

Benutzte Literatur:

- Amann, G.: Bäume und Sträucher des Waldes. – Melsungen 1956.
 Bäßler, K.: Untersuchungen über die Pilzflora der Pfälzer Kastanienwälder. – Mitt. d. Pollichia 12; Kaiserslautern 1944.
 Benedix, E. H.: Pilztabelle für jedermann (Nr. 1, 10, 14). – Berlin-Kleinmachnow 1948/50.
 Benedix, E. H.: Neue Jenaer Pilzfunde (Pilzgänge um Jena, II). – Mitt. Thür. Bot. Ges. 1/1; Weimar 1949.
 Friedrich, K.: Untersuchungen zur Ökologie der höheren Pilze. – Pflanzenforschung, Heft 22; Jena 1940.
 Haas, H.: Die bodenbewohnenden Großpilze in den Waldformationen einiger Gebiete von Württemberg. – Beih. Bot. Centralbl. 50, 2. Abt./I; Dresden 1932.
 Haas, H.: Die Pilzflora der Tannenmischwälder an der Muschelkalk-Buntsandsteingrenze des Ostschwarzwaldes. – Z. f. P. 24; Bad Heilbrunn 1958.
 Haas-Gossner: Pilze Mitteleuropas (2 Bde.). – Stuttgart 1953.
 Jahn, H.: Pilze rundum. – Hamburg 1949.
 Knapp, R.: Die Pflanzengesellschaften Mitteleuropas (Einführung in die Pflanzensoziologie, Bd. II). – Ludwigsburg 1948.
 Knauth, B.: Die höheren Pilze Sachsens. – Abh. Nat. Ges. Isis 1932; Dresden 1933.
 Kreisel, H.: Die Pilzflora des Darß und ihre Stellung in der Gesamtvegetation. – Feddes Repertorium, Beih. 137; Berlin 1957.
 Kühner-Romagnesi: Flore analytique des Champignons supérieurs. – Paris 1953.
 Michael-Hennig: Handbuch für Pilzfreunde, Bd. I. – Jena 1958.
 Michael-Schulz: Führer für Pilzfreunde. – Leipzig 1927.
 Moser, M.: Die Röhrlinge, Blätter- und Bauchpilze (H. Gams: Kleine Kryptogamenflora, Bd. IIb). – Stuttgart 1955.
 Moser, M.: Pilz und Baum. – Schweiz. Ztschr. f. Pilzkde. 37 (Sond.-Nr. 36); Bern 1959.
 Neuhoﬀ, W.: Die Milchlinge (Die Pilze Mitteleuropas, Bd. IIb). – Bad Heilbrunn 1956.
 Pilát, A.: Polyporaceae (Atlas des Champignons de l'Europe, III). – Prag 1936.
 Pilát, A.: Übersicht der europäischen Clavariaceen unter besonderer Berücksichtigung der tschechoslowakischen Arten. – Act. Mus. Nat. Prag. XIV B, Nr. 3-4; Prag 1958.
 Pilát, A.: Gasteromycetes – Houby Břichatky (Flora Č.S.R. – B I). – Prag 1958.
 Ricken, A.: Vademecum für Pilzfreunde. – Leipzig 1920.
 Rothmaler, W.: Exkursionsflora. – Berlin 1953.
 Schäffer, J.: Russula-Monographie (Die Pilze Mitteleuropas, Bd. III). – Bad Heilbrunn 1952.
 Schwöbel, H.: Zur Klärung einiger Pilze aus der Münchner Umgebung. – Z. f. P. 24; Bad Heilbrunn 1958.
 Singer, R.: Monographie der Gattung Russula. – Beih. Bot. Centralbl. 49, 2. Abt./I; Dresden 1932.
 Singer, R.: The Agaricales (mushrooms) in modern Taxonomy. – Lilloa XXII; Tucumán 1949 (ersch. 1951).

Neue Färbungen und Farbreaktionen an frischen Blätterpilzen und Röhrlingen

(III. Teil)

Von Rudolf Sandor

Abkürzungen siehe I. Teil, Zeitschrift für Pilzkunde 22, Seite 97!

Zellkernfärbungen

Die meisten dieser Färbemethoden sind für die allgemeine Biologie unentbehrlich, doch für die Systematik zu kompliziert. Hier werden rasche und möglichst wenig komplexe Methoden benötigt. Die bisher bei den *Agaricales* angewendeten Färbeweisen

sind fast durchweg sehr langwierig und weniger für den fortlaufenden Gebrauch zu rein systematischen Zwecken berechnet. Die besten gebräuchlichen Färbungen findet man bei R. Kühner: »Le Genre *Mycena*«, Seite 29–34, und Fl.An., Seite 490, Kap. C, Abschn. 2^o, sowie Seite 489, Kap. B!

Fast immer müssen die Objekte vorher fixiert werden, da sonst die Kerne nicht elektiv genug zum Vorschein kommen und zu viele andere Elemente stark mitgefärbt werden. Der Kern – und zwar zuerst sein Chromatin – nimmt meistens erst dann, wenn er von dem allmählich durch die Membran – oder auch durch das Hilum in das Sporeninnere – diffundierenden Fixiermittel (Flüssigkeiten, Gasen oder Dämpfen) durchdrungen ist, den Kernfarbstoff sehr stark auf und erscheint dann in der Regel stärker gefärbt als die übrigen Elemente. Färbungen von lebenden Kernen, sog. Vitalfärbungen, sind viel seltener; elektive Vitalfärbungen von Kernen gehören zu den großen Seltenheiten.

Über Fixierungen, Behandlung nach den Fixierungen und nach den Färbungen siehe Fl.An., Seite 491, und R. Kühner: »Le Genre *Mycena*«, Seite 20–29!

