

# Fixierung, Einbettung und Schnitffärbungen für die plectologische Untersuchung von Hymenomyceten mit Lichtmikroskop

Autor(en): **Clémentçon, H.**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Mycologia Helvetica**

Band (Jahr): **3 (1988-1990)**

Heft 4

PDF erstellt am: **21.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-1036549>

## **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.

# MYCOLOGIA HELVETICA

Vol. 3 No 4

pp. 451—466

1990

(Manuskript erhalten am 30. Januar 1990)

## Fixierung, Einbettung und Schnittfärbungen für die plectologische Untersuchung von Hymenomyceten mit dem Lichtmikroskop

H. Clémenton

Institut de Botanique Systématique  
Bâtiment de Biologie, Université de Lausanne  
CH - 1015 Lausanne, Suisse

**Summary:** *Fixation, embedding and staining methods for the plectological investigation of fungal fruit bodies with the light microscope.* Coagulating and gelifying fixations and their consequences on embedding and staining fleshy fungi are discussed. A methacrylate mixture for embedding and sectioning fruit bodies is described. Its characteristics are: a) sections from 2 to 25  $\mu\text{m}$  are possible, b) the sections stretch easily on water without swelling and stick firmly to the glass slide, c) staining solutions penetrate easily, so even thick sections can be stained, d) the activated monomere mixture has a useful potlife of at least 48 h at room temperature and of at least three weeks at 4°C, e) the absence of highly volatile compounds minimizes the formation of bubbles during polymerization, f) the absence of peroxides allows embedding of block stained specimens without appreciable fading of the coloration, and it also retains the stainability of surface cells, such as basidia, g) glass ware can easily be cleaned with water, h) some staining methods give no or only slight background staining of the embedding plastic (iron-hematoxylin, zirconium-hematoxylin, molybdenum-hematoxylin, amidoblack 10B, pyronin B, azocarmine B, azocarmine G, Nuclear fast red, mercurochrome). Slightly stained plastic can be destained with absolute propanol.

**Résumé:** *Fixation, enrobage et colorations pour l'étude plectologique de carpophores d'hyménomycètes avec le microscope photonique.* Les fixations coagulantes et gélifiantes, ainsi que leurs effets sur l'enrobage et la coloration de champignons charnus sont discutés. Un mélange de méthacrylates pour inclure et couper des carpophores de champignons est décrit. Ses propriétés sont: a) il permet des coupes de 2 à 25  $\mu\text{m}$  d'épaisseur, b) les coupes se détendent sur l'eau sans se gonfler, et elles adhèrent

fermement au porte-objet, c) la pénétration rapide des solutions de coloration permet de colorer des coupes épaisses, d) le mélange monomère activé reste liquide pendant au moins 48 h à température ambiante, et pendant au moins trois semaines à 4°C, e) l'absence de substances très volatiles évite la formation de bulles pendant la polymérisation, f) l'absence de peroxydes permet l'inclusion de matériel coloré en bloc sans que celui-ci souffre d'une décoloration appréciable, et les cellules des surfaces (p.ex. les basides) conservent toute leur colorabilité, g) la verrerie peut être facilement lavée à l'eau, h) quelques colorations ne colorent que peu ou pas du tout le plastique d'enrobage (hématoxyline ferrique, zirconique et molybdénique, amidoblack 10B, pyronine B, azocarmin B, azocarmin G, Kernechtrot, mercurochrome). Le plastique légèrement teinté par la coloration peut être décoloré par le propanol absolu.

**Zusammenfassung:** *Fixierung, Einbettung und Schnittfärbungen für die plectologische Untersuchung von Hymenomyceten mit dem Lichtmikroskop.* Koagulierende und gelierende Fixierungen und ihre Konsequenzen für die Einbettung und Färbung fleischiger Pilze werden besprochen. Zum Einbetten und Schneiden von Pilzfruchtkörpern wird ein formstabiles Methacrylat-Gemisch mit folgenden Eigenschaften beschrieben: a) Schnittdicken von 2-25 µm sind möglich, b) die Schnitte strecken sich vollständig und ohne zu quellen auf Wasser und kleben dem Glas einwandfrei und dauerhaft an, c) Färbelösungen dringen rasch ein, so dass auch dicke Schnitte vollständig durchgefärbt werden, d) die Monomermischung mit Katalysator bleibt bei 4°C drei Wochen, bei Raumtemperatur mindestens 48 h lang dünnflüssig, e) leichtflüchtige Substanzen werden vermieden, so dass während der Polymerisation keine Blasen auftreten, f) da das Gemisch keine Peroxide enthält, können im Stück gefärbte Objekte eingeschlossen werden, ohne dass diese merklich verblassen, und die Färbbarkeit von Oberflächenzellen (etwa Basidien) bleibt voll erhalten, g) die Glasgeräte können leicht mit Wasser gereinigt werden, h) einige Färbungen tingieren den Einbettplastik nur wenig oder gar nicht (Eisen-Hämatoxylin, Zirkon-Hämatoxylin, Molybdän-Hämatoxylin, Amidoschwarz 10B, Pyronin B, Azocarmin B, Azocarmin G, Kernechtrot, Mercurochrom). Leicht angefärbte Plastikmasse kann mit absolutem Propanol entfärbt werden.

