

DE ASCUS EN DE ASCOMYCETEN: WIE HET KLEINE NIET EERT ...

Gerard J.M. Verkley

Centraalbureau voor Schimmelcultures, Postbus 273, 3740 AG Baarn

Verkley, G.J.M. 1998. The ascus and the ascomycetes: small is beautiful. *Coolia* 41(4): 202-211.

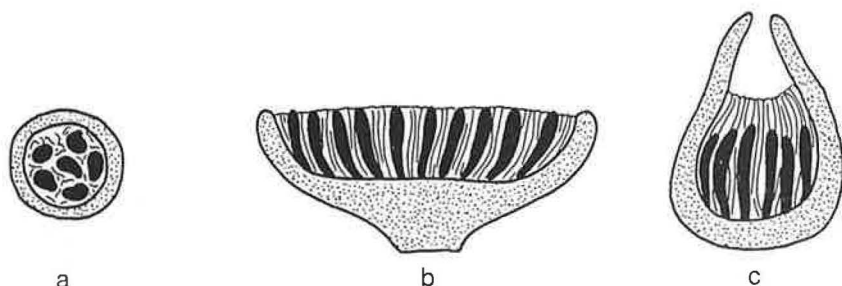
After a brief introduction of the ascomycetes and their main types of fruitbodies, aspects of ascus development and main ascus types are presented to the beginning mycologist. Physiological aspects of ascospore discharge are discussed. The influence of the stage of development and internal pressure, and the use of iodine solutions on some basic features of the ascus are explained.

De ascus is de geslachtelijke voortplantingscel van de ascomyceten of zakjeszwammen, wat officiëler de afdeling Ascomycota. Ascuskenmerken zijn van belang in de taxonomie en worden veelvuldig toegepast in sleutels. Op enkele uitzonderingen na is het dan ook onmogelijk om ascomyceten te determineren zonder een lichtmicroscop. Deze bijdrage is in de eerste plaats geschreven voor beginners. Na een korte inleiding over ascomyceten en hun vruchtlichamen, zullen de belangrijkste fundamentele ascustypen en hun microscopische kenmerken worden behandeld. Maar er komen ook een aantal aspecten van de ontwikkeling van asci aan bod, evenals veranderingen van bepaalde kenmerken die hiermee samenhangen. Met name dit laatste is van nut bij het determineren en wellicht ook voor de gevorderde 'ascokenner' interessant.

Van de inmiddels meer dan 70.000 beschreven soorten fungi behoren ruim 30.000 tot de ascomyceten. Een universeel kenmerk van ascomyceten is dat de vorming van de geslachtelijke sporen of ascosporen *endogeen* is, d.w.z. plaatsvindt binnen de wand van de ascus of 'het zakje' (vandaar: 'zakjeszwammen'; Figuur 2, 3). De basidiomyceten vormen hun basidiosporen *exogeen*, aan steeltjes of sterigmata die op de buitenzijde van het basidium zijn ingeplant (vandaar: 'steeltjeszwammen').

Verreweg de meeste ascomyceten zijn 'microfungi' met vruchtlichamen kleiner dan 1 mm in doorsnede. Overigens zijn er ook ascomyceten zonder echte vruchtlichamen. Sommige veroorzaken ernstige ziekten bij planten, of zijn om andere redenen van economisch belang. Alleen de 'macrofungi' die tot de ascomyceten behoren zijn opgenomen in het 'Overzicht' (Arnolds & al., 1995). Daaronder zijn bekende ascomyceten als de morieljes (*Morchella* spp.) en bekerzwammen (*Peziza* spp.) van de orde Pezizales, evenals sommige vertegenwoordigers van de schijfjeszwammen uit de orde Leotiales (Helotiales), bijv. de Groene glibberzwam (*Leotia lubrica*), en de Aardtongen van het geslacht *Geoglossum*.