Als neu kämen hier vor allem die Toluidinblau- und die Kresylechtviolett-Methoden hinzu, die vielleicht auch für den fortlaufenden Gebrauch in der Systematik wertvoll werden können, da sie wegen ihrer intensiven und metachromatischen Wirkung keine Gegenfärbungen mit anderen, kontrastierenden Farbstoffen benötigen. Außerdem können dabei auch spezifische Metachromasien festgestellt werden. In gleicher Weise wirkt das Thionin (Lauths Violett), das jedoch wegen des hohen Preises und der Verschiedenheit der Fabrikate einzelner Firmen erst in zweiter Linie in Frage kommt. Direkte Kernfärbungen bei den frisch ausgefallenen Sporen mit Kresylechtviolett habe ich bereits beschrieben. Bei allen anderen Zellen des Pilzes, also bei den Schnittpräparaten, erscheinen dagegen die direkt gefärbten Kerne nur selten differenziert genug. Höchstens im Oberteil der Basidien, in den Sterigmen und in den Sporen, solange sie noch an diesen haften, sind sie nicht selten ebensogut kenntlich. Schnitte also müssen auch für die Kresylviolett-färbung im allgemeinen vorfixiert werden. Leider ist bis jetzt nur eine Methode bekannt, bei der Toluidinblau und Kresylechtviolett ihre metachromatischen Wirkungen nicht verlieren und sogar nach den Differenzierungen behalten. Es sind dies Fixierungen, denen Bleiacetat zugesetzt wird. Sie sind für die Pilze noch wenig erprobt und können auch nur in Räumen mit den nötigen Vorrichtungen für den Umgang mit so giftigen Stoffen praktiziert werden. Diese beiden Färbungen verlaufen rascher als andere.

Auch das Kernechtrot, das ebenfalls ziemlich rasch wirkt, kann an Stelle des Carmins empfohlen werden (für den Basidieninhalt von *Lyophyllum* etc. dagegen sind das Carmin und die Carminsäure besser!). Es scheint bei den *Agaricales* am wirksamsten in Lösung mit gewissen Mangansalzen und wohl auch mit Borax zu sein. Vorfixierungen ohne Formol sind hier möglicherweise besser. Gegenfärbung mit einem blauen oder grünen Farbstoff ist allerdings notwendig.

Alle diese Kernfärbungen sind für Untersuchungen von Schnitten mit Basidien und Sporen, von Lamellenfragmenten, abgezogener Huthaut, Myzelfäden, Cortinafäden etc. gedacht.

Bis zu einem gewissen Grade lassen sich manchmal auch bei frischem, unfixiertem Material die Kerne mit allen möglichen Farbstoffen färben, doch bleibt dies fast immer eine unsichere Sache. Nur der Geübteste kann sie hierbei erkennen, ohne stundenlang herumsuchen zu müssen. Auch in den Sterigmen-sporen färben sie sich in der Regel nur, solange diese noch am Hilum hängen. Sobald sie sich davon losgelöst haben (bevor die Färbung wirksam wurde!), sind sie meistens nicht mehr färbbar – das Kresylechtviolett ist hier die einzige Ausnahme, die mir bekannt ist.

Für die Systematik wertvoller dürfte die Kernfärbung bei den frisch ausgefallenen Sporen im Sporenpulver sein. Man muß hier nicht lange am Schnittpräparat suchen und hat ein Kernbild dicht neben dem anderen im Sichtfeld, kann es also bequem überschauen. Außerdem sind so die Kerne meist in einer und derselben Phase (zwischen Loslösung von den Sterigmen und Keimung) zu beobachten.

Nunmehr gebe ich eine Methode an, bei der alle die zeitraubenden Manipulationen mit den Schnitten wegfallen, die so viel gespannte Aufmerksamkeit verlangen, da diese nicht zerdrückt werden, nicht zusammenkleben, nicht davonschwimmen und wegen ihrer Winzigkeit nicht verlorengehen dürfen. Die üblichen Methoden versagen hier vollständig, allein schon deshalb, weil es ohne komplizierte Einbettungs- oder Aufklebethoden nicht möglich ist, das Fixiermittel hinreichend auszuwaschen, so daß die meisten Farblösungen danach gerinnen, verblassen oder sonstwie unwirksam werden oder daß die Kerne unnatürlich verändert werden, zerfallen etc. Bei der folgenden Methode dagegen ist mir dergleichen noch kein einziges Mal vorgekommen!

Die Borax-Toluidinblau-Färbung von Sporenkernen: Erforderliche Reagentien sind

1. Perborax (Natrium perboratum MERCK) in ca. 5-prozentiger Lösung in Aq.dest.;
2. normales, 5-prozentiges Wasserstoffsuperoxyd;
3. etwa 40-prozentige Kalilauge;
4. etwa 0,3-prozentiges Eisessigwasser;
5. Toluidinblau (BAYER) in einer ca. 5-prozentigen Boraxlösung in Aq.dest. gelöst, wobei stärker erwärmt werden kann (soll?); etwa 7 mm eines Normalstreichholz-Endes halb gehäuft mit Farbstoff in 10–20 ccm Boraxlösung;
6. Alkohol, 90- bis 96-prozentig oder gewöhnlicher Brennschspiritus.

Vor der Färbung müssen die Sporen gebleicht werden; denn nur dadurch kommen die Kerne stärker zum Vorschein, während der übrige Teil schwächer gefärbt bleibt. Auch die »weißen«, farblos-hyalinen Sporen müssen so vorbehandelt werden! Da man bei diesen nicht gut von »Bleichung« sprechen kann, sei hier der Ausdruck »Depigmentierung« gebraucht.

Die Prozedur:

1. Man läßt zunächst möglichst viele Pilzhüte auf einer Glasplatte, Porzellanfliese oder dergl. recht ausgiebig sporulieren (z.B. 24 Stunden), schabt dann das Pulver mit einer Rasierklinge zusammen und schüttet es in die Depigmentierflüssigkeit, wobei man umschwenkt, schüttelt etc.