*Ich möchte es nicht unterlassen, Frau Jitka Lipka für ihre technische Assistenz, ihr wissenschaftliches Interesse und ihre Anteilnahme an meinen Arbeiten zu danken.*

Die Elektronenmikroskopie hat gezeigt, dass die besten Fixierungen mit kalten, gepufferten Lösungen von Glutaraldehyd, Formaldehyd oder Osmiumtetroxid erreicht werden und dass die Einbettung in Epoxiharze die fixierten Strukturen weitgehend formgetreu erhält. Diese Techniken können ohne Modifikationen auch für *cytologische* Untersuchungen mit dem Lichtmikroskop eingesetzt werden, denn kleinflächige, nur 0,2-0,5 µm dicke Schnitte haften gut auf dem Objektträger und lassen sich mit Toluidinblau leicht färben. Anders steht es um die *plectologische* Technik, mit der Pilzgeflechte untersucht werden, und wo grossflächige, 5-25 µm dicke Schnitte benötigt werden. Zwar können die Epoxiharze so dick geschnitten werden, aber die grossen Schnitte haften nicht mehr am Glas und können nur oberflächlich gefärbt werden, da die Farblösungen kaum in die dichte Epoxi-

masse eindringen. Zudem quellen dicke Schnitte stark und unregelmässig beim Eindecken mit Kunstharzlösungen. Dies hat schlecht gefärbte, unebene und oft gefaltete Präparate zur Folge, die kaum fotografiert werden können. Hier bringen die Methacrylate gute Abhilfe, deren Gemische leicht verschiedenen Objekten und Zwecken angepasst werden können. Es genügt, einen Blick in die letzten paar Jahrgänge einer spezialisierten Zeitschrift zu werfen (z.B. *Stain Technology*, ed. Williams & Wilkins, Baltimore USA), um sich von der raschen Entwicklung auf diesem Gebiet zu überzeugen. Während die meisten Autoren möglichst dünne Schnitte anstreben, werden für die Plectologie der Pilze eher dicke Schnitte benötigt. Es können Methacrylatgemische gefunden werden, die bei ausgezeichneter lichtoptischer Strukturerhaltung dicke Schnitte ermöglichen, die gut auf dem Objektträger kleben, und die auch Färbungen in der ganzen Schnittdicke erlauben. Ein solches Gemisch wird hier vorgestellt.

#### DIE FIXIERUNGEN UND DEREN KONSEQUENZEN

Nach dem Erscheinungsbild der behandelten Objekte lassen sich koagulierende und gelierende (= nicht koagulierende) Fixierungen unterscheiden (BAKER 1958). In Modellen zeigen Proteine nach koagulierender Fixierung eine schwammig-poröse, nach gelierender eine homogen-kompakte Struktur. Dieser Unterschied beeinflusst Einbettung, Färbung, Erscheinungsbild und Erhaltung feiner Einzelheiten biologischer Objekte:

<b>Fixierung:</b> Mikrostruktur:	<b>koagulierend</b> schwammig-porös	<b>gelierend</b> homogen-kompakt
Einbettung		
Paraffin	leicht	schwer
monomere Harze	leicht	leicht
Färbungen	leicht	oft schwer
Erscheinungsbild		
Cytoplasma	körnig bis netzig	homogen
Kernplasma	körnig bis netzig	homogen
Erhaltung der Feinstruktur und der Organellen	schlecht	gut
<b>Fixiermittel:</b>	saure Gemische z.B. Bouin, Nawashin Flemming, Champy	gepufferte Lösungen von Aldehyden und Osmiumtetroxid

Die cytologischen Strukturen der Pilze verändern sich rascher, als nach dem Erhaltungszustand der Gross-Morphologie erwartet werden könnte. Besonders die Basidien und die Kerne leiden stark. Die Pilze müssen deshalb so rasch als möglich nach dem Sammeln, auf jeden Fall noch am gleichen Tag fixiert werden. Sogar ein Aufbewahren im Kühlschrank ist oft schädlich.

### Wahl des Fixiermittels

Es geht aus der Tabelle unmittelbar hervor, dass gelierende Fixantien gute, koagulierende dagegen schlechte Fixierungen liefern. Der einzige Grund, weshalb die koagulierenden Fixierungen so lange angewendet wurden und zum Teil noch werden, liegt in der leichten Durchdringbarkeit der Objekte. Damit werden sie der Paraffineinbettung und allen Färbungen leicht zugänglich. Die Paraffineinbettung ist aber für Pilzfruchtkörper sehr schlecht geeignet, da sie, verglichen mit modernen Methoden, auf die Hyphen und Geflechte der Pilze geradezu zerstörend wirkt. Hier schafft die Harzeinbettung (Methacrylate oder Epoxiharze) gute Abhilfe, da sie auch nach gelierender Fixierung angewendet werden kann. Die Einbettungsharze werden, im Gegensatz zum Paraffin, nicht aus den Schnitten herausgelöst, wodurch zwar die genaue Einhaltung der Lage der Hyphen in einem Gewebe gewährleistet, aber die Färbbarkeit wesentlich erschwert wird. Oft färbt sich die Einbettmasse mit, oder sie verhindert das Eindringen der Farbstoffe. Das hier vorgestellte Methacrylatgemisch erlaubt eine einwandfreie Färbung der Pilze ohne Anfärbung der Einbettmasse. Dadurch werden die gelierenden Fixierungen zur Methode unserer Wahl, insbesondere die Fixierung mit Glutaraldehyd oder Formaldehyd, da Osmiumtetroxid sehr teuer und stark gesundheitsgefährdend ist.

### Probleme mit lufthaltigen, schwammigen Geflechten

Eine beträchtliche Schwierigkeit bei der Arbeit mit Pilzfruchtkörpern liegt in der schweren Benetzbarkeit lufthaltiger Stücke, etwa einer Huttrama oder gedrängter Lamellen. Zwar gibt es stark benetzende Fixiermittel, in denen die Pilze rasch untersinken (z.B. Newcomer, Gutbrod und Carnoy), aber diese Gemische sind stark alkoholhaltig oder gar wasserfrei, fixieren koagulierend und deformieren die Objekte stark. So sind wir denn heute auf die weniger stark benetzenden Aldehydlösungen angewiesen, auf denen die Pilze aber meist schwimmen und oft stundenlang Luftblasen enthalten.

