt man aber eine Immersionsflüssigkeit mit dem höchstvorkommenden Brechungsindex der in Spalte 5 aufgeführten fünf Brechungswerte, also n = Z = 1.650(Phenylsenföl z. B.), so wird ein monokliner Zonenkristall unsichtbar werden, wenn er parallel zum Lichtvektor des Polarisators zu liegen kommt und scharf kontrastiert erscheinen in senkrechter Lage dazu. Ein tetragonaler dagegen bleibt in jeder Richtung kontrastreich. Dieser Effekt, in den Abb. 19a und b, an großen Raphiden und Prismen von Aloe sowie Allium demonstriert, zeigt sich auch in den zonierten Cystidenkristallen von I. godeyi und zwar wechselt der Kontrast während der Tischdrehung ebenso wie bei den großen, monoklinen Raphidenkristallen (Abb. 20). Dieses Raphidenverhalten ist ein starkes Indiz für die monokline Natur zonierter Kristalle im Cluster⁸. Für monoklin spricht auch die relativ große Doppelbrechung und die für die Dicke hohe Interferenzfarbe Weiß I. Ordnung⁹. Die Zonenbildung der Kristalle läßt sich gut mit dem monoklinen Habitus vereinbaren. Gestreckter Whewellit ist bei Pflanzen in Form von Raphiden und Styloiden allgemein verbreitet und wurde von FREY (1929) als Streckung der e/b-Flächen (101) und (010) sehr genau beschrieben.

Ergebnis der mikroskopischen Untersuchung

Ein Teil der Cystidenkristalle eines Kristallclusters ist nach Optik und Form monoklines Monohydrat, also Whewellit.

Der Rest der Clusterkristalle tritt neben den Zonenkristallen im Erscheinungsbild zurück, er könnte tetragonal sein. Es sind mehr rundliche, isodiametrale Gebilde, die mit ihrer geringen Doppelbrechung (< 0,1) und der grauen Interferenzfarbe wenig auffallen. Aufgrund ihrer unbestimmten Form können sie kristalloptisch kaum erfaßt werden. Ihre Untersuchung, sowie die Absicherung der mikroskopischen Ergebnisse soll im folgenden mit Rasterbildern durchgeführt werden.

4.3 Rasterbilder

Rasterbilder gelten als besonders wirklichkeitsnahe Zeugnisse der Mikrowelt. Leider kann im Fall von *Inocybe* aus Rasterbildern allein keine eindeutige Aussage über ein bestimmtes Kristallsystem abgeleitet werden. Doch ergänzen die REM-Bilder die aus kristalloptischen Untersuchungen gewonnenen Annahmen. In Tafel I ist für *I. godeyi* und *nitidiuscula* versucht worden, aus REM-Bildern morphologische Habitustypen abzuleiten und deren Form in die entsprechenden Kristallsysteme einzuordnen.

Zu den Formtypen in Tafel II

Einzelkristalle: Aufallend ist Typ I/1 mit deutlich monokliner Flächenbegrenzung. Auch unter dem Mikroskop zeigt er gestreckte Form und eine hohe Doppelbrechung. Die Flächenform, ein Parallelogramm, entspricht der (010)-Fläche in der monoklin-prismatischen Klasse C_{2h} .

Eindeutig tetragonal ist im Rasterbild der Typ II/4 als Bipyramide zu erkennen. Diese Form belegt das Vorkommen von tetragonalem Dihydrat und zwar in der bipyramidalen

⁸ Voraussetzung ist allerdings eine sehr geübte Beobachtungstechnik im μm-Bereich, denn photographisch lassen sich – wie die Bilder belegen – so kleine Effekte kaum dokumentieren.

⁹ Die Auslöschungsschiefe für Whewellit (≈ 7° Schiefe auf der (010)-Fläche) läßt sich in der µm-Dimension kaum bestimmen.



Abb. 19: Demonstration des vektoriellen Kontrastverhaltens bei repräsentativen Kristallen von Calciumoxalat. Einfach polarisiertes Licht (1pol) in E-W-Richtung schwingend. Immersionsflüssigkeit n = 1652, a - Raphiden von Aloe, monoklin, 90° gegeneinander versetzt. Die E-W-Raphide verschwindet in der Immersionsflüssigkeit; (400:1). b – Tetragonaler Kristall von Alium cepa bei 0° und 90° Drehtischstellung. Der Kontrast bleibt gleich. (1000:1).