2. Die Depigmentierung: In einem niedrigen, breiten Glasgefäß mit flachem Boden setzt man der Perboraxlösung ca. 0,3 Prozent der Kalilauge (also einige Tropfen der 40-prozentigen Lauge) zu und mischt gut durch. (Natürlich kann man statt Perborax auch Borax plus Perhydrol verwenden, doch ist ein genormtes Fertigfabrikat für die Systematik viel besser, wie aus folgendem ersichtlich sein wird!) Sobald die Sporen in der Flüssigkeit sind, setzt Sauerstoffentwicklung ein, die nach mehreren Stunden aufhört, wobei die Sporen zu Boden sinken und in der Regel ausreichend gebleicht sind. Bei manchen Gattungen tritt die Bleichung sogar fast augenblicklich ein. Die Depigmentierung wäre somit beendet. Es ist aber bedeutend praktischer und einfacher, wenn man etwas länger wartet: Man läßt also das Ganze einfach über Nacht stehen (z.B. auf 10 Stunden genormt). Am nächsten Morgen hat sich die Sporenmasse auf dem Boden des Gefäßes verdichtet, und die Flüssigkeit kann leicht abgegossen werden. Die bleichende Wirkung ist sehr stark. Diese Methode bewirkt die stärkste Kernfärbung.

Für gewisse Gattungen, z.B. für *Psalliota*-Sporen, ist folgende Methode besser: Es wird statt Perborax Wasserstoffsuperoxyd verwendet, dem man ca. 0,5 Prozent der Kalilauge zusetzt. Dann verfährt man analog. Nach dem Abgießen dieser Depigmentierflüssigkeit kann dann Eisessigwasser zugesetzt werden. In sehr vielen Fällen scheint dies allerdings unzweckmäßig oder zumindest überflüssig zu sein; in anderen Fällen wird die Bleichung durch diesen Zusatz erst vollständig. Das jeweils Beste wird sich im Laufe der Zeit herausstellen. Die bleichende Wirkung ist auch ohne Essigwasser sehr stark. Ziemlich schwach ist sie dagegen, wenn man nur Perboraxlösung ohne Kalilauge verwendet. Danach erscheinen auch die Kerne schwächer färbbar, wohl aber relativ in der natürlichsten Größe und Lokalisation. Dies ist nämlich bei den verschiedenen Methoden oft recht ungleich. So können z.B. bei der einen Methode im Falle von 2-Kernigkeit die Nuclei an den »Polen« erscheinen, bei der anderen nebeneinander oder dicht übereinan-

der. Es ist also stets besonders wichtig, nach streng genormten Verfahren zu arbeiten und, wenn irgend möglich, standardisierte Fertigfabrikate zu verwenden.

3. Die Färbung: Man tupft mit einem Glas-Tropfstäbchen eine möglichst kleine Menge der nassen Sporenmasse vom Boden des Gefäßes auf den Objektträger, tropft eine reichliche Menge der Farblösung auf (wobei man etwas »verrührt«) und färbt ca. 3–15 Minuten.

4. Die Differenzierung: Sie ist bei der Toluidinblau-Färbung unbedingt notwendig; denn erst nach dieser erscheinen die Kerne wirklich elektiv und stark gefärbt. Man tropft der sporenhaltigen Farblösung auf dem Objektträger so viel Alkohol oder Brennspritus auf, daß zu einem Teil der Farbflüssigkeit das gleiche Quantum dieser Differenzierflüssigkeit kommt. Es kann geschehen, daß die Sporen dadurch deformiert werden oder daß ihr Inhalt herausquillt. Auf jeden Fall muß man sofort mit der Untersuchung beginnen!

Hiermit ist die Prozedur beendet. Optimal erscheint die Spore farblos, der Kern (bzw. die Kerne) intensiv blau bis blauschwarz. Während das Kresylechtviolett das Chromatin der Sporen nur bei einem relativ kleinen Teil der Gattungen bzw. Arten färbt, werden durch die – zwar etwas länger dauernde und kompliziertere – Methode mit Toluidinblau die Sporenkerne sehr vieler Gattungen und Arten gefärbt, so z. B. von *Tricholoma*, *Naucoria*, *Cortinarius*, *Bolbitius*, *Geophila*, *Lepiota* etc. Für *Russulaceen*-Sporen ist sie nicht geeignet.

Festzustellen ist vor allem die Anzahl der Kerne – ob die Spore 1-, 2- oder mehrkernig ist –, ferner die Lokalisation, d. h. ob der Kern zentral, basal oder apikal liegt und (bei 2-Kernigkeit) ob die Nuclei an den »Polen«, dicht über- oder nebeneinandersitzen, und schließlich die Größe der Kerne. Größe und Lokalisation können je nach der angewendeten Methode beträchtlich verschieden sein – ja, sogar die Zahl kann gelegentlich bei sehr verschiedenen Färbeweisen anders erscheinen. Es muß also nochmals darauf hingewiesen werden, daß immer nach streng genormten Methoden zu arbeiten ist und daß diese in jedem einzelnen Fall mit angegeben werden müssen – seien es nun Sublimatfixierung, Bouinfixierung, Giemsa-Färbung oder Hämatoxylinfärbung etc. Um nur ein Beispiel zu nennen: Die Sporen von *Leucocortinarius bulbiger* Alb. et Schw. sind nicht-argentaaffin; durch Aluminiumsulfat-Kresylviolett kommt kein *Cortinarien*-Ornament, sondern eher ein *Tricholomataceen*-Ornament zum Vorschein. Sollten sie sich nun auch noch als 1-kernig erweisen, so bestünde kein Zweifel mehr, daß der Pilz mit *Cortinarius* nicht das Geringste zu tun hat. Bei der Borax-Toluidinblau-Methode erscheinen die *Cortinarien*-Sporen durchweg alle 2-kernig, während manche Sporen bei gewissen anderen Gattungen nach der Kresylechtviolett-Direktfärbung wie 1-kernig, nach der Toluidinblaufärbung aber 2- oder mehrkernig aussehen können. Näheres siehe S. 107 (unter »Beobachtungen«)!