Man ist versucht, die Objekte in der Aldehydlösung mit einer Vakuumpumpe (Wasserstrahlpumpe oder eine elektrische Pumpe vergleichbarer Leistung) zu entlüften, bis die Stücke nach Wiederherstellung des normalen Druckes untersinken. Nun hat es sich aber gezeigt, dass weiche Pilzteile, wie etwa die aus grosslumigen Hyphen gebaute Lamellentrama eines *Pluteus* oder einer *Macrolepiota* dadurch leicht deformiert werden. Luftgefüllte Hohlräume, wie sie in aerifer-glimmerigen Pilzhüten oft vorkommen, werden durch das

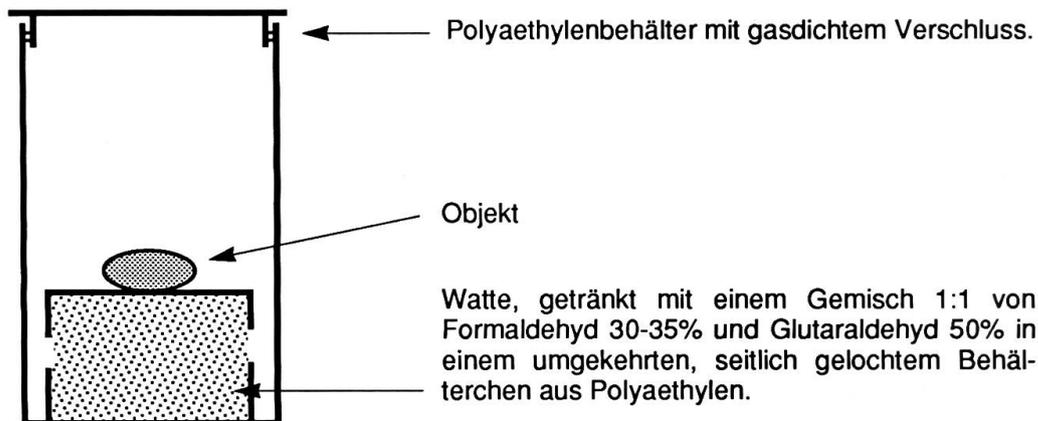
Entlüften so stark gedehnt, dass die Geflechte zerreißen können. Ein weiterer Nachteil des Entlüftens liegt darin, dass beim Wiederherstellen des Normaldruckes bisweilen kleine Fremdkörper, oder auch die eigenen Sporen, in die Trama hineingepresst werden können. Diese Nebenwirkungen können etwas gemildert werden, wenn im Eisbad mit vorgekühlter Fixierlösung entlüftet und der Normaldruck sehr langsam, über 2-3 Minuten, wieder hergestellt wird. Ersteres vermeidet das Kochen, letzteres das stürmische Eindringen der Fixierlösung in die Pilze. Es ist jedoch weitaus besser, das Entlüften ganz zu vermeiden. Die Erfahrung zeigt nämlich, dass es gar nicht nötig ist, die Pilzobjekte rasch (d. h. innerhalb von 1-2 Minuten) mit der Fixierlösung zu durchtränken und dass Luftblasen die Fixierung nicht stören.

Ein oft vergessener Trick, Luftblasen zum Verschwinden zu bringen besteht darin, frisch ausgekochtes und rasch abgekühltes destilliertes Wasser zum Ansetzen der Lösungen zu gebrauchen. Das Auskochen treibt die im Wasser gelöste Luft grösstenteils aus, und die im Objekt enthaltene Luft wird dann im Fixiermittel aufgelöst. Es ist aber nötig, dass das Volumen der Fixierlösung etwa 50-100mal grösser ist als jenes der Objekte, und dass das Fixiergefäss ganz mit Aldehydlösung aufgefüllt wird, so dass (fast) keine Luft mit eingeschlossen wird. Anstelle des Auskochens kann das Wasser auch mit einem Vakuum (Wasserstrahlpumpe) während 5 Minuten entgast werden. Die Pilze sinken in entgasten Lösungen nicht sofort unter, doch signifikant rascher, als in nicht entgasten.

### Gasfixierung

Es mag auf den ersten Blick befremden, dass lufthaltige Pilzobjekte ohne entlüftet zu werden auf der Aldehydlösung schwimmend fixiert werden können. Glutaraldehyd und Formaldehyd sind aber flüchtige Substanzen, die auch als Gase gut fixieren. Und da die Aldehyde den Luftraum über der Fixierlösung und bald einmal auch die Luft in den Blasen sättigen, werden die nicht benetzten Pilzteile ebenfalls gut fixiert.

Die trockene Gasfixierung mit Osmiumtetroxiddämpfen wird seit langem dort eingesetzt, wo nasse Fixierung die Strukturen zerstören würde, wie z.B. bei der Präparation der trockenen Konidienketten von *Penicillium* für die Untersuchung mit dem Rasterelektronenmikroskop. Die trockene Gasfixierung mit Aldehyden ist weniger geläufig, hat aber in unseren Testen erstaunlich gute Resultate geliefert. Sie zeichnet sich durch zwei Eigenschaften aus: erstens bleiben oberflächliche Schleime (z.B. auf Pilzhüten) sehr scharf begrenzt erhalten, während sie in Flüssigfixierung oft ausgewaschen werden und dadurch die Oberfläche weniger scharf gezeichnet erscheint; und zweitens sind die gasfixierten Stücke im Schnitt oft intensiver färbbar, wohl weil bei der Flüssigfixierung einige Substanzen ausgelaugt werden (es wurden keine Versuche gemacht, diese Annahme zu prüfen).



Figur 1: Anordnung zur Fixierung in Aldehyd-Gas.

Zur Gasfixierung wird ein Wattebausch mit einem Gemisch gleicher Volumenteile konzentrierter Formaldehydlösung und 50%iger Glutaraldehydlösung befeuchtet und in einen Plastikbehälter von etwa 20 ml Fassungsvermögen gebracht. Es hat sich die Anordnung der Figur 1 bewährt. Die Pilzstücke werden in die Aldehydgase gelegt und bei Raumtemperatur während 6-24 Stunden fixiert. Sie werden dabei nicht gehärtet. Anschliessend werden sie in eiskaltes Methoxyäthanol überführt, dem 2-3% Glutaraldehyd beigefügt werden können, falls der Verdacht einer ungenügenden Gasfixierung besteht. In unseren Testen war dies aber nie der Fall.

Um die Vorteile der Gasfixierung, besonders die Erhaltung oberflächlicher Schleime nicht in Frage zu stellen, dürfen die gasfixierten Objekte nicht mit wässrigen Lösungen nachbehandelt werden.

