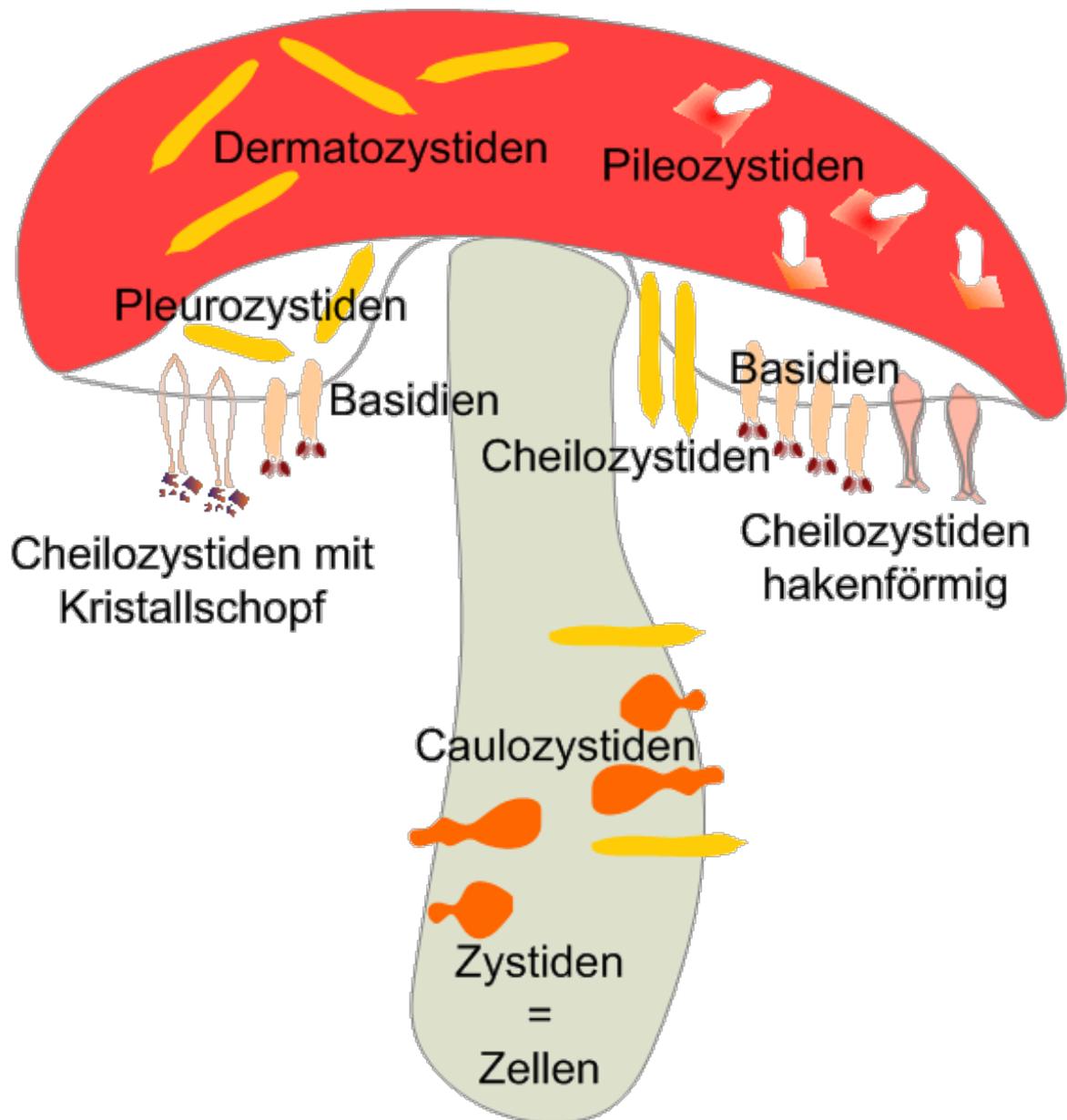


# Pilz-Mikroskopie

Einführungskurs von Walter Engler

Verein für Pilzkunde Bremgarten und Umgebung



Bremgarten / AG, Januar und Februar 2016

[www.pilzverein-bremgarten.ch](http://www.pilzverein-bremgarten.ch)

## 1. Allgemeine Grundlagen zur Biologie der Pilze

Pilze werden, zusammen mit den Bakterien, (Viren), Algen, Flechten, Moosen und Farnen zu den Kryptogamen (= die im Verborgenen, Geheimen „*kryptos*“ heiraten „*gamein*“) gezählt. Sie gehören somit zur Gruppe der ältesten Lebewesen auf der Erde – vor den Samenpflanzen und den Tieren.

Sie sind heute allerdings nicht mehr Teil des Pflanzenreichs, da sie kein Chlorophyll ausbilden und somit nicht zur Photosynthese befähigt sind. Sie bilden ein eigenes **Reich der Pilze**.

Ihre Zellwände bestehen meist aus Chitin, das in der Pflanzenwelt nicht vorkommt und sie bilden auch niemals Stärke als Reservestoff.

Von den Tieren (mit denen sie nach heutiger Auffassung näher verwandt sind) grenzen sie sich durch den Aufbau der Zellen ab, der denen der Pflanzen entspricht (mit Vakuolen und Zellwänden).

Generell unterscheiden wir in der Mykologie (Wissenschaft der Pilze) zwischen **Basidiomyceten** (Ständerpilzen) und **Ascomyceten** (Schlauchpilzen), wobei sich diese Unterscheidung nicht auf äussere Merkmale, sondern auf die Bildung der Sporen bezieht.

Bei den **Ständerpilzen** (Röhrlinge und Blätterpilze) wachsen die Sporen auf „Ständern“, den **Sterigmen**, auf den **Basidien** (jeweils 2 oder 4, selten 6), bei den **Schlauchpilzen**, den Nichtblätterpilzen, (also bei Morcheln, Trüffeln, Keulen, Korallen, Becher-, und Bauchpilzen) in „Schläuchen“, den sogenannten **Asci** (meist zu 8, selten 4).

Viele Pilze lassen sich nach **makroskopischen Merkmalen** wie Grösse, Form, Farbe, Geruch und Geschmack, also ihrem Erscheinungsbild sicher bestimmen. Kleinere Arten, aber auch viele Grosspilze, können jedoch nur mit Hilfe des Mikroskops einwandfrei unterschieden werden.

**Mikroskopisch** betrachtet werden die **Sporen**, die **Basidien** oder **Asci**., aber auch andere **Zellen** (z.B. **Zystiden** und **Hyphen**) von den **Lamellen**, von der **Huthaut**, von der **Stielrinde** und des **Fleisches** (der **Trama**) werden nach ihren Formen, ihrer Grösse, ihrer Struktur, ihren Inhalten und eventuell Ornamenten oder Anlagerungen beurteilt.

## 2. Das Mikroskop

Es gibt nicht „**das Mikroskop**“. Man unterscheidet, im Bereich der Licht-Mikroskopie, zwischen Auflicht- und Durchlicht-Mikroskopen und deren entsprechenden Mischformen.

Ein **Lichtmikroskop** ist ein hochwertiges optisches Instrument. Es besteht im Wesentlichen aus zwei Systemen, dem optischen und dem mechanischen System.

Das **mechanische System** dient dazu, die Komponenten des optischen Systems so aufeinander abzustimmen, dass das vergrößerte Bild auf einer Ebene scharf dargestellt werden kann (wie das Fokussieren bei einem Fotoapparat).

Das **optische System** besteht aus den Komponenten **Licht, Objektiv** und **Okular**, die noch durch einen **Kondensator** ergänzt werden können, der das Licht entsprechend bündelt.

Das Licht kann direkt durch eine Glühlampe, eine Halogen- oder LED-Leuchte erzeugt oder über einen Spiegel gelenkt werden. Es kann entweder durch das zu betrachtenden Objekt geführt oder von oben oder seitlich auf dieses auftreffen. Je nach dem spricht man dann von **Durchlicht-** oder **Auflicht-Mikroskopie**.

Um mikroskopieren zu können braucht es aber noch mehr: es braucht den **Menschen**, der das Objekt der Betrachtung entsprechend präpariert und dann seine Beobachtungen durch das Mikroskop auch interpretieren kann. Dazu braucht es eine gewisse Technik und Erfahrung.