Abb. 20: Das Verhalten zonarer Cystidenkristalle von *I. godeyi* unter gleichen Bedingungen: Der markierte Kristall (\rightarrow) verschwindet in E-W-Richtung wie die monokline Aloe-Nadel. Das Verschwinden ist bei mikroskopischer Beobachtung deutlich, aber im Dokument schwer feststellbar. (400:1).

Tafel I

Typus und Kristallsystem bei Inocybe godeyi und nitidiuscula

Habitus- gruppe	Nr	graphischer Typus	Einkristall (1) Zwilling (2)	Raster- Mar bild- kie Beispiele	- Zuordnung rung zum (>) Kristall- system
I zonar gestreckt	1	\square	1	21a-f (•)> monoklin
	2	$\langle \rangle$	2	21b,f (•	●)> monoklin
II isodia- metrisch	1	\sum	1	21f ([]) —> tetra- gonal
	2		1	21f,22b,c ([])> tetra- gonal
	3	3	2	22a (🗆	□)> tetra- gonal
	4		1	21f ([) = tetra- gonal

Klasse C_{4h} . Andere Einzelkristalle wie II/2 sind formativ unbestimmter, zeigen aber eine höhere Flächensymmetrie als monoklin. Sie werden in der Tafel dem tetragonalem System zugewiesen. Unter dem Mikroskop sind sie schwer erfaßbar. Immerhin wurden Doppelbrechungen von >0,1 (Dihydrat = 0,021) bestimmt.



Abb. 21 a-f: Rasteraufnahmen von *Inocybe godeyi*, Pleurocystiden. Maßstrecke = 10 µm. Einzelheiten s. Text. Aufnahmen: Siemens Forschungslaboratorien, München, Abtlg. SEM: Dr. R. Weyl.

Zwillinge sind Kristalle, die symmetrisch oder parallel verwachsen auftreten. Das Vorkommen solcher Doppelformen ist charakteristisch für den Habitus der *Inocyben*-Kristalle.

Formal wird die Zwillingsbildung in I/2 verständlich durch das Zusammentreten zweier monokliner Individuen, wobei die gebildeten Schwalbenschwanzwillinge an den konvexen Enden zu Vierlingen verwachsen (vgl. PHILIPSBORN, 1954, Tafel III). Diese für das monokline System charakteristischen Formen des "doppelten Stiefelziehers" finden sich in fast allen Rasteraufnahmen von *Inocybe*-Hymenien. Sie sind aber auch mit einiger Erfahrung im mikroskopischen Bild zu erkennen; sie können fast als Beweis für den



Abb. 22 a-c: Cystiden-Kristalle von Inocybe nitidiuscula. Aufnahmen: Staatliches Forschungsinstitut für Angew. Min., Regensburg, Abtlg. SEM, Dr. Rose.



Abb. 23 a, b: Trockenmembranen verbergen das Kristallaggregat von Inocybe godeyi.

Abb. 24: Inocybe nitidiuscula, Durchdringungszwillinge.

Abb. 25: Basale Kristallausscheidung bei Inocybe godeyi.

Whewellit-Anteil im Kristallcluster gelten. Weitere Belege für das Vorkommen dieser Form in Pflanzen und als Kristallisat aus Lösungen findet man bei FREY-WYSSLING und HAUSHOFER. Der Zwillingswinkel im Ausschnitt beträgt 141°. Er kann aber wegen der Lagenverzerrung bei Rasteraufnahmen nicht zur Identifizierung verwendet werden. Zwillinge vom Typ II/3 weisen auf eine höhere Symmetrie, also auf Tetragonalität. Im Lehrbuch von GROTH (1950) ist für die teragonal-bipyramidale Klasse am Beispiel von Scheelit eine diesbezügliche Zwillingsform beschrieben. Es soll hier nicht verschwiegen werden, daß die Flächensymmetrie einzelner Zwillingsindividuen auch monoklin gedeutet werden kann. Zur Entscheidung müßten die Winkel auf den Kristallflächen gemessen werden. Diese sind aber wegen der Rasterperspektive nicht zu verwenden. Für tetragonal spricht letzlich nur das Vorkommen ähnlicher Zwillingsformen, wie sie z. B. HORNER (1983) bei Discomyceten gefunden und röntgenographisch als tetragonal nachgewiesen hat.