Weiche und schlaffe Pilze (z.B. *Pluteus*-Arten) eignen sich weniger für die Gasfixierung als feste, wie Russulaceen oder Porlinge. Die Objekte sollen möglichst klein sein.

### Fixierung in gepufferten Aldehydlösungen

Diese werden alle im folgenden **Cacodylatpuffer** angesetzt:

Vorratslösung:	Natrium-Cacodylat	21,40 g
	HCl 1n	12,6 ml
	Dest. Wasser	ad 100,0 ml

Zum Gebrauch 1:20 verdünnen. Wird dadurch 0,05 m bei pH 6,9.

- 1) Fixierung mit Glutaraldehyd 5% in Cacodylatpuffer, Raumtemperatur, 12-24 h, ohne zu entlüften.

Herstellen der Fixierlösung:

Destilliertes, frisch entgastes Wasser	42,5 ml
Cacodylatpuffer, Stammlösung	2,5 ml
Glutaraldehydlösung 50%	5 ml

Die meisten Autoren ziehen es vor, im Eisbad zu fixieren, da bei diesen Temperaturen das Cytoplasma visköser ist und weniger zu Artefakten neigt. Wie die Erfahrung aber zeigt, ist dies für die Lichtmikroskopie nicht nötig. Da die meisten Pilze auf der Fixierlösung schwimmen und da, wie oben besprochen, die Pilze nicht mit Vakuum entlüftet werden sollen, muss der Effekt der Gasfixierung voll ausgenützt werden. Dies ist bei Raumtemperatur besser der Fall als im Eisbad.

Um die Pilze besser zu benetzen, kann der Aldehydlösung 0,1% eines Netzmittels zugefügt werden (z.B. Triton X-100). Dies beschleunigt zwar das Untersinken nur unbedeutend, aber offene Hohlräume, wie der Raum zwischen den Lamellen, schliessen bedeutend weniger Luftblasen ein.

- 2) Auswaschen nicht nötig. Aus der Fixierlösung kann das Objekt direkt in wasserfreies Methoxyethanol übertragen werden (Eisbad).

#### ENTWÄSSERN UND EINBETTEN

Eine der besten und bequemsten Entwässerung erfolgt mit wasserfreiem Methoxyethanol im Eisbad (FEDER & O'BRIEN 1968). Dabei sind keine Zwischenstufen nötig. Danach kann bei Raumtemperatur das Methoxyethanol mindestens einmal gewechselt werden. Die Stücke können anschliessend direkt weiter verarbeitet oder jahrelang im Methoxyethanol bei -10 bis -20 °C aufbewahrt werden.

Vor dem Durchtränken mit dem Methacrylatgemisch müssen die Stücke im Methoxyethanol auf Raumtemperatur gebracht werden. Dabei ist das Methoxyethanol mindestens einmal zu wechseln. Daraus kommen sie bei Raumtemperatur direkt in das Methacrylatgemisch (mit zugesetztem Katalysator). Dieses wird zweimal erneuert. In jeder Stufe bleiben kleine Objekte (grösste lineare Ausdehnung höchstens etwa 2 mm) 15-20 Minuten, grössere 2-12 Stunden. Schwer durchdringbare Stücke können im Kühlschrank wochenlang durchtränkt werden. Dann werden sie in neuem Gemisch in Gelatinekapseln oder Polyäthylenkapseln bei 50°C während 12-16 Stunden vorpolymerisiert (dadurch wird die Blasenbildung verhindert) und anschliessend bei 60-65°C auspolymerisiert. Nach etwa einem Tag sind die Blöcke hart genug, um zersägt und mit einem *harten* Epoxidharz (z.B. Araldit "Standard", nicht "Rapid") auf einen Holzblock geklebt zu werden. Danach wird der Epoxidharz bei 60-65°C eine weitere Stunde gehärtet. Es schadet nichts, die Blöcke bis 2 Tage lang im Ofen zu lassen, sie bleiben immer gut schneidbar, wenn auch bei langer Polymerisationszeit Schnitte über 20 µm oft Probleme mit sich bringen.

In der Regel ist es nicht nötig, nach dem Entwässern mit Methoxyethanol die von FEDER & O'BRIEN (1968) angegebene Reihe von verschiedenen

Alkoholen zu durchlaufen, aber es mag sein, dass sehr zartes Material dadurch besser erhalten bleibt, weshalb sie hier wiederholt wird: Aus Methoxyaethanol kommen die Stücke nacheinander in wasserfreies Aethanol, n-Propanol und n-Butanol, immer im Eisbad. Aus dem Butanol kommt das Material bei Raumtemperatur direkt in das Methacrylatgemisch (mit zugesetztem Katalysator).

Manche Pilze (z.B. *Hydnum repandum* und *Ramaria stricta*) sind reich an Stoffen, die eine einwandfreie Polymerisation des Methacrylatgemisches erschweren. Es hat sich aber herausgestellt, dass diese Stoffe mit Methoxyaethanol, Aceton, Alkoholen oder den Methacrylaten selbst grösstenteils extrahiert werden können. Deshalb sollte das Methoxyaethanol, die eventuell vorhandenen Zwischenmedien (Aceton, oder die Alkoholreihe von FEDER & O'BRIEN) und das Einbettgemisch je mindestens einmal, bei grösseren Stücken gar zwei- bis dreimal gewechselt werden.

Das Monomergemisch besteht aus:

Butyl-Methacrylat	18,5 g
Glycol-Methacrylat	64,5 g
Aethylenglycoldimethacrylat	1,0 g
Diaethylenglycolmonobutylaether	14,0 ± 2,0 g

Der Weichmacher Diaethylenglycolmonobutylaether gestattet, die Härte der Blöcke dem Pilzmaterial und der Schnittdicke anzugleichen. Für harte Pilze und dünne Schnitte eignen sich Gemische mit weniger, für dickere Schnitte solche mit mehr Weichmacher.