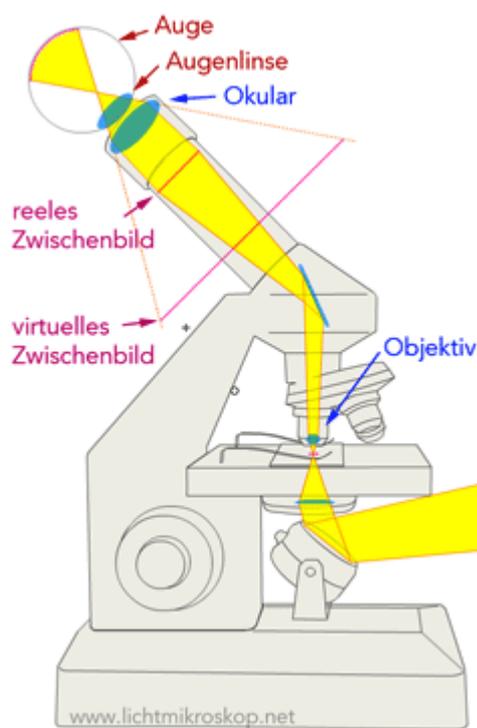
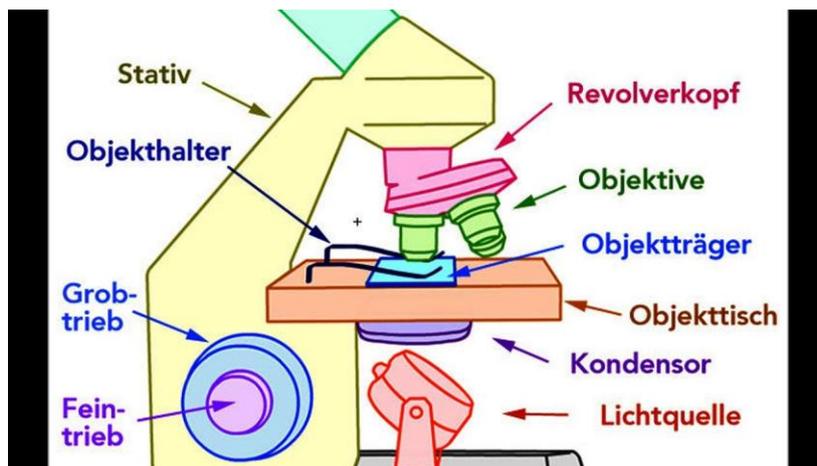
### Das Auflicht-Mikroskop:



Die Stereo-Lupe (auch Stereomikroskop oder Stemi) ist relativ einfach aufgebaut. Wir erreichen in der Regel eine Vergrößerung von 10 – 50fach; je nach Bauart entweder mit einem Zoomobjektiv oder mit verschiedenen Wechselobjektiven. Sie liefert uns ein nicht seitenverkehrtes, aufrechtes 3D-Bild. Das Arbeiten damit ist einfach: Objekt unter das Objektiv legen, Licht darauf und scharf stellen – fertig. Für uns Pilzler dient es vor allem für Übersichtsanalysen und als Hilfsmittel zur Präparation geeigneter Dünnschnitte. Dabei ist es von Vorteil, dass wir zwischen Objekt und Objektiv einen grossen Arbeitsabstand haben. Als günstige Lichtquelle haben sich allgemein die LED „Jansjö-Leuchten“ (IKEA) durchgesetzt.

### Das Durchlicht-Mikroskop:

Ist unser eigentliches Arbeits-Instrument. Der Umgang mit diesem will gelernt sein. Da das Licht durch das Objekt scheinen muss, sollte dieses möglichst transparent aber trotzdem gut strukturiert sein. Also ist entsprechendes Präparieren angesagt. Auch die Lichtführung ist hier wesentlich komplexer. Zwischen Lichtquelle und Objekt kommt noch ein Kondensator mit zusätzlichen Linsen und einer Irisblende hinzu, was höhere Ansprüche an das mechanische System und den Benutzer stellt. Belohnt wird man dann allerdings mit Vergrößerungen bis zu 1000-1250fach, die uns somit auch kleinste Strukturen offenbaren können. Die Abbildungen durch das Okular sind immer seitenverkehrt und stehen auf dem Kopf.



In diesen Zeichnungen wird ein einfaches Durchlicht-Mikroskop gezeigt. Das Licht wird über einen Spiegel durch den Kondensator geführt. Nicht eingezeichnet sind die Irisblende beim Kondensator, der allgemein übliche Filterhalter, der Verstelltrieb für den Kondensator und die (fakultative) Leuchtfeldblende. Üblicherweise haben wir anstelle des feststehenden Objektisches einen sogenannten Kreuztisch mit Verstellmöglichkeiten der x/y-Achsen zueinander oder einen Gleittisch.

Wir haben oben den Fokus auf das **mechanische System** gelegt, mit dem Stativ, dem Grob- und Feintrieb und den entsprechenden Halterungen für das **optische System**

Unten sehen wir den **Lichtstrom** im **optischen System**, wie er uns durch den Kondensator, durch das Objekt und das Objektiv, den Tubus und durch das Okular zu unserem Auge führt.

Das mechanische System besteht aus einem stabilen Stativ mit z.T. verstellbaren Halterungen für die Komponenten des optischen Systems und einem Grob- und Feintrieb zur Fokussierung. Dabei wird der Objektisch zusammen mit dem Kondensator und dem Objekt gegenüber den Objektiven und der Lichtquelle verschoben.

Der **Kondensator** bündelt einerseits den Lichtstrom durch das Objekt zum Objektiv und bildet andererseits das Bild der Leuchtfeldblende und/oder der Lampenwendel ab. Er lässt sich mit einer Irisblende (der sogenannten Kondensator- oder **Aperturblende**) auf gewünschte Weise abblenden. Unterhalb des Kondensators ist meistens noch ein Filterhalter angebracht. Der Kondensator lässt sich in der Regel in der Höhe verstellen (Stichworte: Köhlersche und/oder Kritische Beleuchtung).

Die **Objektive** sind in einem Objektiv-Revolver eingeschraubt und können so leicht in den Strahlengang eingeschwenkt werden. Wir können so Objektive mit verschiedenen Abbildungsmaßstäben nacheinander direkt verwenden. Dieser Abbildungsmaßstab ergibt dann multipliziert mit dem Vergrößerungsfaktor des Okulars die effektive Vergrößerung des Objektes.



Zusammen mit der Maßzahl, dem Abbildungsmaßstab (hier im Bild 100, 40, 10 und 4 - das „:1“ wird weggelassen), sind noch weitere Gravuren auf dem Objektiv zu finden (hier: z.B. 0,10, 0,25, 0,65, 1,25 und 1,30). Das ist die berechnete **Numerischen Apertur (NA)**, das Mass für den Öffnungswinkels, der Auflösung des Objektivs (Vergleichbar mit der Lichtstärke von Objektiven in der Fotografie).

Im Allgemeinen gilt: Schwach vergrößernde Objektive haben eine niedrige Numerische Apertur, eine längere Brennweite, einen grösseren Arbeitsabstand und einen engeren Öffnungswinkel. Hingegen sind Objektive mit hoher Apertur stark vergrößernd, mit kurzer Brennweite, kurzem Arbeitsabstand und haben einen weiten Öffnungswinkel. Weshalb diese Objektive zum Schutz eine flexible/teleskopische Frontlinse haben und in der Regel ab NA 0,95 nur als **Immersions-Objektive** (für Öl, Glycerin oder Wasser) konstruiert sind. Die Numerische Apertur gibt uns einen direkten Bezug zur **Förderlichen Vergrößerung**, die das 1000fache der NA nicht überschreiten soll (im Idealfall bewegt sie sich zwischen dem 500-1000fachen der NA).

Für das praktische Arbeiten mit dem Mikroskop ist noch die Angabe (im Bild 160/0,17 oder 160/-) wichtig. Sie sagt uns, dass das Objektiv für eine Tubuslänge von 160 mm gerechnet wurde und für das Arbeiten mit oder ohne Deckglas (der Dicke 0,17mm) berechnet ist. Im Gegensatz dazu stehen 170/0,17 oder  $\infty/0,17$  für eine Tubuslänge von 170mm (selten, bei älteren Mikroskopen) oder für eine unendlich Optik (alle neueren Mikroskope).

Das **Okular** (oder bei einem Binokular Mikroskop die Okulare) ist das vorletzte Glied in unserem Lichtstrom. Es vergrößert das Zwischenbild, das im Okular entsteht noch um den, auf dem Okular angegebenen, Vergrößerungsfaktor (z.B. 6x, **10x**, 12x, 15x oder 20x). In der Regel 10fach, da wir mit höheren Vergrößerungen leicht über die Förderliche Vergrößerung hinauskommen können. Was zwar für das Auge angenehm sein kann, aber optisch nichts mehr bringt.

Den praktischen Umgang mit dem Mikroskop werden wir in diesem Kurs zusammen üben. Zudem verweise ich auf die Kursunterlagen von Max Müller im Anhang. Insbesondere auf die Kapitel **Beleuchtung**, **Präparat einstellen** und **Pflege des Mikroskopes**.

Wir müssen uns bewusst sein, dass wir mit hochwertigen und teuren Instrumenten arbeiten.

### 3. Doch noch etwas Theorie zur Beleuchtung

Die Qualität der Beleuchtung eines Mikroskopes wird sowohl durch die Helligkeit der Lichtquelle bestimmt, wie auch durch eine korrekte Lichtführung. So vermindert z. B. die Entstehung von Streulicht den Kontrast. Bei der **Köhlerschen Beleuchtung** wird das Streulicht weitgehend unterbunden und das Präparat wird zudem homogen ausgeleuchtet.