Fixierung: Nach der Depigmentierung sind Fixierungen der üblichen Art, wie sie z. B. für die Schnitte gebräuchlich sind, möglich, scheinen aber meist unnötig zu sein. Sie kämen höchstens für eventuelle Nachprüfungen in Frage oder für solche Sporen, bei denen die Kerne auch nach der Differenzierung noch nicht gefärbt erschienen! Es wurden Gemische aus Pikrinsäure, Alkohol und Eisessig erprobt. Auch Pikrinsalpetersäure nach P. Mayer kann statt der Pikrinsäure verwendet werden. Harnstoffzusatz scheint für die nachfolgende Färbung nicht ungünstig zu sein. Diese Fixierungen verursachen keinerlei Gerinnen oder Unwirksamwerden der Farblösung. Nach der Fixierung soll in 70–80-prozentigem Alkohol »ausgewaschen« werden, den man nach Belieben erneuern kann. Man verfährt analog wie beim Depigmentieren, indem man nach jedem Arbeitsgang wartet, bis die Sporenmasse auf den Boden des Gefäßes gesunken ist, und dann jeweils die Flüssigkeit abgießt. Man kann 4, aber auch 36 Stunden fixieren und kann 4, aber auch 10 Stunden bzw. dreimal 10 Stunden auswaschen. Die Kerne sehen dann hier und da ganz anders aus als direkt nach der Depigmentierung – z. B. in einzelne Teile zerfallen oder sonstwie verändert. Am auffallendsten ist dies bei *Psalliotia*-Sporen, die dabei ein regelrechtes »Kernmuster« zeigen: gefärbte Korpuskel, die um einen mehr oder weniger

homogen-hyalin aussehenden Zentralkörper (Kernmembran?) herum gruppiert sind. Ob es sich hierbei immer um eine unnatürliche Veränderung oder um eine durch Reizwirkung beschleunigte natürliche Veränderung der (vielleicht noch nicht toten) Kerne handelt, wird sich wohl erst im Laufe der Zeit herausstellen. Für rasche Übersichten zu systematischen Zwecken wird es gut sein, ohne diese Sporenpulverfixierung auszukommen.

Überfärbungen: Sollten auch nach der Differenzierung noch solche vorkommen – was relativ selten zu sein scheint –, so kann man in Nelkenöl, Cajeputöl oder dergleichen aufhellen. Man läßt z.B. die Flüssigkeit auf dem Objektträger durch leichtes Erhitzen verdunsten und tropft dann das Öl auf, wobei man die festgebackene Masse mit einem Glasgegenstand etwas aufkratzt und auflockert. Dann muß im Öl untersucht werden (eventuell mit Xylol verdünnen!).

Metachromasien: Schon durch die direkte Borax-Toluidinblau-Simultanfärbung der nicht vorherbehandelten (nicht depigmentierten) Sporen werden starke Metachromasien hervorgerufen. Es dürfte aber zweckmäßiger sein, solche erst nach der Depigmentierung zu notieren und für die Systematik auszuwerten. Am stärksten sind sie nach der Perhydrol-Kalilauge-Methode: z.B. Spore blau, Inhalt bzw. Kern (falls dieser so schon kenntlich) rötlich-purpurn; Spore violett, Inhalt schwarz-blau; Spore blau, Hilärregion schwarzgrau; Spore purpurlila, Inhalt mehr rötlich etc. etc. Diese Metachromasien verschwinden größtenteils durch die Alkoholdifferenzierung; sie müssen also vor dieser beobachtet werden! Oft – aber nicht immer! – sind auch da schon die Kerne ziemlich deutlich. Auf alle Fälle müssen diese nach der Differenzierung gesehen werden! Auch schon ohne die Depigmentierung mögen hier und da Kerne rasch oder sogar sofort gefärbt sein. Da sich aber meist noch gewisse Granula auf die gleiche Weise mitfärben, ist dies stets etwas unsicher.

Beobachtungen (vgl. hierzu S. 106!): Wie nicht anders zu erwarten war, erscheinen die Kerne in etwas anderer Gestalt und Lokalisation als z.B. nach der substantiven Kresylechtviolett-»Vitalfärbung« (»Subvital«- oder »Postvitalfärbung«?), nämlich stets losgelöst vom Hilum und meistens kleiner. Die Sporen von *Psalliota campestris* L. zeigten sich 2-kernig, die des *Clitopilus* (*Rhodopaxillus*, *Rhodocybe*) *truncatus* (ss. Quél.) K.-R. sowie des *Clitopilus popinalis* Fr. auch 2-kernig (nicht wenige sogar 3-kernig!), während sie nach der Kresylechtviolettffärbung eher 1-kernig aussahen. Hieraus darf man nun nicht folgern, daß eine der beiden Methoden »falsch« sei. Vielmehr handelt es sich beim Kresylviolett um einen bestimmten Chemismus – die spezifische Färbbarkeit des Chromatins –, während das Borax-Toluidinblau Chromatin und Kern (in diesem Zusammenhang = Nucleus, nicht Nucleolus!) färbt. In diesem Fall ist für die Systematik immer das Toluidinblau maßgebend! Sämtliche anderen mir bekannten Kernfarbstoffe färben nach der Depigmentierung und auch nach Fixierungen im wesentlichen wie dieses. Warum es sich mit der Kresylechtviolett-Substantivfärbung anders verhält, kann heute an dieser Stelle noch nicht erörtert werden. In Bezug auf die Anzahl der Kerne ist also das Kresylviolett nicht maßgebend! Die Sporen der eigentlichen *Rhodopaxillus*-Arten erschienen auch in Borax-Toluidinblau einkernig. Ein unklares Bild bieten meist die sehr großen, dünnwandigen Sporen, deren Membran leicht eine Art Schrumpfung bekommt, so daß keine klar umgrenzten Kerne durchscheinen.

Daß Sporen 3- und mehrkernig sein können, scheint nicht allzu selten zu sein. Ebenso wie in den Basidien nach der Sporenabstoßung Kerne zurückbleiben können, so können offenbar auch »zu viele« Kerne in die Spore wandern. In der überwiegenden Mehrzahl der Fälle erscheinen die Sporen ganz klar 1- oder 2-kernig. Auf alle Fälle sollte man ab und zu mehrere, möglichst ganz verschiedene Methoden anwenden; denn erst dadurch bekommt man einen Begriff von der natürlichen Gestalt und den natürlichen Veränderungen der Kerne. Zur Nachprüfung kämen da vor allem die Kern-Dunkelungen durch Fixierung mit Osmiumsäure in Frage. Dadurch wird zwar auch der ölige Sporenhalt mitgedunkelt, so daß diese »Kernfärbung« nicht sehr klar ist; zur Kontrolle genügt das aber oft vollständig. Vielleicht mag auch schon der Phasenkontrast allein diesen Zweck

erfüllen. (Sollten durch diesen die Kerne stets auch ungefärbt schon sichtbar sein, so dürfte doch die Erfahrung noch nicht ganz ausreichen, um sie ohne Vergleich mit dem gefärbten Objekt immer mit Sicherheit als solche zu erkennen.)