Ergebnis der Bildanalyse: In den Kristallaggregaten von *Inocybe godeyi* und *I. nitidiuscula* treten monokline und tetragonale Formen gemischt auf. Ob diese erste Feststellung für die Kristalle aller *Inocybe*-Arten gilt, muß weiteren, umfangreichen Untersuchungen vorbehalten bleiben. Es fehlen noch röntgenographische und elektonenmikroskopische Methoden, die in situ auf eine Fläche von etwa 1 µm ohne großen Präparationsaufwand anwendbar sind. Daß aber selbst dann SEM-Formbild und Beugungsaufnahmen nicht zu gleichen Aussagen führen müssen, ist bei GRAUSTEIN nachzulesen (zitiert nach HOR-NER). GRAUSTEIN fand nämlich bei *Dasyscypha* Whewellit neben Weddellit; die Röntgendiffraktionsanalyse zeigte aber nur tetragonale Formen an, also keine Mischung der beiden Modifikationen.

5. Diskussion

Jede Untersuchung löst und schafft neue Probleme. So mag die Verwendung von Exsikkaten problematisch erscheinen, weil das bei Pilzen seltene Phänomen einer Paragenese¹⁰ von Whewellit und Weddellit nebeneinander im gleichen pflanzlichn Organismus auch als Folge von Artefakten gedeutet werden kann. Dies wäre denkbar, denn Weddellit ist eine metastabile Verbindung und könnte während der institutsüblichen Wärmetrocknung (50°) in den stabilen Whewellit übergehen¹¹. Eigene Versuche mit Weddellitkristallen aus Harnsediment zeigen aber, daß selbst bei tagelanger Wärmetrocknung keine Umwandlung stattfindet. Da die Umwandlungstemperatur bei etwa 100° liegt, war dieses Ergebnis zu erwarten.

Ein anderes Problemfeld betrifft die Entstehung der Kristalle, die Kristallgenese bei *Ino-cybe*. Es stellt sich die Frage, wie es möglich ist, daß die Kristallaggregate nicht drusig, sondern aus idiomorphen Einzelindividuen aufgebaut sind und daß sie immer auf der Spitze von Cystiden ausgeschieden werden, sehr im Gegensatz zu den kristallischen Incrusten, die bei vielen Pilzen die Hyphen umhüllen. Man vergleiche dazu nur die Rasterbilder bei KELLER, LAPEYRIE und KRISAI. Eine Erklärung der Besonderheit kann physiologisch versucht werden, es sind aber auch morphologische Gegebenheiten, welche die Cystiden zur apikalen Exkretion von Calcium- und Oxalationen prädestinieren. Vermutlich spielen dabei die verdickten Seitenwände eine gewisse Rolle, indem sie den Ionenstrom zum Apex leiten. Eine Membranverdünnung, etwa wie sie LENTZ (1954: 182) beschrieben hat, erlaubt den Durchtritt der Ionen zusammen mit mucinartigen Absonderungen, wie

¹⁰ Paragenese: Fachausdruck für das gemeinsame Vorkommen verschiedener Mineralien.

¹¹ Frischmaterial war im gegebenen Zeitraum nicht zu beschaffen

es die Abb. 23a, b wahrscheinlich machen. Im Feuchtraum dieser Hülle sind vermutlich die Bedingungen für langsame und deshalb idiomorphe Kristallausscheidung gegeben, so wie in den flüssigkeitserfüllten Hohlräumen alpiner Gesteinsklüfte die vollkommene Form sich bildet. Selten werden Kristallausscheidungen an der Basis der Cystiden beobachtet (Abb. 25), aber sie belegen, daß unverdickte Membranen eine der Voraussetzungen für Kristallabscheidungen sind.

Die Reifungsvorgänge im Hut von *Inocybe* führen vermutlich zur Austrocknung der Schleimkappen und zum Abriß, so daß schließlich die Kristalle freigelegt werden. Dieses Abreißen macht es verständlich, daß nur relativ selten solche Kristallhüllen zu beobachten sind¹². Belege für die Abreißvorgänge haben wir bei *Inocybe geophylla* entdeckt¹³. Rasteraufnahmen zeigten eine Fülle von Hüllmembranen in den verschiedenen Stadien der Reifung von der Erstausscheidung über trockenhäutige Waben bis hin zu Ablösungsformen, die zunehmend die Clusterkristalle freilegen. Es ist klar, daß diese auf morphologischer Basis gewonnenen Vorstellungen durch physiologische Untersuchungen abgesichert werden sollten. Von hohem Interesse wären in diesem Zusammenhang die Transportwege der kristallbildenden Ionen innerhalb der Cystide zu untersuchen.