Um das zu erreichen muss das Mikroskop über folgende Merkmale verfügen: Einer **Lichtquelle** (nicht über einen Spiegel) mit einer **Kollektorlinse** und einer **Leuchtfeldblende** und einem höhenverstellbaren, zentrierbaren **Kondensor** mit einer **Aperturblende**.

#### Das „Köhlern“:

Die folgenden Schritte müssen für jedes Objektiv und bei jedem Objektivwechsel wieder erneut durchgeführt werden.

- Augenabstand beim Binokular-Tubus richtig einstellen und die beiden Okulare entsprechend scharfstellen (wie bei einem Feldstecher).
- Ein Präparat auf den Objektisch legen und mit Grob- und Feintrieb scharf stellen. Am besten beginnt man mit dem 4:1er oder 10:1er Objektiv. Vorsicht mit dem Grobtrieb bei Objektiven mit grösseren Masszahlen und geringem Arbeitsabstand.
- Leuchtfeldblende vollständig schliessen. Dabei wird irgendwo im Sehfeld ein heller Fleck sichtbar.
- Mit dem Kondensor-Trieb den Kondensor soweit verschieben, bis dieser helle Fleck scharf umrandet ist, d.h. man sieht dann das Abbild der Leuchtfeldblende im Strahlengang scharf gezeichnet.
- Mit den Zentrierschrauben am Kondensor zentriert man nun dieses Bild. Bei einigen Mikroskopen (Wild) wird die Kollektorlinse verschoben bis das Bild der Leuchtfeldblende zentriert ist. Bei Objektiven mit kleineren Masszahlen muss eventuell die Aperturblende am Kondensor etwas geschlossen werden.
- Die Leuchtfeldblende wird nun soweit geöffnet, bis der Blendenring gerade aus dem Sehfeld verschwindet. Damit erreicht man, dass Streulicht grösstenteils eliminiert ist.
- Jetzt muss nur noch die Beleuchtungs-Apertur angepasst werden. Dazu verändert man die Öffnung der Aperturblende (im Kondensor) bis sich aus Auflösung und Kontrasteindruck ein subjektiv optimaler Bildeindruck einstellt. Beim Öffnen erhöht sich die Auflösung und der Kontrast (Schärfentiefe) vermindert sich (beim Schliessen entsprechend umgekehrt). Ideal ist, wenn die Aperturblende nur zu  $\frac{1}{4}$  bis  $\frac{1}{3}$  geschlossen wird. Überprüfen kann man dies, indem man ein Okular entfernt und direkt durch den Tubus schaut.

Bei Mikroskopen, die keine Leuchtfeldblende haben, behilft man sich mit der sogenannten **Kritischen Beleuchtung**. Man fährt mit dem Kondensor ganz nach oben und dann wieder etwas zurück und achtet dabei auf eine möglichst homogene Ausleuchtung.

Mikroskope, die keinen beweglichen Kondensor haben, sind ab Werk optimal eingestellt.

## 4. Präparieren – Methoden, Verfahren

Dafür sind Erfahrung, das nötige Instrumentarium und der Erfindungsgeist des Menschen gefragt. Als **Instrumentarium** brauchen wir:

- Wasser, Alkohol (Ethanol oder Isopropanol, zum Reinigen)
- Präpariermedium (in der Regel Leitungswasser, KOH, Chlorallhydrat, etc.)
- Objektträger und Deckgläser (sauber gereinigt)
- Pipetten
- Präparier-Nadeln oder -Lanzetten
- Pinzetten (davon mindestens eine mit sehr feiner, glatter Spitze)
- Rasierklingen (immer wieder frische, halbieren!)
- Fliesspapier, Filterpapier, Haushaltspapier, Papiertaschentuch
- Farbstoffe und Chemikalien (Melzers Reagenz, Kongorot, etc.)
- Immersions-Objektiv (100:1), Immersions-Öl, Messokular (geeicht)
- Lupe und/oder Stemi

### Die Präparations-Techniken:

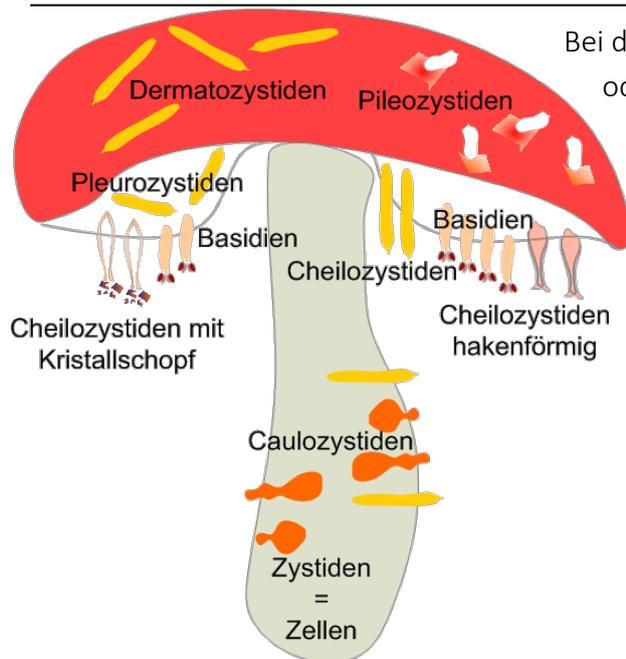
Für alle Präparations-Techniken gilt, dass wir auf einen sauberen Objektträger (OT) einen Tropfen Präpariermedium aufbringen. Das ist, im einfachsten Fall, Wasser, eine geeignete Farbstoff-Lösung oder ein anderes, spezielles Medium.

**Quetschpräparate:** Sind am einfachsten herzustellen. Dazu entnimmt (zupft, schneidet) man ein winziges (!) Stück des zu betrachtenden Materials mit einer Präpariernadel, einer spitzen Pinzette oder wir schneiden es mit einer scharfen Rasierklinge heraus. Als Material eignen sich dazu **Lamellen** oder **Röhren** und das **Fleisch** aus Hut oder Stiel.

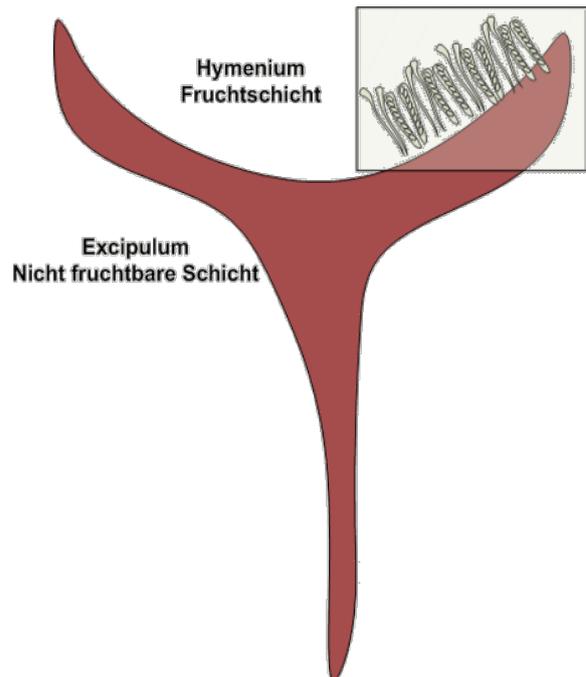
**A)** Wir bringen das so gewonnene Material seitwärts in das Präpariermedium hinein und decken es mit einem sauberen Deckglas (DG) zu. Dazu bringen wir das DG seitlich an den Tropfen Präpariermedium heran, bis sich dieser am DG ausbreitet und senken dann das DG vorsichtig ab. So vermeiden wir, dass sich Lufteinschlüsse unter dem DG bilden können.

**B)** Dieses Präparat bringen wir, direkt - ohne es zu quetschen, auf den Objektstisch unseres Mikroskops und betrachten es mit der kleinsten Vergrößerung (Objektiv 4:1 oder 10:1). Das hilft uns, uns im Präparat zu orientieren (wo ist die Lamellenschneide, die Aussenseite der HDS oder der Stielhaut). Methoden A und B gelten auch für alle der nachfolgend beschriebenen Techniken.

**C)** Dann quetschen wir das Präparat vorsichtig, indem wir z.B. mit einem Radiergummi einen sanften Druck auf das DG ausüben bis das darunter liegende Material ausreichend dünn genug ist. Das austretende Präpariermedium saugen wir mit Fliesspapier weg. Unter dem Mikroskop beginnen wir wieder mit der kleinsten Vergrößerung, steigern diese dann aber, bis wir die benötigten Details erkennen können.

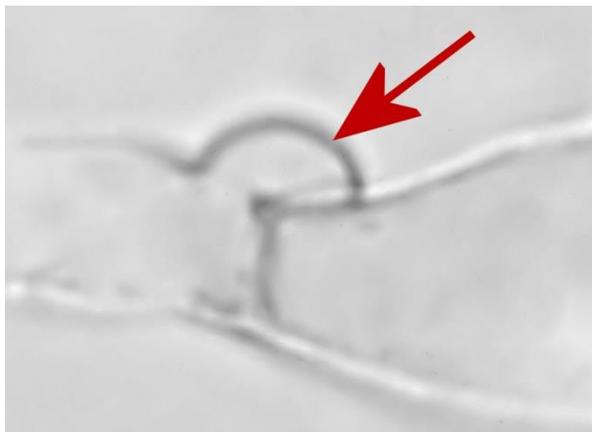


Bei den **Basidiomyceten** beachten wir die **Lamellen** oder **Röhren**, die **Sporen**, die **Basidien**, die **Zystiden**, wie z. B. die **Cheilozystiden** (an der Lamellenschneide), die **Pleurozystiden** (auf der Lamellen- oder Röhrenfläche), die **Dermatozystiden** und **Pileozystiden** (in oder auf der Huthaut) und die **Caulozystiden** (Stiel).