De vruchtlichamen van ascomyceten worden *ascomata* of *ascocarpen* genoemd (enkelvoud *ascoma* resp. *ascocarp*). De verscheidenheid in vorm is verbazend groot, maar globaal kan men de volgende ascoma-typen onderscheiden (Figuur 1):

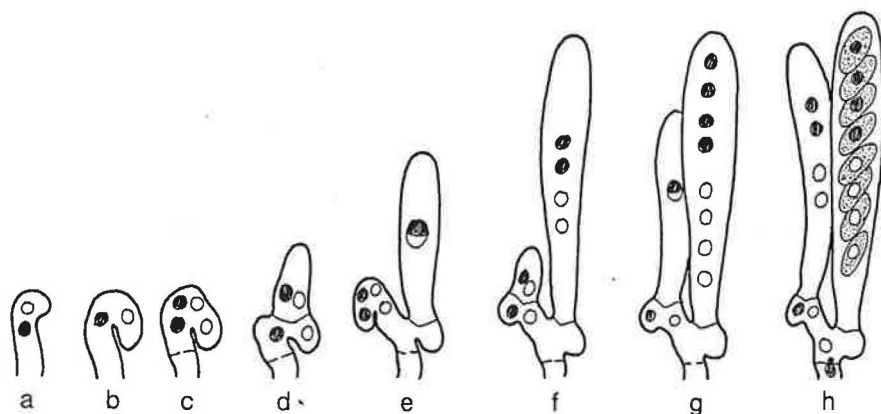


Figuur 1. Vruchtlichaamttypen van de ascomyceten. a. cleistothecium, b. apothecium, c. perithecium. Hymenium (gestreept), met asci (zwart), omgeven door ascomawand of peridium (gestippeld).

1. het *cleistothecium*, een gesloten bolvormig vruchtlichaam zonder voorgevormde opening (Figuur 1a);
2. het *apothecium*, een (vroeg of laat) open schijf- of bekervormig vruchtlichaam, met of zonder steel (discomyceten of 'discocarpe' ascomyceten; Figuur 1b);
3. het *perithecium*, een bol- tot flesvormig vruchtlichaam met een nauwe, voorgevormde opening aan de top (pyrenomyceten of 'pyrenocarpe' ascomyceten; Figuur 1c).

Een aantal pyrenomyceten vormen hun peritheciën binnen een massa van steriele cellen, het *stroma*. Sommige soorten maken opvallende, samengestelde vruchtlichamen die voornamelijk bestaan uit stroma met meerdere erin verzonken peritheciën. Voorbeelden hiervan zijn de Geweizwam (*Xylaria hypoxylon*), de kogelzwammen (*Hypoxylon* spp.), en de Rupsendoder en truffelknotszwammen (*Cordyceps* spp.). Bij andere soorten is het stroma verzonken in het substraat, meestal plantenmateriaal. Een bijzondere groep zijn de loculoascomyceten met bitunicate asci (zie pag. 207), waarvan de stromatische perithecium-achtige vruchtlichamen *pseudotheciën* worden genoemd (bijvoorbeeld *Leptosphaeria*). Aardtongen (*Geoglossum*) lijken oppervlakkig op truffelknotszwammen, maar hebben enkelvoudige vruchtlichamen die zijn afgeleid van het apothecium.

Het aantal asci per vruchtlichaam verschilt van één, zoals bij bepaalde soorten van *Erysiphe* (Echte meeldauw), tot vele duizenden, zoals bij bepaalde bekerzwammen. De asci worden meestal omgeven door steriele hyfen, die bij apotheciën en peritheciën *parafysen* worden genoemd. Het hymenium wordt omgeven door de ascomawand, het *peridium* (Figuur 1). Bij apotheciën noemt men deze veelal *excipulum* of *receptaculum*.



Figuur 2. Ontwikkeling van twee asci uit één ascogene hyfe (zie tekst). Kernen van compatibele mycelia zwart (+) of wit (-); versmolten kern half zwart en wit.

De ontwikkeling van de ascus

De geslachtelijke voortplanting bij ascomyceten begint wanneer twee compatibele mycelia (een + en een - individu) letterlijk de hyfen ineenslaan voor de vorming van een vruchtlichaam. In het hart van het ascoma ontstaan één of meer grote cellen, de *ascogoniën* (enkelvoud: *ascogonium*) met kernen van beide individuen. Vervolgens groeien uit het ascogonium meerdere *ascogene hyfen*, waardoorheen + en - kernen migreren.