Das Gemisch ist ohne Katalysator im Kühlschrank monatelang haltbar. Die vom Hersteller zugefügten Stabilisatoren brauchen nicht entfernt zu werden. Vor dem Gebrauch wird im Monomergemisch 0,15% *a,a'*-Azoisobutyronitril aufgelöst, das als Katalysator wirkt. Das katalysatorhaltige Gemisch bleibt bei 3-4° C mindestens 3 Wochen dünnflüssig. Dies erlaubt lange Arbeitszeiten, die es ermöglichen, auch grössere Stücke von dichten Fruchtkörpern (Porlinge) vollständig zu durchtränken. Es ist etwas wasserträglich, so dass Wasserspuren nicht stören. Zudem können die Glaswaren leicht mit warmem Wasser gereinigt werden.

Der Katalysator *a,a'*-Azoisobutyronitril kann nicht durch Bis(2,4-dichlorobenzoyl)peroxid (=“Luperco”) oder durch Benzoylperoxid ersetzt werden. Diese haben die unangenehme Eigenschaft, die Anfärbbarkeit der Pilzzellen rasch zu vermindern. Der Effekt wird zuerst an den exponierten Stellen wie Lamellenschneiden und Basidienscheiteln sichtbar, die sich oft einfach nicht mehr färben lassen.

Die Zusammensetzung des Methacrylatgemisches erklärt sich wie folgt: Schnitte von polymerisiertem Butylmethacrylat sind gegenüber wässrigen Lösungen inert und bleiben selbst in stark sauren Lösungen formstabil. Sie

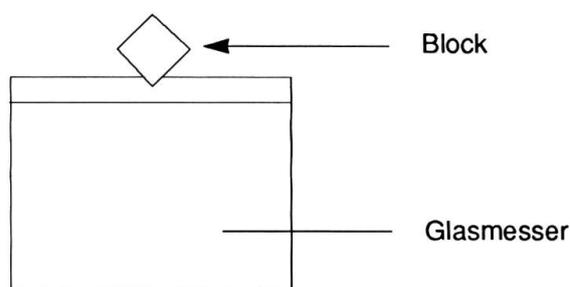
quellen aber stark in Xylol und ähnlichen Flüssigkeiten, die zur Herstellung der Eindeckmittel (Entellan) verwendet werden. Das Glycolmethacrylat hat entgegengesetzte Eigenschaften, die Schnitte quellen in wässrigen Lösungen, sind aber in Xylol formstabil. Es wurde nun ein Gemisch gesucht, das sowohl in Wasser, als auch in Xylol formstabil ist, indem sich die Effekte der beiden Methacrylate aufheben. Das oben angegebene Verhältnis von 18,5 : 64,5 wird dieser Forderung weitgehend gerecht. Das Aethylenglycoldimethacrylat ist ein weiterer Stabilisator (HOTT & MARIE 1987), der nicht nur die Schnitte gegenüber den Farblösungen und den Lösungsmitteln noch unempfindlicher macht, sondern der auch die Schneidfähigkeit der Blöcke verbessert. Das Gemisch aus den drei Methacrylaten ist aber ausserordentlich hart und für dickere Schnitte kaum geeignet. Deshalb wurde der Weichmacher Diaethylenglycolmonobutylaether beigefügt, dessen optimale Konzentration recht hoch scheint. Seine minimale Konzentration liegt aber bei 12 g, seine höchste bei 16 g in der oben genannten Zusammensetzung. Die niedrigere Konzentration gibt harte Blöcke, die sich dünner schneiden lassen, die höhere Konzentration gibt weichere Blöcke für dickere Schnitte.

#### SCHNEIDEN UND AUFKLEBEN

Die Blöcke werden mit Diamant- oder Glasmessern ("Ralph knives") trocken geschnitten, d.h. sie werden nicht auf einer Wasseroberfläche aufgefangen. Die hohe Weichmacherkonzentration sorgt für eine gewisse Gleitfähigkeit der Schnitte auf dem Messer. Das Gemisch ist weich genug, dass mit einem Glasmesser mehrere Blöcke geschnitten werden können. Die Schneidbarkeit des Blockes ist ausgezeichnet bei einer Schnittdicke von 5-10  $\mu\text{m}$ , und sie ist gut von 2-5  $\mu\text{m}$  und von 10-20  $\mu\text{m}$ . Über 25  $\mu\text{m}$  kann der leere Plastik gut geschnitten werden, aber die eingeschlossenen Pilze beginnen manchmal zu splintern. Geschnitten wird unter ständiger Beobachtung mit einer Binokularlupe. Je langsamer geschnitten wird, desto weniger verformen sich die Schnitte, da die neue Schnittfläche mehr Zeit hat, um mit der Luftfeuchtigkeit ins Gleichgewicht zu kommen.

Im Gegensatz zur Paraffintechnik ist es besser, die Blockkanten nicht parallel, sondern um etwa 45° gedreht zur Messerschneide zu richten (Fig. 2). Die Plastikmasse ist so weich, dass die obere Kante eines parallel zum Messer montierten Blockes vom Messerdruck verformt (aufgeworfen) wird, was zu fehlerhaftem Schneiden und zu Messerschäden führen kann, besonders bei grossflächigen Blöcken. Der um 45° gedrehte Block verhindert dies.

Die Schnitte werden einzeln vom Messer mit einer Pinzette abgehoben und entweder direkt auf einen grossen, aber flachen Tropfen einer 0,1%igen Lösung des Weichmachers in dest. Wasser auf einem Objektträger gelegt, oder in einer Petrischale aufbewahrt. Langes Aufbewahren (mehrere Wochen) in der Petrischale verändert das Verhalten der Schnitte etwas. Während sich



**Figur 2:** Orientierung des Blockes zur Verhinderung eines Staues mit anschliessender Verformung im oberen Teil des Blockes. Durch die Anordnung in einem Winkel von etwa  $45^\circ$  zur Messerkante können auch grössere Blöcke in weicherem Plastik geschnitten werden.