Bei den **Ascomyceten** beachten wir das **Hymenium**, das ist die Fruchtschicht, und da die **Asci** mit den **Sporen** (ein-, zwei- und mehrzellig), die sterilen **Paraphysen** zwischen den Asci und das **Excipulum**.

Bei den **Sporen** beurteilen wir die Farbe (eigentlich nur aussagekräftig bei einem Abwurfpräparat), die **Form**, die **Grösse**, die **Ornamentierung**, die **Oberflächenstruktur** und die chemische Eigenschaft (amyloid oder dextrinoid). Die Grösse wird immer mit Immersions-Objektiv, also bei 1000facher Vergrößerung gemessen.



Auch das **Fleisch** (die **Trama**) aus dem Hut oder dem Stiel kann nach den Methoden A bis C beurteilt werden. Dabei beachten wir das **Hyphensystem**, die Form der Hyphen und ob an den Septen Schnallen sind oder nicht. **Schnallen** sind buckelförmige Auswüchse über den **Septen** (Querwände) der Hyphen der meisten Ständerpilze. Hyphen mit Schnallen werden auch als **knotig septiert** bezeichnet.

Bei der **Huthaut** (der Hut-Deck-Schicht, **HDS**) wird entweder ein Radialschnitt oder ein Oberflächenschnitt gemacht. Bestimmt werden so die **HDS-Typen**, die **Pileozystiden**, die **Endzellen** und die Einlagerung von **Pigmenten**.

Für einen **Radialschnitt** wird entweder der Hutkörper halbiert und dann werden mit einer sehr scharfen Rasierklinge, parallel zur Schnittfläche, dünne Präparate aus dem Hutrand geschnitten. Diese Stücke sollten sehr klein sein, deshalb allenfalls auf dem OT noch etwas zuschneiden. Oder man schneidet mit 2 aufeinander liegenden, Rasierklingen(-hälften) radial durch die Huthaut. Mit etwas Übung gelingt das sehr gut und man erhält in der Regel ein sehr feines Stück HDS zwischen den Rasierklingen, das mit einem feinen Pinsel oder einer Präpariernadel in den Wassertropfen auf dem OT gebracht werden kann. Weiter nach dem Verfahren A bis C.

Der Oberflächenschnitt wird mit einer Rasierklinge parallel und möglichst fein entlang der Huthaut geführt. Oder, falls sich die Haut abziehen lässt und dünn genug ist, diese direkt mikroskopieren. Verfahren wie oben. Augenmerk auf das Vorhandensein von Pigmenten und/oder Filz resp. Haaren.

Mit der **Stielhaut** wird gleich wie mit der Huthaut verfahren. Wahlweise kommen hier aber **Längsschnitte** und/oder **Querschnitte** in Frage (oder beide ausprobieren). Bei diesen Schnitten werden die **Caulozystiden** und das **Stieltrama** beachtet. Durch Abschaben der Stielhaut können wir Schüppchen oder Haare gewinnen.

Auch bei den **Lamellen** kann ein **Querschnitt** gemacht werden. Dieser ist etwas aufwändiger als die bisher beschriebenen Techniken und erfordert einig Übung. Beurteilt wird damit das **Lamellentrama**.

Zuerst wird aus dem Hut grosszügig ein Stück, senkrecht zu den Lamellen herausgeschnitten und mit den Lamellenschneiden nach oben auf einen OT (trocken) gebracht. Aus dem mittleren Teil wird nun ein Stück herausgeschnitten (parallel zu den Lamellen) das etwa 3-5 Lamellen breit ist. Aus diesem Stück werden nun mit einer frischen Rasierklinge äusserst feine Tranchen herausgeschnitten und liegend auf einen frischen OT in einen Wassertropfen gebracht. Deckglas drauf und beurteilen (zuerst möglichst ohne zu quetschen).

### **Die wichtigsten Farbstoffe:**

In der Durchlicht-Mikroskopie haben wir das Problem, dass wir mit äusserst dünnen Schichten von Material arbeiten müssen. Bei Dünnschnitten oder Quetschpräparaten sind die Strukturen, vor allem bei selber farblosem Material, zudem kontrastarm. Hier kann eine Färbung helfen. In der Pilzmikroskopie verwenden wir in der Regel einfache Färbemethoden. Wir verwenden also einzelne Farbstoff-Lösungen, die uns gewisse Details der Probe in charakteristischer Weise anfärben. Als Kontrast-Verstärker kann aber auch einfach **Tinte** verwendet werden.

**Kongorot**, ist ein allgemein gebräuchliches Färbemittel für Zellwände (Septen und Schnallen) und ist einfach in der Anwendung.

**Melzers Reagens**, ist eine jodhaltige Lösung, also kein Farbstoff. Er färbt aber die Ornamente auf den Sporen (*Russula*) und gibt uns Aufschluss über amyloid/dextrinoid. Einfach in der Anwendung. Bei den Ascomyceten werden dafür gerne die **Lugolsche**- oder die **Baralsche**-Lösungen (höherer Jod-Anteil) verwendet. Jod ist aggressiv und färbt Haut braun.

**Baumwollblau** in Milchsäure, dient zum Nachweis der **cyanophilen** Sporen (*Clitocybe*) und färbt die Sporenornamente bei den **operculaten Asci**. Einfach in der Anwendung, jedoch erhitzen (Feuerzeug) oder längeres Stehenlassen.

**Brillantkresylblau**, zum Nachweis der **Metachromasie** bei gewissen Sporen. Aufwendig.

**Toluidinblau**, zum Nachweis **Metachromasie** und vor allem von **gelifizierten Strukturen**. Einfach in der Anwendung.

**Patentblau V**, zum Nachweis von **Chrysozystiden** (*Hypholoma*, *Pholiota*, *Stropharia*, etc.). Einfach in der Anwendung, aber Auswaschen mit konzentriertem Ammoniak und mikroskopieren in Ammoniak.

**Ammoniak** und **Kalilauge** (jeweils 3-5 %ig) dienen dazu Exsikkate wieder aufzuquellen.

**Chlorallhydrat** und **Kalilauge** werden verwendet um die Proben aufzuhellen.

### Die Färbe-Techniken:

Es gibt mehrere Möglichkeiten wie diese Farbstoffe angewendet werden können, je nachdem, ob wir direkt färben oder die Probe zuerst in Wasser (oder einem anderen Medium) begutachten wollen.

1. Bei der direkten Färbung bringen wir einen Tropfen Farblösung (anstelle von Wasser) auf den OT und bringen die Probe seitwärts ein.
2. Falls erhitzt werden soll, erhitzen wir den OT unter der Probe vorsichtig mit einem Feuerzeug, ohne dass sich Blasen bilden.
3. Mit einem Fliessblatt entfernen wir die Farblösung vorsichtig, ohne dabei die Probe zu berühren.
4. Ein Tropfen Leitungswasser (bei Patentblau zuerst mit konzentriertem Ammoniak auswaschen und Ammoniak verwenden!) hinzu geben und mit Deckglas zudecken (seitwärts beginnend).

Bei bereits mit Deckglas zugedeckten Proben wird ein Tropfen der Farblösung seitlich an das Deckglas gebracht und von der gegenüberliegenden Seite das 1. Medium (meistens Wasser) mit Fliesspapier abgesaugt. Die Farblösung zieht dann nach.

Falls der Farbstoff beim Mikroskopieren durch seine Eigenfärbung stört, bringt man einen Tropfen Wasser seitlich an das DG und saugt diesen, wie oben beschrieben ein.