De uiteinden van de ascogene hyfen buigen om tot haken (Figuur 2a). In iedere haak komen een + en een - kern naast elkaar te liggen en deze delen gelijktijdig (Figuur 2b,c). Dit resulteert in twee paar kernen. Nu wordt het bovenste kernpaar door de aanleg van een scheidingswandje in een zogenaamde ascus-initiaalcel afgescheiden van het andere paar (Figuur 2d). De initiaalcel groeit daarop verder uit om haar uiteindelijke vorm als ascus te bereiken. De twee kernen van de initiaalcel versmelten (Figuur 2e) en ondergaan daarna eerst een reductiedeling (meiose), resulterend in vier kernen (Figuur 2f), meestal gevolgd door een gewone deling (mitose), resulterend in acht kernen (Figuur 2g).

Hierop worden de kernen elk samen met een portie celvocht van de ascus 'verpakt' in twee overelkaar liggende membranen, de 'dubbelmembraan'. Niet al het celvocht wordt gebruikt. Celvocht dat overblijft heet *epiplasma*. De wanden van de ascosporen ontstaan doordat zich wandmateriaal tussen de twee membranen ophoopt. Zowel het plasma van de ascospore zelf als het epiplasma zouden dit materiaal leveren.

De meeste soorten vormen acht ascosporen, met elk één kern (Figuur 2h). Bij sommige soorten delen de kernen nog één of meer keren, zodat 16, 32, 64, 128 of nog meer sporen worden gevormd. Bij weer andere degenereren vier van de acht ascosporen, of worden de sporen meerkernig. Ook komt het voor dat ascosporen overgaan tot de vorming van talloze, veel kleinere secundaire sporen (veelal ascoconidiën genoemd). Zoals in Figuur 2c-h is te zien, kan één enkele ascogone hyfe meerdere asci maken. Een tweede haak wordt al gemaakt voordat de eerste ascus is volgroeid.

De haken aan de basis van de asci, in de literatuur aangeduid als *crozier*, zijn niet altijd duidelijk te zien. Bij sommige soorten van *Hymenoscyphus* worden ze helemaal niet gevormd.

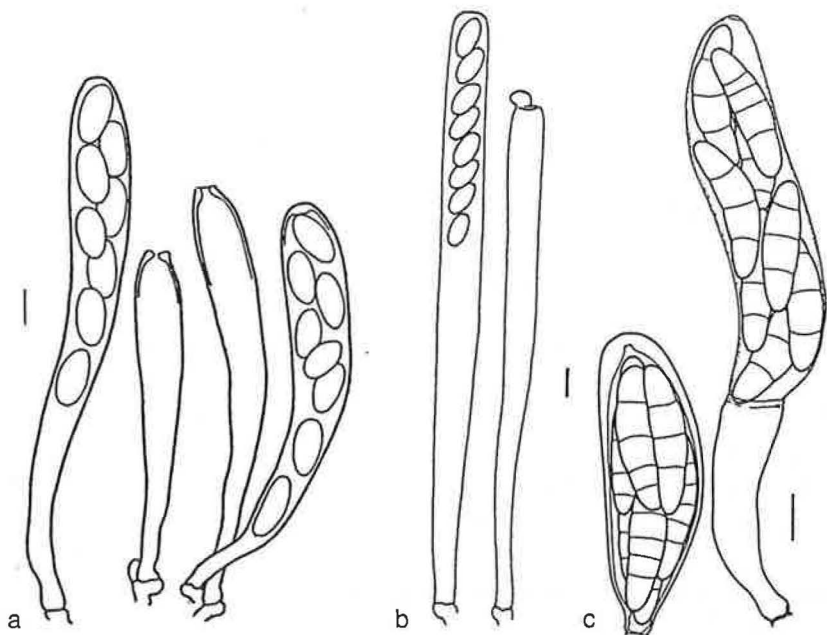
Ascustypen

Taxonomisten hebben een grote verscheidenheid in vorm en openingswijze van asci beschreven. Het is niet mogelijk die hier allemaal te behandelen en ik beperk mij derhalve tot de meest voorkomende, min of meer klassieke typen: de prototunicate ascus, de unitunicate ascus en de bitunicate ascus.

Prototunicate ascus. Asci van dit type zijn meestal bolvormig en kunnen hun sporen niet schieten. De ascuswand vergaat zodat de ascosporen vrij komen te liggen in het vruchtlichaam, meestal een cleistothecium. Beide andere typen kunnen sporen weggeschieten en zijn hiertoe in bijzondere mate aangepast.