Zum Schluß darf darauf hingewiesen werden, daß auch die morphologische Betrachtungsweise von Kristallen zu einem besseren Verständnis physiologischer Vorgänge beitragen oder doch zu einer vertieften Fragestellung führen kann. Schließlich sind es Oxalatkristalle, die immer wieder Fragen nach Herkunft und Entstehung von ungebundenem Oxalat im Zellstoffwechsel aufwerfen. Wege und Nebenwege im Zitronensäurezyklus können wie bei höheren Pflanzen (s. Glyoxylsäure-Zyklus) auch bei Rißpilzen zum gleichen Produkt führen. Wenn es zutrifft, daß in den Kristallaggregaten von Inocybe das Mono- und Dihydrat des Calciumoxalats nebeneinander vorkommt, dann müßte diese nachweislich seltene Paragenese eine besondere zellphysiologische Grundlage haben; es wäre reizvoll danach zu suchen ebenso wie nach den Ursachen der Habitus- und Trachtverschiedenheit im Kristallcluster. Auch könnte das seltene Vorkommen der teragonalen Bipvramidenform bei Inocybe-Kristallen, das im Gegensatz zur Häufigkeit bei anderen Pilzgruppen steht, taxonomische Anhaltspunkte liefern. So ergeben sich viele Fragestellungen bei der Untersuchung biogener Kristalle. Aber sie erklären nicht die schon dreihundert Jahre andauernde Beschäftigung mit diesem abseitigen Gebiet der Biologie. Es wird wohl das Vergnügen gewesen sein, das auch heute noch jeder verspürt, der einen Blick auf die funkelnden Steine der Biosphäre wirft.

Danksagung

Die Aufgabenstellung zur vorliegenden Arbeit erhielt ich von Herrn Professor Dr. A. BRESINSKY, Direktor des Botanischen Instituts der Universität Regensburg. Für vielfältige Anregungen und Hinweise sowie Freistellung von Mitarbeitern und Hilfsmitteln des Instituts schulde ich ihm aufrichtigen Dank. Gleichzeitig möchte ich Herrn Professor Dr. A. FORSTER, Direktor des Instituts für Angewandte Mineralogie, Regensburg meinen besonderen Dank aussprechen für die großzügige Unterstützung, die der kristallographische Teil meiner Arbeit erfahren hat. Bedanken möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts, die meine Arbeit gefördert haben, insbesondere bei den Herren Dr. ROSE, Dr. ENDLICHER und Herrn HEIMERL. Danken möchte ich auch dem Melanchthon-Gymnasium Nürnberg für Bereitstellung von Gerätschaften sowie Frau H. PUCHTA, NHG Nürnberg, für zahlreiche Pilzproben und last not least meiner Frau für die Mühen am Computer.

¹² Die Hüllen werden erst in den Rasterbildern durch den Goldsputter deutlich. Bei mikroskopischer Beobachtung sind die transparenten Hüllen kaum erkennbar.

¹³ Für die sehr klaren Rasterbilder möchte ich mich bei Herrn Arnold bedanken.

Literatur

AGERER, R. (1978) - Cyphelloide Pilze aus Teneriffa. Nova Hedwigia 30: 295-342.

FREY, A. (1929) - Calcium-Monohydrat und Trihydrat. In: Handbuch der Pflanzenanatomie III/1a.

FREY-WYSSLING, A. (1981) – Crystallography of the two hydrates of crystalline calcium oxalate in plants. Amer. J. Bot. 68: 130–141.

GRAUSTEIN, W. C., K. CROMACK, JR. & P. SOLLINS. (1977) – Calcium oxalate: occurrence in soils and effect on nutrient and geochemical cycles. Science 198: 1252–1254.

GROTH, P. (1950) - Physikalische Kristallographie. Leipzig.

HAUSHOFER, K. (1858) - Mikroskopische Reaktionen. Braunschweig.