Es sei betont, daß man von der Borax-Toluidinblau-Färbung nicht erwarten darf, auch gleich die einzelnen Kernelemente mit deutlich zu machen. Zu diesem Zweck müßte man viel länger färben und möglichst auch noch fixieren. Das Ganze muß vielleicht eher als »Kern-Andeutung« bezeichnet werden. Allerdings ist es in der Regel eine sehr farbstarke »Andeutung«; und es besteht kein Zweifel, daß diese Methode auf relativ sehr rasche Art Anzahl, Größe und Lokalisation der Kerne als deutlich umgrenzte, gefärbte Stellen angibt. Hierbei kann manche systematische Frage rasch und einfach gelöst werden.

Nach der Depigmentierung können, wie schon erwähnt, die Kerne auch mit mehreren anderen Farbstoffen gefärbt werden. Nach meiner Erfahrung färbt aber nur noch das Borax-Methylenblau ähnlich rasch und intensiv; die sonstigen Kernfärbemittel wirken hier entweder schwächer oder viel langsamer. (Borax-Methylenblau: Die gleichen Mengen- und Maßverhältnisse wie beim Borax-Toluidinblau. Gelöst wird nötigenfalls in siedender Boraxlösung. Nach der Färbung ist eine Differenzierung meist unnötig. Im Falle einer Überfärbung wird durch Auftropfen von schwach essigsauerm Wasser differenziert.)

Die Borax-Toluidinblau-Universalfärbung

Diese außerordentlich vielseitige Färbung verdient wohl mit Recht die Bezeichnung »universal«. Ihre Farblösung hat neben der Sporenkernfärbung noch weitere wertvolle Eigenschaften. Für die Untersuchung von frischen, nicht vorbehandelten Schnitten, besonders für rasche Übersichten mit gröberen Messungen, bei schwächeren Vergrößerungen (also auch für ganz einfache Mikroskope geeignet!), kenne ich keine bessere und einfachere Färbung. Hierin ist das Borax-Toluidinblau dem Borax-Methylenblau weit überlegen!

Die Farblösung darf nicht so stark sein wie für die Sporen; sie muß um etwa die Hälfte verdünnt werden (mit 5-prozentiger Boraxlösung in Aq.dest.).

1. Zunächst wird der Inhalt vieler Zellen mehr oder weniger homogen und metachromatisch gefärbt – und zwar ganz ungleich, so daß ein großer Teil der Zellen bzw. Hyphen etc. ungefärbt bleibt, während viele Hyphenabschnitte blaß, manche stark gefärbt erscheinen. Hierdurch wird es möglich, z.B. den Verlauf einer Lamellentrama auf den ersten Blick leichtest zu erkennen. Nur um zu sehen, wie die Färbung funktioniert, untersuche man einmal den Lamellenschnitt einer *Amanita*-Art! Es kommen nicht nur die starken Divergenzen, sondern auch die allergeringsten Abweichungen (z.B. bei regulären Tramen) sofort eindeutig heraus. Ganz besonders eignet sich die Färbung für unübersichtliche, extrem dichte und wirre Strukturen aus dünnwandigen Hyphen und leistet z.B. bei der Untersuchung von pseudoparenchymatischen, dichten, verklebten und unklaren Hutdeckschichten geradezu unschätzbare Dienste. Jedes zellige Element und auch die Form der einzelnen Zellen bzw. Hyphenabschnitte – seien sie auch noch so bizarr – können schnellstens erkannt werden. Falls die Deckschicht zu stark pigmentiert, d.h. zu dunkel ist, so braucht man sie nur auf die für die Sporen beschriebene Weise zu bleichen, was hier ungleich rascher vor sich geht, da man die Sauerstoffbläschen durch kurzes, kräftiges Spülen in Aq.dest. entfernen kann (die restlichen Bläschen kann man durch Klopfen auf das Deckgläschen herausbringen). Ohne Depigmentierung sind die Metachromasien meist etwa folgende: Tramazellen weinrötlich oder purpurrötlich, Hymenialzellen blau, Cystiden, Haare etc. (auch an den Bekleidungen) oft schwarzblau. Ein Ineinanderfließen dieser Farben kommt nicht vor – es sei denn, daß man allzu lange wartet.

2. Für die Untersuchung des Hymeniums und Subhymeniums muß man die Farblösung noch stärker verdünnen, weil diese Teile nicht selten etwas überfärbt werden. Auch hier erscheinen die einzelnen Zellen bzw. Abschnitte viel deutlicher als bei allen anderen

Färbemethoden. Durch die ungleiche Stärke der Zellinhalt-Färbung wird tatsächlich überall die Einzelzelle elektiv hervorgehoben – seien es nun Trama-, Hymenial-, Epicutis-, Cutis-, Subcutis-, Derm-, Hypoderm-, Velum-, Cortina- oder Volvazellen, Basidien oder Cystiden.

3. Bei den *Russulaceen* werden sogar die Laticiferen und Cystiden elektiv genug gefärbt, so daß man ganz gut auf die Schwefelsäure-Aldehyde wie Sulfo-Vanillin, Sulfo-Benzaldehyd etc. verzichten kann. Diese Elemente werden dann zwar nicht so stark gefärbt, dafür fällt aber die störende Refringenz der Schwefelsäure fort. Bei gewissen schwärzenden und bräunenden *Russula*-Arten z. B. werden die Cystiden sogar schwarz (übriges Hymenium blau). Sicherlich werden sich auch noch bei anderen Gattungen elektive Cystidenfärbungen herausstellen.

Damit sind die guten Eigenschaften noch lange nicht erschöpft. Es werden ferner elektiv gefärbt:

4. Oleiferen, z.B. metachromatisch rötlich, blau, intensiv schwarz, gelbschwarz, braunschwarz etc.,

5. gewisse Pigmente, z.B. intensiv schwarz (manchmal genauso wie die Oleiferen!), gelbschwarz, braunschwarz etc.,

6. gewisse intrazelluläre, extrazelluläre oder membranäre Granula blau, violett oder schwarz. Leider sind die Kerne meist nur schwer von diesen zu unterscheiden (bei raschen Übersichten!). Kerne werden also durch diese rasche Methode leider nicht elektiv gefärbt.