### Das Messen von Sporen und Zellen

Bereits ohne Hilfsmittel ist es möglich, die Größe von Objekten im mikroskopischen Bild abzuschätzen. Hierzu muss zunächst der Durchmesser des tatsächlich überblickten Objektfeldes aus der Sehfeldzahl (Objektfelddurchmesser) des Okulars (meist 18 oder 20mm)

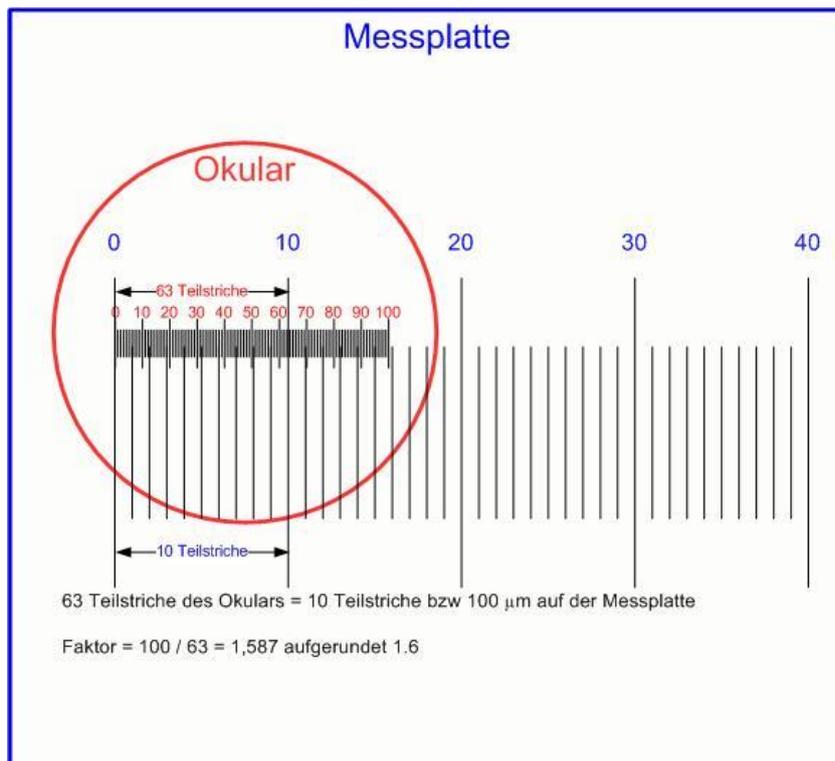
und der Massstabszahl (Abbildungsmaßstab, z. B 40:1) des Objektivs ermittelt werden. Dazu teilt man die Sehfeldzahl durch die Massstabszahl des gerade verwendeten Objektivs.

Um die exakte Größe der Objekte zu bestimmen müssen die Objektive des Mikroskops geeicht (einmalig ausgemessen) werden.

Dazu benötigen wir eine **Messplatte** (das **Objektmikrometer**), das ist ein Objektträger auf dem eine Skala von 1-100 gelasert ist. Diese Skala ist 1mm gross und jeder Teilstrich entspricht somit 10 µm. Dieser, recht teure, Objektträger wird nur für die Eichung benötigt.

Zusätzlich muss ein **Messokular** (das **Okularmikrometer**) mit einem **Messokularplättchen** versehen sein. In dieses runde Glassplättchen ist auf 10 mm eine Skala von 1-100 gelasert. Jeder Teilstrich beträgt also 0,1 mm = 100 µm.

Es gilt nun, für jede Objektiv/Okular Kombination den Umrechnungs-Faktor zu ermitteln!



Dazu bringt man die beiden Skalen zur Deckung (wie im Bild gezeigt hier bei 0:0). Sucht eine weitere geeignete Deckung von Teilstrichen (hier bei 63 Teilstrichen auf dem **Okularmikrometer**). Diese entsprechen 10 Teilstrichen auf dem **Objektmikrometer**, was dann 100µm (10µm X 10) entspricht. Unser **Faktor** ist demnach: 100 geteilt durch 63 = **1,587**. In der Praxis müssen also unsere Messresultate - gemessen mit diesem Messokular und für dieses Objektiv - mit 1,6 multipliziert werden.

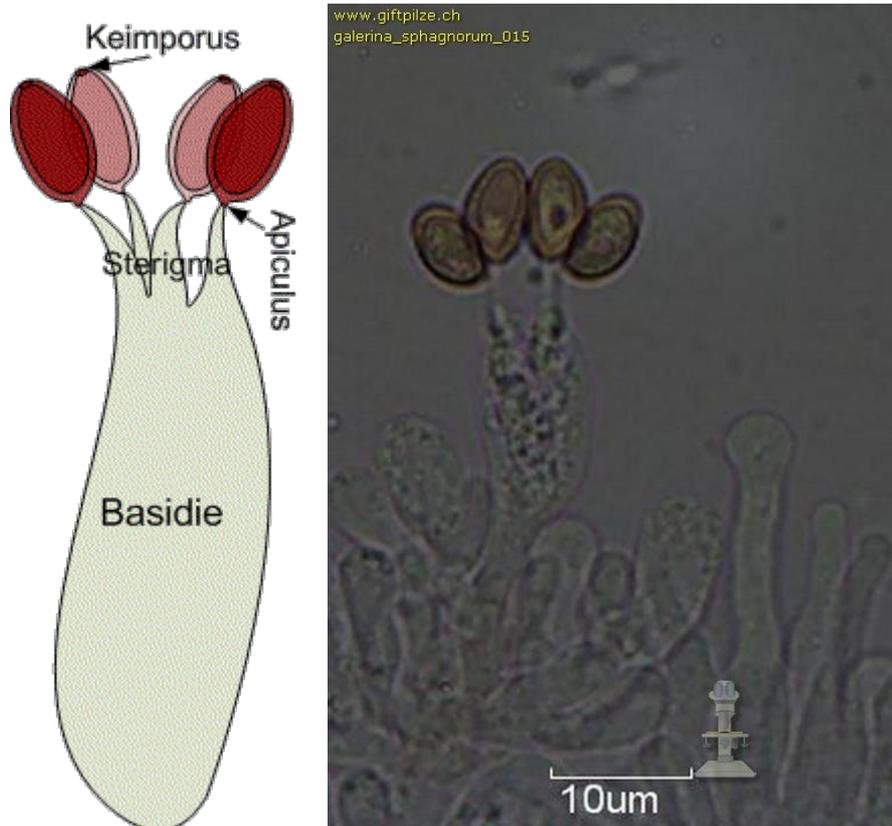
Wenn wir also mit dem Messokular die Länge einer Spore mit 11,2 Teilstrichen messen, so erhalten wir mit dem Faktor 1,6 eine effektive Länge von 17,9µm.

**Größen-Messungen** von Sporen werden nur an **reifen Sporen** vorgenommen, also nur von **Abwurfpräparaten** oder von den Sporen von der Stielspitze. 10 bis 20 Messungen an verschiedenen Sporen. Messungen und Beurteilungen sollten bei 1000facher Vergrößerung (Objektiv 100:1 Ölimmersion) erfolgen. Dabei ist zu beachten, dass die **Länge** und die **Breite** jeweils an der gleichen Spore gemessen werden. Nur liegende Sporen mit sichtbarem Apikulus (Appendix), komplett scharfen Umrissen und ohne die Ornamente mit zu messen. Die Höcker (*Inocybe*) werden aber mit gemessen. Das Resultat wird nicht als Mittelwert von

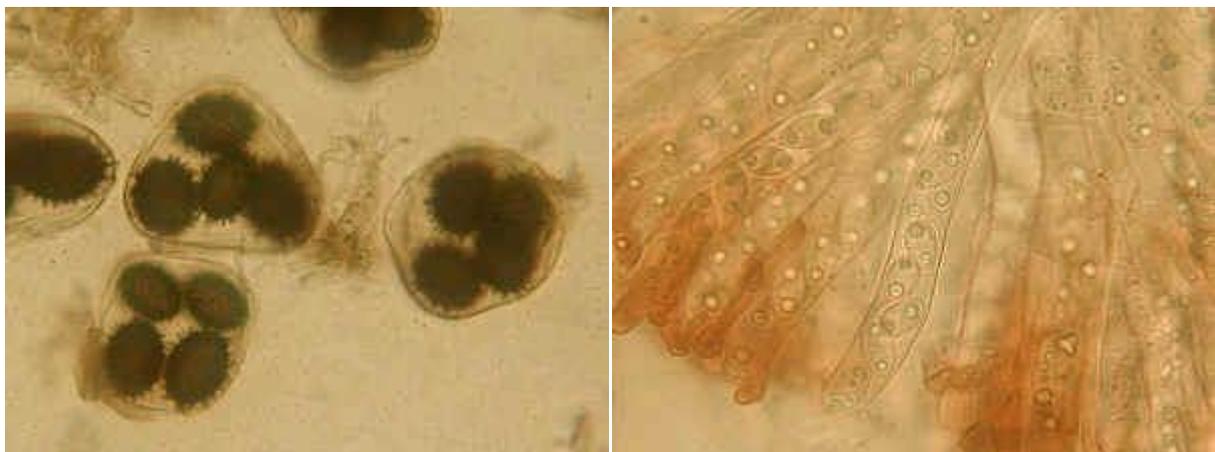
Länge X Breite angegeben sondern, immer mit „von–bis“ Angaben, wobei man die Extremwerte in Klammern angeben kann: (9,4)10-13,4(14) X (3,5)4-5,5(6).