frische Schnitte rasch und bereits bei Raumtemperatur ausbreiten, ist bei älteren Schnitten ein Erwärmen auf etwa  $50-60^\circ\text{C}$  nötig. Nach dem Ausbreiten wird die überschüssige Lösung abgegossen und die Schnitte mit einer Nadel im verbleibenden Flüssigkeitsfilm orientiert. Falls die Schnitte vorher erwärmt wurden, muss damit gewartet werden, bis die Präparate wieder Raumtemperatur angenommen haben, da warme Schnitte sehr empfindlich sind. Die Schnitte sind nach dieser Behandlung meist nicht geglättet, sondern nur ausgebreitet. Das Pilzmaterial ist in der Regel etwas gewellt, und diese Wellen können beim Trocknen zu störenden Falten zusammenbacken. Dies kann durch Auftropfen von 6%igem n-Propanol verhindert werden. Das Propanol muss sogleich nach dem Abgiessen der ersten Flüssigkeit aufgetropft werden, bevor die Schnitte antrocknen, und es muss *auf* die Schnitte, nicht daneben getropft werden. Das Propanol weicht die Einbettmasse auf und macht sie klebrig. Nach 1-3 Minuten sind die Schnitte geglättet, und das überschüssige Propanol wird abgegossen. Anschliessend lässt man die Schnitte bei  $60-70^\circ\text{C}$  trocknen. Dabei kleben sie fest an die Glasoberfläche. Spezielle Klebemittel sind nicht erforderlich, ausser man beabsichtigt, die Schnitte mit starken Laugen zu behandeln.

#### FÄRBEN DER SCHNITTE

Es soll daran erinnert werden, dass ungefärbte Schnitte im Phasenkontrast oft hervorragende Bilder liefern, wodurch ein Färben überflüssig wird. Muss doch gefärbt werden, etwa für Kurszwecke, so stehen einige Methoden zur Verfügung, die weiter unten beschrieben werden.

Alle Farblösungen sollten von Zeit zu Zeit filtriert werden, am besten indem sie mit einer Injektionspritze durch ein Membranfilter gepresst werden.

Das Elektronenmikroskop zeigt, dass nach gelierender Fixierung und Harzeinbettung alle Organellen erhalten bleiben, aber diese sind im Lichtmikroskop *bei Pilzen* nur mit Mühe darstellbar. Sogar die Färbung der Kerne stösst auf Schwierigkeiten, da in der Regel eine fast gleichmässige Allgemein-

färbung des Zellinhaltes auftritt. Bei rein plectologischen Untersuchungen, wie etwa beim Studium der Hyphenanordnung in einer Lamellentrama im Laufe der Fruchtkörperentwicklung, stört dies nicht, für cytologische Arbeiten jedoch ist es natürlich nicht zulässig. Es gibt mehrere Möglichkeiten, sowohl plectologisch als auch cytologisch befriedigende Anfärbung eines Schnittes zu erhalten. Dazu gehören Differenzierungen nach einer Allgemeinfärbung, Beizungen, Oxidationen und Hydrolysen. In einer späteren Arbeit wird auf diese Methoden eingegangen.

### Entfärben der Plastikmasse

Das Methacrylatgemisch färbt sich mit vielen Farbstoffen an, mit einigen jedoch nur schwach oder gar nicht. Eine schwach gefärbte Plastikmasse beeinträchtigt zwar die mikroskopische Beobachtung nicht wesentlich, stört aber bei Demonstrationspräparaten, von denen erwartet wird, dass das Objekt auf ganz farblosem Hintergrund erscheint. In vielen Fällen ist es möglich, den **farbigen Hintergrund mit n-Propanol zu entfärben**, indem die *völlig trockenen* Schnitte während 1-20 Minuten bei Raumtemperatur in absolutem Propanol geschwenkt werden. Es ist nicht nötig, das handelsübliche Propanol noch nachzutrocknen. Andererseits bewirken schon einige wenige Prozente Wasser ein Quellen und Wellen der Schnitte. Dies tritt auch dann ein, wenn noch wasserfeuchte Schnitte in Propanol getaucht werden.

Die gefärbten Pilze widerstehen meist der Entfärbung mit Propanol, besonders wenn sie mit den unten beschriebenen Methoden mit Amidoschwarz oder mit Hämatoxylin behandelt wurden.

### Färbung mit Amidoschwarz

Amidoschwarz 10B 0,05% in 7%iger Essigsäure (CLARK 1987, modifiziert).

Gefärbt wird entweder bei Raumtemperatur während mindestens 30 Minuten (besser 1-2 Stunden), oder bei 60-65° C während 10-15 Minuten. Anstelle der Essigsäure kann eine 0,1%ige Lösung von **Oxalsäure** oder eine 9%ige Lösung von **Milchsäure** verwendet werden. Plastikmasse bleibt ungefärbt.

Nach der Färbung werden die Schnitte mit Wasser, dann mit dest. Wasser gespült und luftgetrocknet oder mit einer andern Farblösung gegengefärbt.

Amidoschwarz ist eine Proteinfärbung, so dass (fast) alle Zellbestandteile gefärbt werden, insbesondere das Cytoplasma, die Kerne und Nukleolen. Dagegen bleiben die Hyphenwände weitgehend ungefärbt oder sie färben sich nur schwach.

Anschliessend an Amidoschwarz kann mit den unten beschriebenen Hämatoxylin-Färbung nachgefärbt werden, wodurch besonders schöne Bilder erhalten werden. Die Umkehrung der Färbereihenfolge ist nicht möglich.

### Hämatoxylinfärbungen

Bei den hier bevorzugten Hämatoxylinfärbungen werden die Schnitte durch mindestens zwei, meist aber mehrere Bäder geführt. Das Prinzip der Färbung beruht auf der Bildung eines Farblackes aus Hämatoxylin und einer Beize. Wie schon seit langem bekannt (vgl. ROMEIS, 1968 und die dort zitierte Literatur), entstehen je nach Beize unterschiedliche Farbtöne, und da die verschiedenen Beizen von den einen oder anderen Teilen des Schnittes verschieden stark aufgenommen werden, kommt es zudem noch zu einer gewissen Differenzierung des Färbeergebnisses. Nach Eisenbeize gibt das Hämatoxylin eine graue bis schwärzliche Allgemeinfärbung, nach Zirkonbeize werden bevorzugt Hyphenwände und Gallerten malvenfarben, und nach Molybdänbeize färbt sich Zellinhalt satt blau. Andere Resultate werden durch Umkehrung der Reihenfolge erzielt, wenn also die Schnitte zuerst mit dem Hämatoxylin und anschliessend mit einer Beizlösung behandelt werden, und noch einmal anders fällt die Färbung aus, wenn darauf erneut ein Hämatoxylinbad folgt. Schliesslich kann das Färbeverhalten durch eine Vorbeize mit Tannin und durch eine Nachbehandlung mit einer leicht alkalischen Lösung (z. B. Natriumkarbonat) nochmals weitgehend beeinflusst werden.