Unitunicate ascus. Dit type heeft een enkelvoudige wand, die tijdens het schieten functioneert als één geheel. De wand is opgebouwd uit twee lagen, een relatief dunne en starre buitenlaag, en een dikkere, flexibele binnenlaag. Met elektronenmicroscopie is vastgesteld dat de laatste veelal ook nog uit verschillende sublaagjes bestaat. In waterpreparaten onder de lichtmicroscopie zien we de buiten- en binnenlaag alleen als ze dik genoeg zijn en voldoende in dichtheid verschillen. De sporen van verreweg de meeste unitunicate asci worden onder gunstige omstandigheden onder hoge interne druk weggeschoten. De sporen verlaten de ascus via een gespecialiseerd apparaatje in de ascustop. De asci van de ondergrondse truffels (*Tuber*) zijn eveneens unitunicaat, maar hebben geen apparaat (meer) en kunnen niet (meer) schieten. Twee typen zullen hieronder nader worden bekeken: de operculate ascus van de bekerzwammen (Pezizales) en de inoperculate ascus van o.a. de schijfzwammetjes (Leotiales of Helotiales).

1. *Operculate ascus.* Dit type ascus is kenmerkend voor de orde Pezizales of 'operculate discomyceten' (o.a. bekerzwammen en morieljes). In de top van de ascus bevindt zich een dekseltje of *operculum*, dat openklapt als de sporen worden weggeschoten (Figuur 3b). Bij veel soorten is dat dekseltje even dun als de omliggende wand en zowel voor als na het schieten moeilijk te zien. Bij de Rode kelkzwam (*Sarcoscypha coccinea*) is dat echter geen probleem, daar de wand in de ascustop, die sterk verdikt is, precies rondom het operculum is ingesnoerd. De top van operculate asci kan bedekt



Figuur 3. a. Unitunicate, inoperculate asci van Beukeschorsbekertje *Pezicula carpinea* (Pers.) Tul. & C. Tul., meest links levend en maximaal gespannen, rechts dood, middelste twee leeggeschoten, b. unitunicate, operculate asci van *Peziza* sp., links levend en maximaal gespannen; rechts leeggeschoten, c. bitunicate asci van *Rhodographis filicinus*, links rijp, voor opening, opgeweekt; rechts, na eerste stap van opening, endotunica volledig uitgeschoven. Maatstreepjes = 10 μm .

zijn met een gelatineuze laag of *periascus*. Bij de bekerzwammen van het geslacht *Peziza* kleurt die laag blauw met jodium, terwijl de wand zelf niet kleurt.

2. *Inoperculate ascus* (van schijfzwammetjes, Figuren 3a, 4). De plek in de wand waar de pore onstaat als de ascus opengaat is gemarkeerd door een karakteristieke, min of meer elastische ring of *annulus*. Deze ring is ingebed in een verdikt gedeelte van de wand, de apicale verdikking. Dit geheel wordt het apicaal- of topapparaat genoemd. De ring van veel soorten kleurt mooi blauw in Lugol of Melzer's reagens (Figuur 4), bij sommige echter alleen na voorbehandeling met KOH (zie beneden).

Bitunicate ascus. Dit type ascus opent zich in twee stappen waarbij de fysieke scheiding van twee wanden zich duidelijk manifesteert (Figuur 3c). De wand bestaat eigenlijk uit twee wanden, een buitenwand (*exotunica*) die star, en een binnenwand (*endotunica*) die veel zachter en sterk uitrekbaar is. Vóór het schieten is de wand tot ver onderin de ascus duidelijk dikker. Is de ascus rijp, dan breekt bij de eerste stap de buitenwand aan de top open, waarna de binnenwand naar buiten schuift en zich over haar volle lengte kan uitrekken. De lengte van de ascus wordt aldus soms meer dan verdubbeld. Daarna volgt de tweede stap, waarbij ook de binnenwand aan de top openbreekt en de sporen worden weggeschoten of vrijkomen. Meestal is er evenals bij unitunicate asci een apparaatje aanwezig in de top van de binnenwand, waardoor de sporen de ascus verlaten.