## 5. Was können wir sehen und wie unterscheiden?

Basidiomyceten mit Basidien (Ständer), und Sterigmen mit Sporen



Ascomyceten mit Asci (Schläuchen) und Sporen

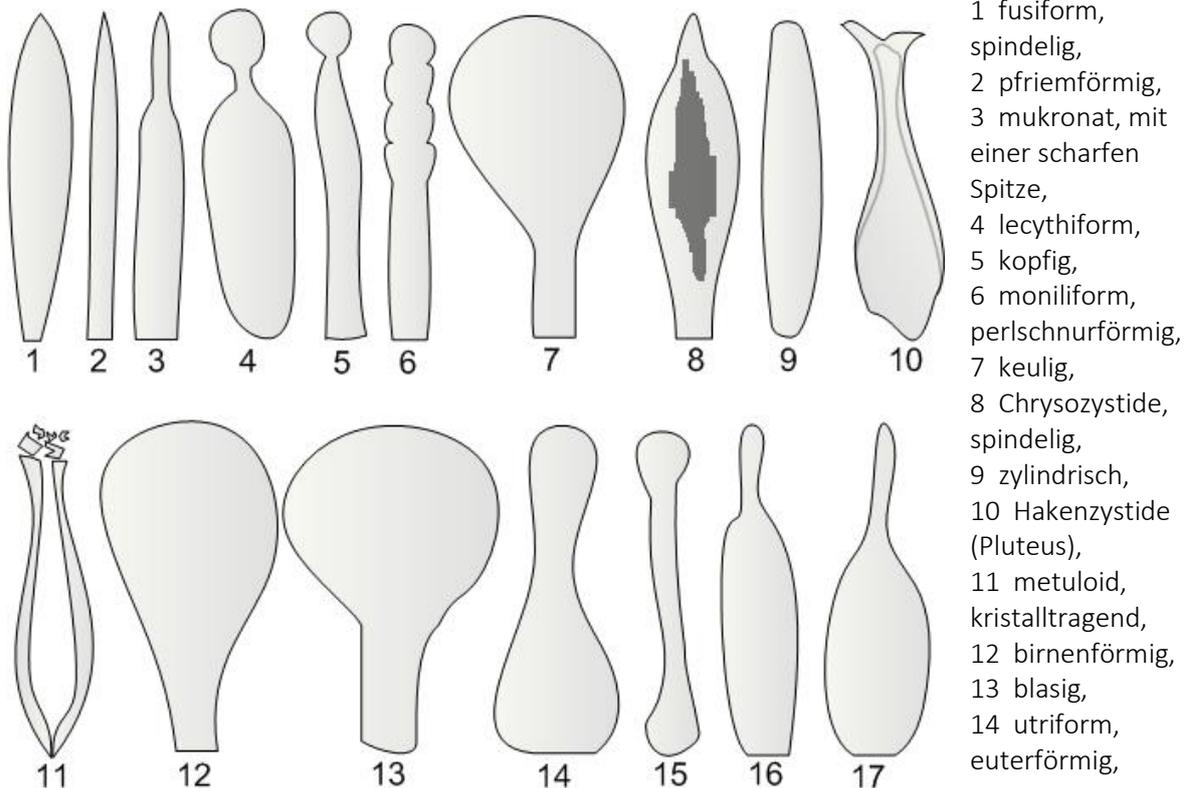


Links: China-Trüffel (*Tuber indicum*),

Rechts: Buchenwald-Becherling (*Peziza avernensis*)

## Zystidenformen:

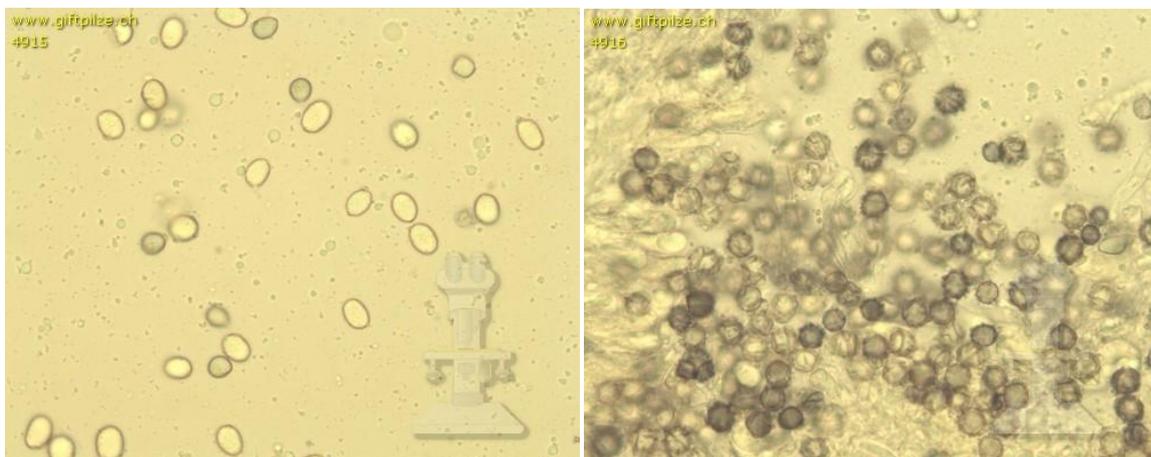
**Zystiden** sind Zellen, die überall im Fruchtkörper des Pilzes vorkommen können. Man unterscheidet sie nach ihrer Herkunft: Cheilo- und Pleurozystiden (Lamellen), Dermato- und Pileozystiden (Huthaut), Caulozystiden (Stiel), Chrysozystiden (Lamellentrame, Hutfleisch bei *Hypholoma*, *Pholiota*, *Stropharia*) und nach ihrer Form:



15 tibiiform, knochenförmig, 16 lageniform, flaschenförmig, 17 geschnäbelt

## Chemische Reaktion an den Sporen:

### Amyloide Sporen (Mit Melzers Reagens)



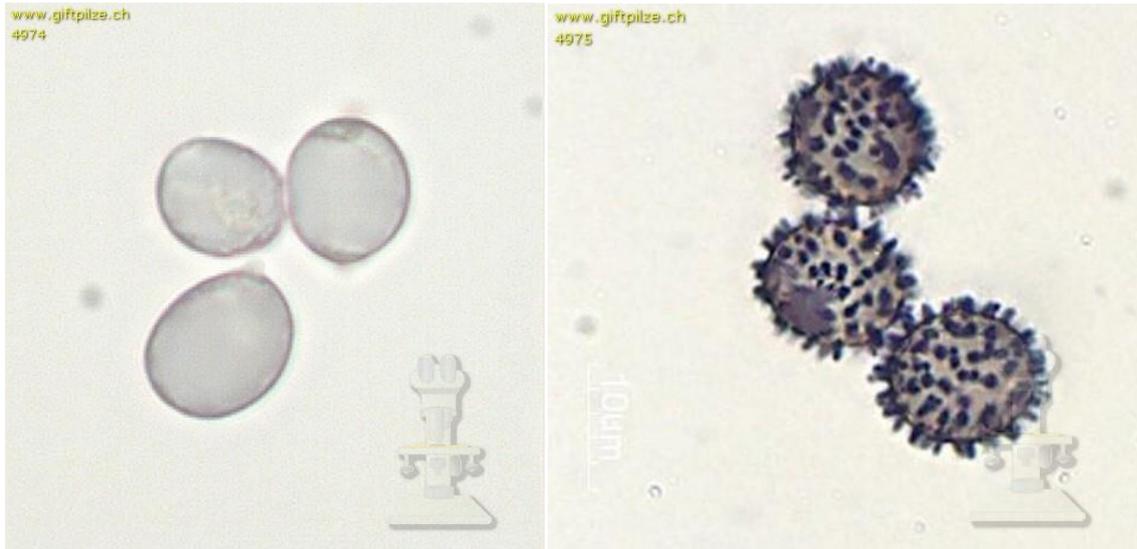
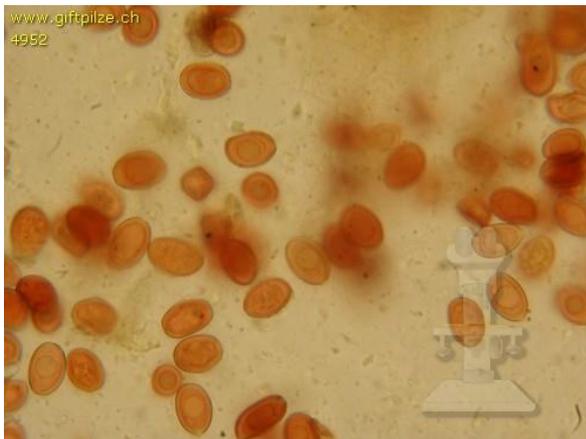


Bild Nr. 4915 Flammer, T - Nicht amyloide *Amanita muscaria* Sporen und amyloide *Amanita phalloides* Sporen; Bild Nr. 4916 Flammer, T - Amyloide *Lactarius* Sporen; Bild Nr. 4974 Flammer, T - Sporen amyloid - *Amanita phalloides*; Bild Nr. 4975 Flammer, T - Sporen amyloid - *Russula* Sporen.

Neben amyloid/nicht amyloid und/oder dextrinoid kann das Melzers Reagens auch zur Sichtbarmachung und Bestimmung der **Ornamentierung** vor allem bei den *Russula Arten* eingesetzt werden.