7. Bei manchen Arten färben sich die Zellwände z.B. schwarzweinrot, schwarzviolett. Metachromasien der Wand zum Zellinhalt konnte ich mit der normalen, verdünnten Farblösung noch nicht beobachten. Differenziert man in 50-prozentigem Alkohol, so werden die Wände fast immer elektiv-dunkel hervorgehoben. Nach dieser Differenzierung verschwinden aber die Metachromasien ebenso wie die homogene Färbung des Zellinhaltes.

Sehr stark gefärbt werden, wie schon erwähnt, auch die Dermatocystiden und Haare der Bekleidungen und sogar die Hyphen der verschleimenden Deckschichten (meist elektiv schwarzblau, paynesgrau etc.). In diesen treten nach der Differenzierung in 50-prozentigem Alkohol sogar noch weitere Schleimelemente hervor.

9. Ganz ähnlich wie der homogen-weinrötliche Zellinhalt werden auch »Vakuolen« und »Tropfen« gefärbt. Das besonders häufige Auftreten derartiger Elemente (wohl »Kunstprodukte«) kann vielleicht von spezifischer Bedeutung sein.

Bei dieser Färbung ist es wichtig, daß alles möglichst rasch vor sich geht. Die Farblösung wird auf das Objekt aufgetropft, wobei man den Objektträger nur ganz wenig hin- und herbewegt. Dann muß sofort mit der Untersuchung begonnen werden. Wartet man zu lange, so verblaßt die Farbe und verändert sich zusammen mit dem Objekt! (In der Flasche hält sie sich viel länger.)

Mit dieser einfachen Methode kann man sich die meisten anderen Färbungen sparen. Ihr Wert wird noch dadurch erhöht, daß Toluidinblau relativ sehr billig ist und das Ergebnis durch eine gelegentliche leichte Trübung des Präparates kaum beeinträchtigt wird.

Färbungen der Zellwände

Es ist bereits bekannt, daß das Melzerreagens nicht nur gewisse Sporenmembranen, sondern auch Hyphenwände zu färben vermag. Ebenso kennt man die Wirkung des Kresylblaus, das in konzentrierter Lösung (Aq.dest.) bei etlichen Arten die Membranen metachromatisch färbt. An Stelle des Kresylblaus wurde schon das »Kresylechtviolett, besonders stark metachromatisch (BAYER)« empfohlen, das in gesättigter Lösung (Aq. dest.) immer noch ein so helles Sichtfeld behält, daß ein Zerreiben des Schnittes überflüssig ist (siehe Fl.An., Seite 490–91, Kap. C, Abschn. 3^o!). Die Metachromasien Rot-Blau scheinen bei beiden Farbstoffen ziemlich die gleichen zu sein. Erprobt wurde hier das

Brillantkresylblau (MERCK). Auffallend ist, daß diese Metachromasien der Wände nur bei den kleinen und kleinsten, schwächtigen Arten vorzukommen scheinen, nie bei den großen, fleischigen Arten.

Neben diesen Farbstoffen werden vor allem noch das Kongorot und das Baumwollblau angewendet (gemeint sind nur solche als »Baumwollblau« bezeichnete Farbstoffe, die dem »Bleu acide C₄B« nach Poirrier entsprechen). Sie kommen vor allem für Exsikkate in Frage, da sie in den Flüssigkeiten, die das Wiederaufquellen der Schnitte bewirken, gelöst werden können. Das Baumwollblau wird in Milchsäure oder Lactophenol, das Kongorot in konzentriertem Ammoniak gelöst (siehe Fl. An., Seite 489, Kap. A, Abschn. 1^o!). Da die wieder aufgequollenen Schnitte ungefärbt viel unübersichtlicher sind als (ungefärbte) Schnitte von frischen Pilzen, ist eine derartige Färbung notwendig. Das Kongorot kann aber auch für die Untersuchung von frischen Objekten recht wertvoll sein, da es das Auffinden von Schnallen bedeutend erleichtert. Dabei soll es erhitzt werden.

Die meisten anderen Zellwandfärbungen, z.B. solche nach Fixierungen, kommen für die Systematik – weil zu umständlich – kaum in Frage. Hier kann man nur rasche, direkte oder auch simultane Methoden gebrauchen. So gibt es noch zahlreiche Farbstoffe, die unter gewissen Umständen die Wände zu färben vermögen. Um nur einige Beispiele zu nennen:

Das Borax-Toluidinblau wirkt auch hier, wie im vorhergehenden Kapitel beschrieben; außerdem reagieren bei vielen Arten (nicht bei allen!) sehr intensiv das Methylenblau und vor allem das Borax-Methylenblau, mit dem man den frischen, nicht vorbehandelten Schnitt ca. 3–15 Min. färbt. Danach erscheinen die Wände optimal veilchenblau-schwarz. Dies ergibt oft eine scharfe, klare und recht elektive Zellwandfärbung.

Bei Molybdän-Hämatoxylin nach Clara (in voll ausgereifter, dunkelroter, 2–3 Jahre alter Lösung) färbt man mit der unverdünnten (!) Flüssigkeit ca. 5–20 Min., spült kurz in Brunnenwasser (!) ab und untersucht in diesem. Optimal erscheinen danach die Wände violett-blauschwarz, alles übrige blaßblau. Diese Färbung ist noch klarer, sauberer und elektiver als die vorige! Hier wird man auch gewisse neue Schlüsse auf die Beschaffenheit der Pilzzellwände, vielleicht der Pilzzellulose selbst, ziehen können. Es gibt nämlich eine (langwierige) Methode mit diesem Färbemittel, bei der »muköse« und »mukoide« Substanzen verschieden gefärbt erscheinen. Allerdings färbt die erste, raschere Methode die verschleimenden Bestandteile nicht so elektiv wie das Rutheniumrot.