Die benötigten Lösungen sind:

a) Schwache Hämatoxylinlösung:

Destilliertes Wasser	100 ml
Hämatoxylin	0.1 g

Diese Lösung ist sofort gebrauchsfertig und lange haltbar, wird aber mit der Zeit dunkler. Frische Lösungen färben die Plastikmasse nicht an, ältere, dunklere Lösungen färben die Plastikmasse gelb bis bräunlich. Diese Anfärbung kann jedoch leicht mit Propanol entfernt werden.

b) Starke Hämatoxylinlösung:

Destilliertes Wasser	90 ml
Hämatoxylin	500 mg
Natriumjodat	100 mg

Diese Lösung ist sofort gebrauchsfertig und lange haltbar. Sie färbt bedeutend kräftiger als die Lösung a), aber auch die Plastikmasse wird stärker angefärbt. Diese kann jedoch mit Propanol wieder entfärbt werden.

c) Eisenbeize:

Destilliertes Wasser	100 ml
Oxalsäure	1 g
Eisen(III)chlorid	5 g

Diese Lösung ist jahrelang haltbar und eignet sich auch zur Beizung bei 50

- 60° C. An Stelle des Eisenchlorides kann *nicht* das üblichere Eisenammoniumsulfat (= Eisenalaun) verwendet werden, da es bei der erhöhten Temperatur rasch zerfällt.

d) Zirkonbeize:

Destilliertes Wasser	100 ml
Zirkonylchlorid	10 g

Diese Lösung ist jahrelang haltbar und eignet sich auch zur Beizung bei höheren Temperaturen.

e) Molybdänbeize:

Destilliertes Wasser	100 ml
Ammoniummolybdat	1 g

Diese Lösung ist jahrelang haltbar und eignet sich auch zur Beizung bei höheren Temperaturen.

f) Natriumkarbonatlösung:

Destilliertes Wasser	100 ml
Natriumkarbonat	0,1 g

Auch diese Lösung bleibt monatelang gebrauchsfähig. Sie dient zum Umtönen der Hämatoxylinfärbungen, die dadurch oft kräftiger werden.

**Eisen-Hämatoxylin, modifiziert**

- 1) Die Schnitte werden in der Eisenbeize c) bei 60-65° C während 10 Minuten oder bei Raumtemperatur während 30-60 Minuten gebeizt.
- 2) Die Schnitte werden in mehrmals gewechseltem destilliertem Wasser während mindestens 5 Minuten bei Raumtemperatur gespült.
- 3) Färben bei 60-65° C während 10 Minuten oder bei Raumtemperatur während 30-60 Minuten in der schwachen Hämatoxylinlösung a)  
*ODER:* Färben bei Raumtemperatur während 20-30 Minuten mit der starken Hämatoxylinlösung b).
- 4) Spülen in destilliertem Wasser und lufttrocknen der Schnitte auf einer Heizplatte oder im Brutschrank bei etwa 60-70° C.
- 5) Falls nötig wird die Plastikmasse mit absolutem Propanol entfärbt, was bis 20 Minuten in Anspruch nehmen kann.

Die dunkelgraue bis schwarze Farbe der Eisenhämatoxylinfärbung kann durch folgende Nachbehandlung in einen blauen bis dunkelblauen Farbton umgewandelt werden, aber Gallerten werden dadurch entfärbt:

- 6) Eintauchen in eine 0,1%ige Lösung von Natriumcarbonat während 30 bis 60 Sekunden, Raumtemperatur.

7) Spülen in destilliertem Wasser, lufttrocknen.

Dies ist eine schöne Allgemeinfärbung, die auch die Hyphenwände darstellt. Sie ist besonders nach *vorhergehender* Färbung mit Amidoschwarz angezeigt.

### Zirkon-Hämatoxylin

1) Die Schnitte werden in der Zirkonbeize d) bei 60-65° C während 10 Minuten oder bei Raumtemperatur während 30-60 Minuten gebeizt.

2) bis 5) wie für die Eisen-Hämatoxylinfärbung.

In diesem Fall werden bevorzugt **Zellwände und Geflechtsgallerten** malvenfarbig. Die Färbung kann auch nach *vorangehender* Färbung mit Amidoschwarz angewendet werden.

### Molybdän-Hämatoxylin

1) Die Schnitte werden während 30-60 Minuten bei Raumtemperatur in der Molybdänlösung e) gebeizt

2) bis 5) wie für die Eisen-Hämatoxylinfärbung.

Dies ist eine besonders kräftige, dunkelblaue Färbung, vor allem des Zellinhaltes. Hyphenwände und Gallerten erscheinen blass ocker.

### Weitere Färbungen

In unserem Labor wurden einige Dutzend verschiedene Farbstoffe auf ihre Verwendbarkeit geprüft, und eine ganze Reihe gab ermutigende Resultate, über die in einer kommenden Arbeit berichtet werden soll. Hier seien nur einige Farbstoffe angegeben, die den Pilz leuchtend rot auf farblosem Hintergrund darstellen.

**Kernechtrot**, gesättigte Lösung in 5%igem Aluminiumsulfat, 30 Minuten bei Raumtemperatur.

Herstellung der Lösung: 1 g Kernechtrot wird in 100 ml 5%iger, wässriger Aluminiumsulfatlösung während 10-15 Minuten gekocht. Nach dem Erkalten wird filtriert.

Trotz des Names dieses Farbstoffes werden nicht nur die Kerne, sondern das ganze Cytoplasma klar gefärbt, nicht aber die Hyphenwände und die Gallerten. Die Einschlussmasse bleibt ungefärbt.