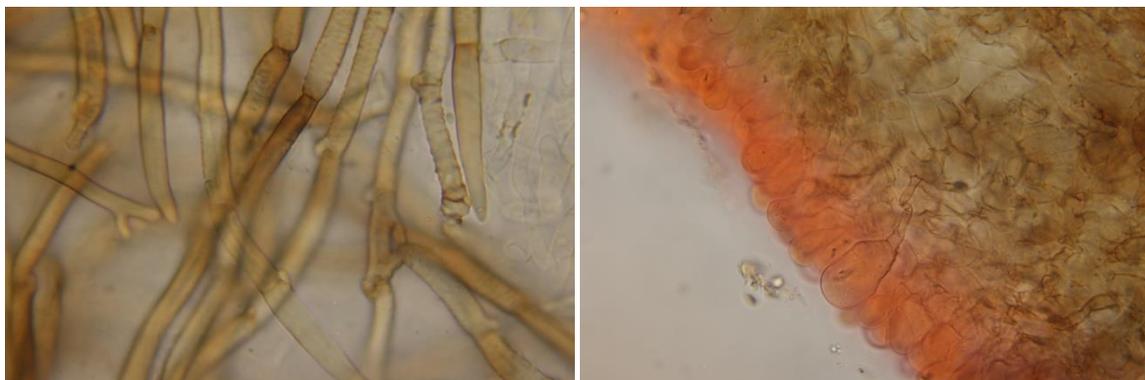
### Dextrinoide Sporen (Mit Melzers Reagens)



Dextrin ist ein wasserlösliches Abbauprodukt der Stärke. Bei dieser Reaktion verfärben sich Teile des Pilzes (Sporen, Trama, Hyphen, Zystiden) orangebraun

**Hyphen der Hutdeckschicht (HDS):** links von *Phaeomarasmium erinaceus* (mit Schnallen, pigmentiert und inkrustiert); rechts

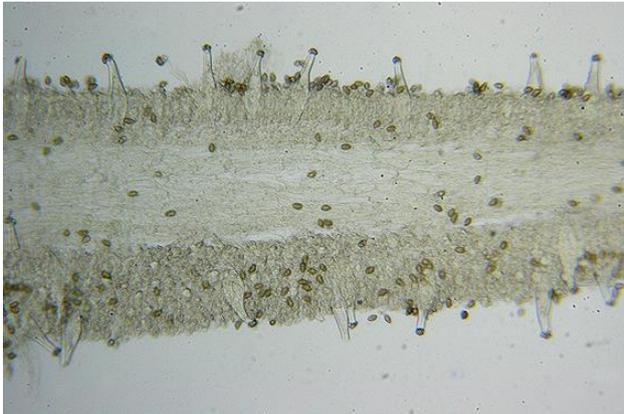
Frühlingsglockenschüppling (Hymeniforme Huthaut)



Der **Hut** besteht von aussen nach innen betrachtet aus der **HDS**, mit der **Epikutis**, der darunterliegenden **Subkutis** und der daran anschliessenden **Huttrama**. Wir unterscheiden 3

HDS Typen: 1. Glatter Hut mit **Kutis** aus dünnfädigen Hyphen, kaum aufgerichtet. 2. **Trichoderm**, mit aufgerichteten haarartigen Hyphen oder **Endzellen** (plüschig bis haarig). 3. **Hymeniderm**, aus blasig-förmigen, keuligen Elementen (an Lamellenschneide erinnernd – glimmrig). Zu beachten sind auch die **Pileozysten**, und allenfalls **Pigmente**.

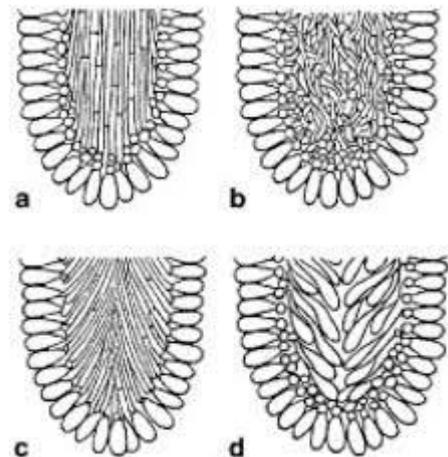
### Lamellentrama:



Wir sehen hier im Zentrum das Lamellentrama (auch **Hymenophoraltrama**) umgeben von der dichteren **Fruchtschicht** mit **Cheilocystiden**, **Basidien** und vereinzelt **Sporen**.

Das Lamellentrama würde ich hier als **regulär** oder **subregulär** bezeichnen, d.h. die Hyphen verlaufen mehr oder weniger parallel zueinander.

Neben **a) regulär/subregulären** (Foto oben und Zeichnung rechts) gibt es noch **b) irreguläre** (unregelmässig verflochten), **c) bilaterale** (von der Mitte zur Fruchtschicht gegen Lamellenschneide verlaufend: **Knollenblätterpilze**) und **d) inverse** (von aussen zur Mitte in Richtung Lamellenschneide verlaufend: **Dachpilze, Scheidlinge**)



## 6. Weiterführende Literatur

- A. Bresinsky, H. Besl: Schlüssel zur Gattungsbestimmung der Blätter-, Leisten- und Röhrenpilze. Regensburger Mykologische Schriften, Bd. 11 (Mikro- und Makro-Schlüssel / Zeichnungen Mikromerkmale)
- A. Bresinsky: Gattungsschlüssel für Blätter- und Röhrenpilze nach mikroskopischen Merkmalen. In Beiheft zur Zeitschrift für Pilzkunde, 1, 1976
- J. Breitenbach; f. Kränzlin: Pilze der Schweiz, 6 Bände (Ausführliche Mikro-Zeichnungen zu jeder Art). 1984-2005
- Heinz Clémenton: Grosspilze im Mikroskop. Beiheft zur Zeitschrift für Mykologie, Band 12, 2012. DGfM
- Bruno Erb, Walter Matheis: Pilzmikroskopie, Kosmos, Stuttgart 1983
- Ewald Gerhardt: Der grosse BLV Pilzfürer (Vereinzelt, gezeichnete Mikromerkmale)
- Erhard Ludwig: Pilzkompandium (Bände 1-3 bisher erschienen; Mikrozeichnungen und gezeichnete Bildbände)
- [www.giftpilze.ch](http://www.giftpilze.ch)
- [www.pilzverein-bremgarten.ch](http://www.pilzverein-bremgarten.ch)
- [www.bachtelpilz.ch](http://www.bachtelpilz.ch)

Für Fragen zum Kurs und diesem Script: [waltiengler@gmail.com](mailto:waltiengler@gmail.com); Fon: 056 631 5728

## 7. Glossar. Speziell für die mikroskopischen Merkmale von Pilzen

Acanthophyten	Hyphenenden mit stacheliger Oberfläche oder bestachelter Spitze (Schichtpilze, Xylobolus)
allantoid	Sporenform: zylindrisch gekrümmt, wurstchenförmig.
amphimitisch	aus Generativ- und Bindehyphen bestehend, auch dimitisch
amyloid	blaue, blaugraue bis violettliche Färbung von Sporen (Ornamente), Hyphen, Asci und anderen Strukturen durch Jod (Melzers Reagens)
apikal	Scheitelständig, an der Spitze befindend (Gegensatz: basal)
Appendix	kurzes Anhängsel, mit dem die Basidiospore am Sterigma angeheftet ist. Siehe auch Apikulus
Apothezium	becher-, kelch- bis scheibenförmige Fruchtkörper der Ascomyceten
Arthrosporen	asexuelle, durch Zerfall von Hyphen gebildete Konidien (Arthrokonidien, Oidien)
Ascomyceten	Schlauchpilze
Ascosporen	in speziellen Schläuchen (Asci) gebildete sexuelle Sporen
Ascus	schlauchförmige Zelle, in der die Ascosporen gebildet werden
basal	unten, am Grunde befindlich (Gegensatz: apikal)
Basidie	mehr oder weniger keulenförmige Zelle im Hymenium der Basidiomyceten
Basidiomyceten	Basidienpilze, Ständerpilze
Basidiosporen	sexuelle Fortpflanzungszellen (Sporen) der Basidiomyceten
bilateral	Lamellentrama, deren Hyphen von der Mitte symmetrisch nach aussen gegen die Hymenialschichten angeordnet sind.
Bindehyphen	mehr oder weniger stark verzweigte, ungerichtete, dickwandige Hyphen, die nicht septiert sind und keine Schnallen enthalten.
Bürstenzellen	Hyphen oder Zystiden mit warzenförmigen Auswüchsen (Mycena)
bitunicat	Ascus mit zweischichtiger Wand
Caulozystiden	Zystiden (sterile Zellen) an der Stieloberfläche
Cheilozystiden	Zystiden an der Lamellenschneide
Chlamyosporen	asexuelle, dickwandige Sporen (Konidien), die durch Abschnürung aus Hyphen entstehen.
Chrysozystiden	Zystiden mit amorphem Farbkörper im Innern, der sich in Patentblau V intensiv blaugrün, sowie in Ammoniak oder KOH gelb färbt (Strophariaceae)
cyanophil	Zellwand, die sich in Baumwollblau blau bis violett färbt (Sporen, Ornamenten, Hyphen)
Cortex	dünne Rindenschicht aus verdichteten Hyphen an der Hutoberseite.
Dermatozystiden	Zystiden auf der Huthaut oder der Stielhaut (nicht mehr gebräuchlich)
dextrinoid	(pseudoamyloid), Sporen, Hyphen oder Zystiden, die sich mit Jod rotbraun bis weinrot färben.
dichotom	gabelig verzweigt
dimitisch	Trama aus zwei Hyphenarten, aus Generativ- und Skelett- oder Bindehyphen.
effus	krustenförmig (resupinat, corticioid), dem Substrat flach aufgewachsene Fruchtkörper ohne Hutkanten und ohne bestimmte Form (Corticaceae).
Epithelium	Anhäufung von rundlichen bis breit elliptischen Zellen, oft in Ketten (Huthaut)
Epithezium	Schicht über dem Hymenium von Discomyceten (scheiben- oder becherförmige Schlauchpilze), von den hervorstehenden Paraphysen gebildet.
Epikutis	die oberste Schicht bei mehrschichtiger Huthaut.
Excipulum	Gewebeschichten von Apothezien
gelifiziert	mit gallertartiger Masse (Hülle) umgeben
Generativhyphen	dünnwandige, oder sklerifizierte, verzweigte und septierte Hyphen mit oder ohne Schnallen.