Die Eigenschaften des Rutheniumrots wurden schon im 1. Teil (Z.f.P. 22/4) beschrieben. Es färbt die gewöhnlichen Zellwände nicht so stark wie die anderen zellulosefärbenden Mittel. Durch mäßiges (!) Erhitzen wird die Färbekraft verstärkt.

Unbedingt erwähnt werden muß noch das Brillantvitalrot, das in Verbindung mit anderen Reagentien (nicht substantiv!) ebenfalls die Wände zu färben vermag. So kann es z.B. in allen möglichen Kombinationen und Methoden mit ammoniakalischer Silberlösung eine sehr starke Membranenfärbung bewirken. Ein Beispiel dafür: Man vermische eine kräftige, wässrige Brillantvitalrot-Lösung kurz vor Gebrauch mit ammoniakalischer Silberlösung und färbe ca. 30 Sek. bis 10 Min., wonach die Wände optimal schwarzrot erscheinen. Auch dies ist eine elektive Zellwandfärbung. Möglicherweise wirkt sie bei den einzelnen Arten verschieden-stark wie auch die folgende Methode:

Eine Verbindung des Brillantvitalrots mit anthrachinon-beta-sulfonsaurem Natrium, dem sog. »Silbersalz« (das aber im Gegensatz zur ammon. Silberlösung mit Silber nichts zu tun hat!), färbt – etwas schwächer als das Ammoniak-Kongorot – die Wände und vor allem die Septen mit den Schnallen (!). Die optimale Mischungs- und Färbemethode ist noch nicht bekannt; bisher wurde eine Verbindung in wässriger Lösung erprobt. Diese Färbung ist insofern interessant, als dabei zuweilen auch rasche Kernfärbungen (z.B. in den Basidien und Sterigmensporen) vorkommen: Schnitt hellrot, Wände etwas dunkler, Kerne dunkelrot bis ockerbraun. Für den Biologen dürfte dabei von besonderem Reiz sein, daß gelegentlich intrazelluläre Bewegungen (vitaler, nicht chemischer Art) zu beobachten sind.

Ferner ist die Bromwasserstoffsäure zu nennen, die als Zusatz zu den Lösungen gewisser saurer oder Säurefarbstoffe die Zellwandfärbung verstärken kann. (Manche Farbstoffe vertragen einen gewissen Prozentsatz dieser Fixierflüssigkeit, ohne zu gerinnen oder unwirksam zu werden.)

Zuletzt sei noch auf das Borax hingewiesen, das sicher auch noch mit anderen Farbstoffen eine Verstärkung der Membranfärbung hervorrufen kann. Nötigenfalls könnte dazu ein Zusatz von Borsäure oder Alkohol-Borsäure kommen.

Ob es sich immer und überall um eine echte Durchfärbung der Zellwand handelt oder ob nicht manchmal nur eine Konturzeichnung durch eine Art Adhäsionsfärbung vorliegt, kann noch nicht gesagt werden. In vielen Fällen würde aber beides für die Systematik den gleichen Zweck erfüllen.

Anmerkungen zum I. und II. Teil der »Neuen Färbungen...« (Z.f.P. 22/4 und 23/2): 1,3-Dioxy-Naphthalin, Reagens auf Oxalsäure, wurde als Ersatz für Anthracengrün genannt. Es kann jedoch, was die Färbung der betreffenden Elemente angeht, die Manginreaktion kaum ersetzen.

Chromalaun-Gallaminblau als Färbemittel für die Ornamente der *Cortinari*-Sporen: Bei Anwendung von violetterm Chromalaun ist die Wirkung etwas tiefer als bei der Verwendung von grünem Chromalaun. Vielleicht ist eine Mischung von grünem und violetterm Alaun am günstigsten; möglicherweise kommt es auch hier – wie bei vielen anderen Farbstoffen und Reagentien – auf die Reinheit oder auf gewisse (meist unbekannte) Verunreinigungen des Fabrikates an.

Ammoniak: Gemeint ist stets der gewöhnliche Salmiakgeist, nicht konzentrierter NH_4OH !

Makrochemische Farbreaktionen

Das Millon-Reagens ist nicht einfach eine Lösung von Quecksilber in Salpetersäure, sondern von ganz bestimmter Zusammensetzung und als eines der bekannten Reaktive auf Eiweiß wohl bei jedem Pilz mehr oder weniger wirksam. Die Reaktion verläuft meist ziemlich einheitlich schmutzig-gelblichrosa und fast nie rapid. Eine einzige wirklich rasche und intensive Ausnahme ist mir bekannt: Das (Hut-)Fleisch von *Hygrophorus* (*Camorphyllus*) *pratensis* Pers. wird fast augenblicklich satt- und dunkel-indischrot. Sicher wird es möglich sein, das Reagens für die Pilze zu modifizieren; es ist allerdings stark giftig!

Eisessig-Benzidin: Die Wirkung des Benzidins in alkoholischer Lösung wurde bereits beschrieben. Löst man es z.B. in einer Mischung aus 1 Tl. Eisessig und 1 Tl. 96-prozentigem Alkohol, so treten rote Reaktionen viel häufiger auf. Dies ist besonders für die Untersuchung der *Psalliot*-Arten wertvoll, wo ausgesprochen rote Reaktionen mit Alkohol-Benzidin nicht vorkommen. Ob die Lösung mit Eisessig auch für alle anderen Gattungen günstiger ist, erscheint mir zweifelhaft; denn bei diesen können rote Farben auf die rein alkoholische Lösung als besonders charakteristisch angesehen werden. Notiert habe ich leider nur eine rote Alkohol-Benzidinreaktion für das Hutfleisch einer *Hygrophorus* (*Hygrocybe*)-Art; sie dauert hier ca. 16–20 Stunden, verläuft jedoch bei anderen Gattungen schneller. Die »Silber«- oder »Bleiglanzreaktion« von Hutbedeckungen scheint beim Eisessig-Benzidin nicht vorzukommen.