**Mercurochrom**, 2% in destilliertem Wasser, 30 Minuten bei Raumtemperatur.

Diese vor allem als Desinfektionsmittel bekannte Substanz gibt sehr klare und leuchtend rote Plasmafärbungen ohne dass Hyphenwände oder Gallerten dargestellt werden. Die Einschlussmasse bleibt ungefärbt.

**Azocarmin B** oder **Azocarmin G**, 1% in 1%iger Essigsäure, 30 Minuten bei Raumtemperatur.

Resultat wie bei Kernechtrot oder Mercurochrom, doch mit einem mehr karminroten Farbton. Die Einschlussmasse bleibt ungefärbt.

**Pyronin B**, 0,01% in 0,1%iger Borsäure in destilliertem Wasser färbt im Gegensatz zu den vier bereits genannten Farbstoffen vor allem die Hyphenwände und die Geflechtsgallerten und lässt den Zellinhalt praktisch farblos. Die Einschlussmasse bleibt ungefärbt. Färbedauer 30-60 Sekunden bei Raumtemperatur. Besonders angezeigt nach der oben angegebenen Eisen-Hämatoxylinfärbung, da diese in der borsäuren Pyroninlösung differenziert wird, so dass vor allem die Kerne gut zur Darstellung kommen.

### EINDECKEN

Die gefärbten Schnitte werden luftgetrocknet. Milde Wärme schadet nicht, höhere Temperaturen hingegen können Färbungen abschwächen oder gar zerstören.

Die trockenen Schnitte werden mit einem Tröpfchen Xylol befeuchtet, mit Entellan und mit einem Deckglas bedeckt. Die Plastikmasse hat nicht den gleichen Brechungsindex wie Entellan, so dass Schadstellen, etwa von Messerscharten, nicht verschwinden. Sie stören besonders im Phasenkontrast.

Dicke Schnitte über 15 µm zeigen bisweilen (fast) submikroskopische Spalten, besonders entlang von Hyphenwänden oder Basidienwänden. Diese treten bei zu raschem Schneiden auf, stören aber nicht, da sie weder die Anatomie noch die Cytologie verändern. Werden solche Schnitte in gewöhnlicher Weise eingedeckt, so werden diese Spalten durch ihre optische Aktivität sichtbar, indem ihre Oberflächen, auch wenn sie sich berühren, als Spiegel wirken. Durch längeres Eintauchen der gefärbten Schnitte in Xylol können diese Spalten mit Xylol gefüllt werden, was das Eindringen des Eindeckmittels ermöglicht. Dadurch werden die Spalten repariert und unsichtbar. Es ist gelegentlich nötig, die Schnitte bis zu einer Stunde mit Xylol zu behandeln.

### VERWENDETE SUBSTANZEN

Zum Herstellen der Fixierlösung:

Formaldehyd: handelsübliche konzentrierte Lösung

Glutaraldehyd: 50%ige wässrige Lösung, Fluka Art. 49629

Natrium-Cacodylat: Dimethylarsinsäure Natriumsalz (Trihydrat)

Merck-Schuchardt Art. 820670

Salzsäure, HCl 1n: Titrisol, Merck Art. 9970

Triton X-100: Merck Art. 12298

Zum Entwässern:

Aethanol, absolut, pro analysi: Merck Art. 983

Methoxyäthanol: Äthylenglykolmonomethyläther pro analysi, Merck Art. 859  
 n-Propanol, pro analysi: Merck Art. 997  
 n-Butanol, pro analysi: Merck Art. 1990

Zum Einbetten:

Äthylenglycoldimethacrylat: Merck-Schuchardt Art. 818847  
*a,a'*-Azoisobutyronitril: Merck-Schuchardt Art. 12431  
 Butyl-Methacrylat: Methacrylsäurebutylester für die Elektronenmikroskopie,  
 Merck Art. 12242  
 Diaethylenglykolmonobutyläther: Merck-Schuchardt Art. 803129  
 Glycolmethacrylat: Methacrylsäure-2-hydroxyäthylester, Fluka 64170

Zum Färben:

Essigsäure, Milchsäure, Oxalsäure, Natriumkarbonat und Tannin:  
 handelsübliche Substanzen.  
 Aluminiumsulfat-18-hydrat: reinst, Ph. Eur.  
 Amidoschwarz 10B: Merck Art. 1167  
 Ammoniummolybdat: Ammoniumheptamolybdat-Tetrahydrat pro analysi,  
 Merck Art. 1182  
 Azocarmin B und G: gebraucht wurden zwei Substanzen, die seit Jahren ohne  
 Quellenangaben in unserem Institut aufbewahrt wurden.  
 Borsäure krist., pro analysi Merck Art. 165  
 Eisen(III)chlorid: Hexahydrat, p.a., Merck Art. 3943  
 Hämatoxylin: Merck Art. 4305  
 Kernechtrot: Chroma Gesellschaft Nr. 1A 402  
 Mercuriochrom: Mercuridibromfluorescein, Merck Art. 5997  
 Natriumjodat: Merck Art. 6525  
 Pyronin B: Chroma Gesellschaft Nr. 11 412  
 Zirkonylchlorid: Zirkon(IV)-oxidchlorid pro analysi, Merck Art. 8917

Zum Eindecken:

Xylol: handelsübliche Substanz  
 Entellan: Merck Art. 7961

## BIBLIOGRAPHIE

- Baker, J. R., 1958: Principles of Biological Microtechnique. - Methuen, London.  
 Clark, G. (edit.), 1987: Staining Procedures. 4. Aufl. Biological Stain  
 Commission. Williams & Wilkins, Baltimore, London.  
 Feder, N. & T. P. O'Brien, 1968: Plant microtechnique: Some principles and  
 new methods. - Amer. J. Bot. 55: 123-142.  
 Hott, M. & P. J. Marie, 1987: Glycol methacrylat as an embedding medium for  
 bone. - Stain Technology 62: 51-57.  
 Romeis, B., 1968: Mikroskopische Technik. Oldenburg Verlag, München.