---

Gloeozystiden	dünnwandige, meist lange Zystiden mit ölhaltigem oder feinkörnigem Inhalt in Hymenium, Trama oder Huthaut.
gloeozystidiale	(-Hyphen, auch oleifere Hyphen) saftführende Hyphen.
Gleba	sporenbildender Teil der Fruchtkörper von Gasteromyceten
Hilardepression	bauchig vertiefte Stelle oberhalb des Appendix (Stielchen) einer Spore (Lepiota ventriospora)
Hymenialsetae	dickwandige, braune, zugespitzte Zystiden im Hymenium der meisten Hymenochaetaceae
Holobasidie	einzellige Basidie
Hymeniform	aus mehr oder weniger keulenförmigen Zellen bestehend, dem Hymenium ähnlich gebaut.
Hymeniderm	
Hymenium	Fruchtschicht, zusammenhängende Schicht von fertilen Zellen (Basidien, Asci), meist durchsetzt mit sterilen Elementen wie Zystiden, Basidiolen, Paraphysen etc.
Hymenophor	vom Hymenium überzogener Teil eines Fruchtkörpers (Lamellen, Leisten, Stacheln, Falten)
Hyphen	fadenförmige Zellen der Pilze
Hyphensystem	die Gesamtheit der Hyphen. (Siehe monomitisch, dimitisch, trimitisch)
Hypodermium	auf zellige Struktur beschränkte Schicht zwischen Epikutis und Hutfleisch. (auch: Subcutis mit hyphiger Struktur).
Hypothezium	Hyphengeflecht unterhalb des Hymeniums eines Apotheziums.
inkrustiert	kristallartige Partikel an der Oberfläche von Zystiden, Hyphen, etc.
inoperculat	Ascus, der sich mit einem Porus öffnet
invers	Lamellentrama, deren Hyphen sich von aussen gegen die Mitte neigen.
irregulär	Lamellentrama. Hyphen verlaufen unregelmässig und wirt durcheinander.
karminophil	siehe: siderophil
Keimporus	verdünnte, abgeflachte Stelle am apikalen Sporende.
Konidien	asexuelle, durch Abschnürung oder Zerfall von Hyphen gebildete Sporen, die zur vegetativen Vermehrung der Pilze dienen.
Kutis	Huthaut, die aus radial angeordneten Hyphen bestehen.
Lamellenschneide	die nach unten gerichtete Lamellenkante
Lamellentrama	das Hyphengeflecht zwischen den beiden Hymenialschichten einer Lamelle (regulär, irregulär, bilateral, invers, untermischt).
Lamprozystiden	dickwandige, spindelförmige Zystiden mit Kristallschopf (Peniophora)
Lacticiferen	dünnwandige, nicht septierte Hyphen mit Milchsaft oder farblosem Saft (Lactarius, Mycena, Hydropus, etc.)
Leptozystiden	dünnwandige Zystiden
Meiosporen	Sporen, die sich nach der Meiose (Reduktionsteilung) bilden (Asco-, Basidiosporen)
Metachromasie	Erscheinung, wenn Sporen, Hyphen, etc. bei der Anfärbung (z.B. Brillantkresylblau) eine andere Färbung annehmen als die Farbstofflösung.
Metuloide	dickwandige Zystiden, teilweise mit Kristallausscheidungen im Hymenium von Basidiomyceten (Inocybe, Pluteus, Geopetalum, Hohenbuehelia).
Mitosporen	asexuelle Sporen (Konidien), die zur vegetativen Vermehrung der Pilze dienen.
moniliform	perlschnurartig
monomitisch	Trama, die nur aus einer Hyphenart besteht (Generativhyphen)
Myzel	Hyphengeflecht der Pilze (im Substrat)
Oleiferen	gloeozystidiale Hyphen mit stark lichtbrechendem Inhalt.
operculat	Ascus apikal mit einem "Deckel" (Operculum) versehen, der sich zur Sporenentleerung öffnet.
Ornament	Skulpturen der Sporen-Oberfläche (Warzen, Stacheln, Rippen, Netz, etc.)

Orthochromasie	einheitliche Färbung durch einen Farbstoff.
Palisadengeflecht	mehr oder weniger keulenförmige bis zylindrische Hyphen an der Hutoberfläche.
Paraphysen	sterile Zellen im Hymenium der Ascomyceten (Farbstoffträger)
Perithezium	Kleiner, rundlicher bis länglicher Fruchtkörper der Pyrenomyceten.
Pileozystiden	Auch: Pilozystiden oder allgemein Dermatozystiden
Plage	deutlich umgrenzte Zone der Sporen über dem Appendix, die bei warzigen Sporen glatt oder nur schwach ornamentiert ist.
Pleurobasidie	sackförmige Basidie, deren Basis seitlich mit generativen Hyphen verbunden ist.
Phragmobasidie	mehr-, meist vierzellige Basidie (Auriculariaceae, Tremellaceae)
Porus	rundliche Öffnung an der Spitze eines inoperculaten Ascus.
Probasidie	rundliche Zelle, aus der später eine Basidie hervorgeht.
pseudoamyloid	dextrinoid
Pseudozystiden	Zystiden, die tiefer in der Trama entspringen. Die echten Zystiden entspringen im Hymenium-Subhymenium.
Ramealis-Struktur	Hyphengeflecht aus unregelmässig verzweigten, korallenähnlichen, warzig-knorrigen und gegabelten Hyphen (Marasmius, Mycena)
regulär	Lamellentrama, deren Hyphen parallel verlaufen
resupinat	rückseitig angewachsener Basidiomycet, der das Hymenium an der Oberfläche trägt.
retikulat	netzartig (Sporenornamente)
Safthyphen	gloeozystidiale Hyphen und Lacticiferen
Sekundärsporen	Teils sporen, die durch Zerfall von Ascosporen entstehen.
Septen	Querwände an Hyphen und Sporen
Setae, Seten	pfriemen- und hakenförmige, braune Zystiden der Hymenochaetaceae.
siderophil	siderophile Granulation. Die Basidien einiger Gattungen zeigen nach der Färbung mit Karminessigsäure und Auswaschen eine dunkel gefärbte Körnelung (Calocybe, Lyophyllum, Tephrocybe)
Skeletthyphen	meist sehr lange, dickwandige, unverzweigte oder nur sehr wenig verzweigte und schmallumige Hyphen ohne Septen und Schnallen.
sklerifiziert	dickwandig gewordene Generativhyphen mit oder ohne Schnallen an den Septen
Sphaerozystiden	rundliche bis kugelige, dünnwandige Zellen in der Trama (Russulaceae), im Velum (Amanita) oder in der Huthaut.
Sporen	Fortpflanzungszellen der Pilze.
Sterigmen	stielartige Auswüchse am Scheitel der Basidien, an denen die Basidiosporen ausgebildet werden.
Stroma	dichtes, steriles Hyphengeflecht, auf dem die Fruchtkörper (Perithezien) sitzen oder in dem sie eingesenkt sind.
Subiculum	spinnwebartiges Hyphengeflecht, als Unterlage von effusen Fruchtkörpern oder Gruppen kleiner Pilze.
Substrat	Nährboden (Erde, Holz, Pflanzenreste) auf denen die Pilze wachsen.
Trama	das Fleisch von Pilz-Fruchtkörpern. Bei Röhren- und Blätterpilzen: Hut-, Lamellen-, Röhren- und Stieltrama.
Trichoderm	Huthaut aus mehr oder weniger aufgerichteten, haarartigen Hyphen.
trimitisch	Hyphensystem aus alle 3 Hyphenarten, den Generativ-, Skelett- und Bindehyphen.
unitunicat	Ascus mit einfacher Wand.
Zystiden	sterile, meist vergrößerte Zellen von verschiedener Gestalt und Funktion im Hymenium, in der Trama sowie in der Hut- und Stielhaut vieler Basidiomyceten.