Orcin (nicht Orcein!): Obwohl grüne und blaue Reaktionen zu fehlen scheinen und das Orcin oft wirkungslos bleibt oder nur schwach und langsam wirkt, ist es doch eines der allerbesten Farbreaktive, das nuancenreichere Reaktionen hervorruft als die meisten anderen. Es kann sehr verschiedene Farbtöne erzeugen: Gelb, Schwarzbraun, Schwarz, Orangerot, Lilarot, düsteres Rotlila, Rot, Braun, Gelbbraun etc. etc. Hierin ist es den Reaktiven mit besonders rascher und starker Wirkung (Guajak, Phenol, Guajakol) weit überlegen. Sein Wert wird noch dadurch erhöht, daß die Farbtöne nicht so rasch wechseln wie z.B. bei Benzidin, Paraphenyldiamin etc. Man verwendet eine gesättigte Lösung in 50-prozentigem Alkohol. (Bei Angaben sollte stets die Firma des verwendeten Fabrikates mit genannt werden, da es sehr auf die Qualität dieses Reagens ankommt!)

Diacetin-Guajak: Von den französischen Mykologen wird nur eine blaue Guajakreaktion als positiv bezeichnet. Da nun die Farbreaktion auf den normalen Alkohol-Guajak sehr oft äußerst dunkel wird und noch dazu die Oberfläche der Tupfstelle sehr oft

einen Schimmer – fast wie beim Chitinpanzer eines Käfers – bekommt, weiß man oft nicht, ob man diese Farbe schon »Blau« nennen darf oder ob nur ein sehr düsteres, leicht bläuliches Grün vorliegt. Löst man den Guajak in Diacetin (Glycerindiäacetat), so fällt der Oberflächenschimmer fort, und blaue wie grüne Farben sind viel leichter als solche zu erkennen. Glycerinäther erfüllt wahrscheinlich denselben Zweck. Notfalls kann man auch in einer Mischung von Glycerin und Alkohol lösen.

Anm.: Leider wurde der Serumvertrieb Marburg, der die BAYER-Farbstoffe und -Reagentien führte, aufgelöst. Laut brieflicher Mitteilung des Serumvertriebes hat die Firma MERCK einen großen Teil davon übernommen. Falls der eine oder andere von mir erwähnte Farbstoff nicht erhältlich sein sollte, so bin ich jederzeit bereit, kleine Gratisproben abzugeben. D. Verf.

Forschungs- und Erfahrungsaustausch

Dryophila sordida Kühner und *Hebeloma strophosum* (Fr.)

Von W. Neuhoff

In Band 25 (S. 10–14) unserer Zeitschrift hat H. Schwöbel eine ausgezeichnete Beschreibung der zuvor erst unzulänglich bekannten, in systematischer Hinsicht recht schwierig einzuordnenden *Dryophila sordida* Kühn. veröffentlicht. Das Fehlen von Cystiden an den Lamellenflächen dieser Art ist in der Untergattung *Flammula* im Sinne von Kühner ebenso ungewöhnlich wie der innen und außen weißliche Stiel; die trüben Hutfarben ließen Kühner, den Entdecker der Art, an Beziehungen zur Gattung *Hebeloma* denken. Auch die langen, an der Spitze kopfig erweiterten Randhaare an den Lamellenschnitten kommen in ähnlicher Form bei Fälschlingen (und bei einigen Arten der Untergattung *Pholiota*) vor. Aber *G. sordida* Kühn. hat glatte Sporen, während sie in der Gattung *Hebeloma* rauh sind, wenn auch bei einigen Arten (vgl. Kühner-Romagnesi, Fl. Anal., S. 245, Abb. 378!) die winzigen Warzen der Sporenmembran so wenig in Erscheinung treten, daß noch J. E. Lange 1938 in dieser Gattung wiederholt von glatten Sporen sprach.

Von ähnlich unsicherer systematischer Stellung zwischen *Hebeloma* und der alten Gattung *Pholiota* ist nach Fries das im ursprünglichen Sinne noch ungeklärte *Hebeloma strophosum* (Fr.). Bereits der erste Satz der Beschreibung in Fries' Monographia (I, S. 325) enthält eine überraschende Parallele zu der von Schwöbel so gut beschriebenen Art: »Ad amnium ripas, . . . serotinus«, an den Ufern der Ströme, spät im Jahr. Aber bei Femsjö in Schweden, wo Fries den Pilz gefunden hat, gibt es keine schiffbaren, großen Flüsse, und so wird man den auffallenden Ausdruck sinngemäß am ehesten mit »Ufer von fließenden Gewässern« übersetzen dürfen. Auch Schwöbel erwähnt als Standort nicht nur die Altwasserufer des Rheins, sondern auch Auenwälder an Flüssen und Bächen. Die zusätzliche Angabe bei Fries »an grasigen Stellen im Nadelwald« weicht gewiß von Schwöbels Feststellung ab, aber bisher ist *D. sordida* erst so wenig gefunden worden, daß völlige Klarheit über die Standortverhältnisse noch nicht vorhanden ist.

Die Stielbeschreibung von *H. strophosum* (Fr.) weist in den wesentlichen Kennzeichen eine bemerkenswerte Übereinstimmung mit Schwöbels Angaben bei *G. sordida* Kühn. auf. Besonders bezeichnend ist es, daß der Stiel unterhalb des abgebogenen Ringes sowohl bei Fries wie auch bei Schwöbel als »anliegend-weißseidig überkleidet« charakterisiert wird. Daraus ergibt sich, daß *H. strophosum* bei Lange als Fehlbestimmung angesehen werden muß; die Beschreibung (Fl. Agar. Dan. III, S. 92) redet von einer stiefelnden, dicht wollig-faserigen Stielbekleidung unterhalb des Ringes, und die Abbildung (Taf. 118 D) zeigt einen Pilz, der sich von *H. mesophaeum* (Taf. 119 C) nur graduell durch etwas stärker entwickelte abstehende Stielbefaserung unterscheidet; den Eindruck einer *Pholiota* hinterläßt die Abbildung keinesfalls.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Zeitschrift für Pilzkunde](#)

Jahr/Year: 1959

Band/Volume: [25_1959](#)

Autor(en)/Author(s): Sandor Rudolf

Artikel/Article: [Neue Färbungen und Farbreaktionen an frischen Blätterpilzen und Röhrlingen \(III. Teil\) 103-112](#)