HOLDENRIEDER, O. (1982) – Kristallbildung bei Heterobasidion annosum. (Fr.) Bref. (Formes annosum P. Karst) und anderen holzbewohnenden Pilzen. Eur. J. For. Path. 12: 41–58.

HOLZNER, G. (1864) - Über die Kristalle in Pflanzenzellen. Flora Jena 47: 273-304.

HONEGGER, R. (1929) - Das Polyhydrat des Kalziumoxalates. Diss. Zürich.

HORNER, H. T., L. H. TIFFANY & A. M. Cady (1983) - Formation of calcium oxalate crystalls associated with apothecia of the discomycet Dasyscypha capitata. Mycologia 75 (3): 423-435.

JANDER, G. (1944) - Lehrbuch für das anorganisch-chemische Praktikum. Greifswald.

KELLER, J. (1985) - Les cystides crystallifères des Aphyllophorales. Mycol. Helv. 1/5: 277-340.

- KOSTYRA, H. (1955) Methodische Untersuchungen zur quantitativen spektrochemischen Analyse von Zinkblende im Kohlelichtbogen. Diss. Techn. Hochschule München.
- KRISAI, J. & E. MRAZEK (1986) Calcium-Oxalate crystals in Geastrum. Pl. Syst. Evol. 154: 325-341.
- LAPEYRIE, F., R. PEPIN & G. BRUCHET. (1983) Formation de Weddellite (CaC₂O₄.2H₂O) extracellulaire en culture in vitro par Paxillus involutus; signification de cette production pour la symbiose ectomycorhizienne. Can J. Bot, 62: 1116–1121.

LEEUWENHOEK, A. VAN (1719) - Epistolae physiologiae. Delphii 1719. Epist. 44: 417.

LENTZ, P. (1954) - Modified Hyphae of Hymenomycetes. Bot. Rev. 20: 135-199.

MALPIGHI, M. (1675) - Plantarum anatome. London.

MICHEL-LEVY. (1982) - Farbtafeln. Carl Zeiss, Oberkochen.

NICKEL, E. (1973) - Grundwissen in Mineralogie. Teil 2. Otto Verlag Thun und München

PHILIPSBORN, H. V. (1954) - Calciumoxalat - 275 Jahre mikroskopischer Forschung. Sudhofs Archiv 38.4: 336-366.

STANGL, J. (1989) - Die Gattung Inocybe in Bayern. Hoppea Denkschrift. Reg. Bot. Ges. 46.



DGfM Deutsche Gesellschaft für Mykologie e.V. German Mycological Society

Dieses Werk stammt aus einer Publikation der DGfM.

www.dqfm-ev.de

Über Zobodat werden Artikel aus den Heften der pilzkundlichen Fachgesellschaft kostenfrei als PDF-Dateien zugänglich gemacht:

- Zeitschrift für Mykologie Mykologische Fachartikel (2× jährlich)
- Zeitschrift für Pilzkunde (Name der Heftreihe bis 1977)
- **DGfM-Mitteilungen** Neues aus dem Vereinsleben (2× jährlich)
- Beihefte der Zeitschrift für Mykologie Artikel zu Themenschwerpunkten (unregelmäßig)

Dieses Werk steht unter der Creative Commons Namensnennung -Keine Bearbeitungen 4.0 International Lizenz (CC BY-ND 4.0).



- Teilen: Sie dürfen das Werk bzw. den Inhalt vervielfältigen, verbreiten und öffentlich zugänglich machen, sogar kommerziell.
- Namensnennung: Sie müssen die Namen der Autor/innen bzw. Rechteinhaber/innen in der von ihnen festgelegten Weise nennen.
- Keine Bearbeitungen: Das Werk bzw. dieser Inhalt darf nicht ٠ bearbeitet, abgewandelt oder in anderer Weise verändert werden.

Es gelten die vollständigen Lizenzbedingungen, wovon eine offizielle deutsche Übersetzung existiert. Freigebiger lizenzierte Teile eines Werks (z.B. CC BY-SA) bleiben hiervon unberührt.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: Zeitschrift für Mykologie - Journal of the German Mycological Society

Jahr/Year: 1993

Band/Volume: <u>59_1993</u>

Autor(en)/Author(s): Kostyra Heinrich

Artikel/Article: <u>Chemische und kristallographische Untersuchungen an</u> <u>Cystidenkristallen der Gattung Inocybe 77-98</u>