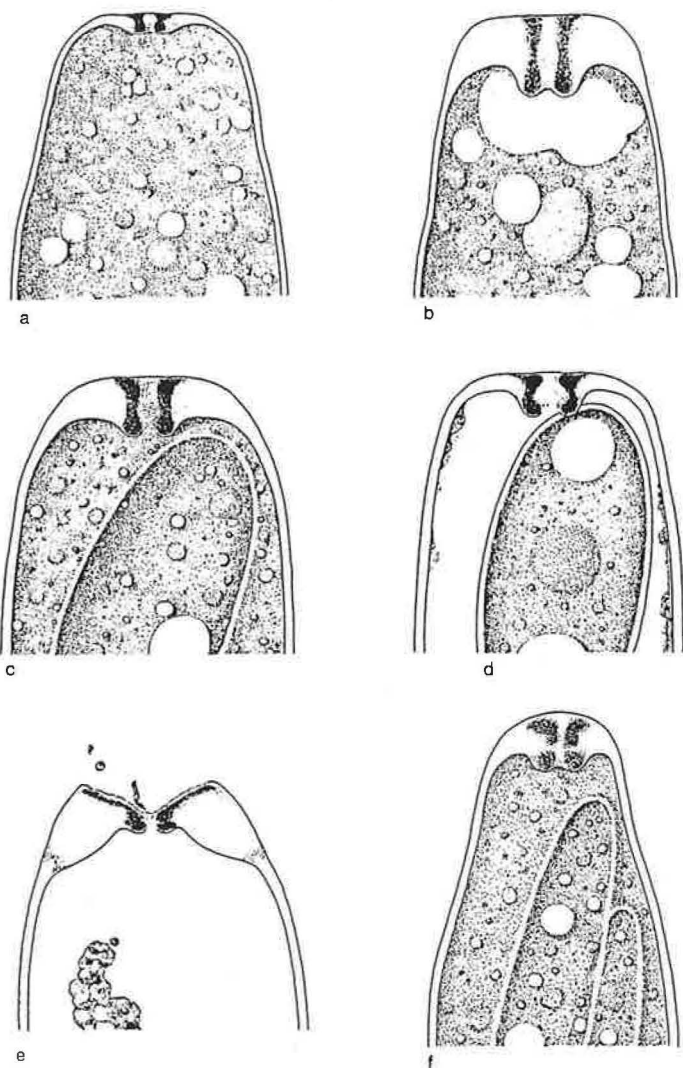
Er zijn bitunicate discomyceten en pyrenomyceten (stromatische loculoascomyceten). Onrijpe bitunicate asci zijn vrij moeilijk te onderscheiden van de asci van sommige unitunicaten en korstmossen (een symbiose van algen en een schimmel, de laatste is in verreweg de meeste gevallen een ascomycet), waarin de wand eveneens over een groot deel van haar lengte verdikt kan zijn. Met oud materiaal is het vaak net zo moeilijk, omdat uitgeschoven endotunica's meestal snel teloorgaan na het schieten. Probeer dus bij vers materiaal altijd de asci in actieve toestand te houden of te krijgen, desnoods door het enige tijd vochtig te leggen en regelmatig te observeren. Twee algemenere soorten pyrenomyceten zijn:

Leptosphaeria acuta (Fuckel) P. Karst.: bol- tot flesvormige, zwarte vruchtlichamen (pseudotheciën) aan de basis van overjarige brandnetelstengels, vooral van januari tot mei. De rest van het jaar is de asexuele vorm of anamorf, een *Phoma*, veel te vinden met ongeveer dezelfde vruchtlichamen (zgn. pycnidiën), maar met veel kleinere sporen (conidiën).

Rhodographis filicinus (Fr. : Fr.) Fuckel: roodbruine tot zwarte, verzonken stromata op dode stengels en bladstelen van Adelaarsvaren (*Pteridium aquilinum*) in het voorjaar (Figuur 3c).

De schietfunctie

Zowel uni- als bitunicate asci schieten sporen. Ze zijn hiertoe in staat omdat ze een interne druk kunnen opbouwen die veel hoger is dan die van een normale levende hyfe. In de eerste plaats moet er voldoende water voorhanden zijn. Voorts neemt men aan dat glycogeen hierbij een sleutelrol speelt. Glycogeen is een onoplosbare vorm van suiker die de osmotische waarde van het celvocht dus niet beïnvloedt. Het dient in de eerste plaats als reservevoedsel. Een deel van het glycogeen wordt niet in de sporen opgeslagen, maar blijft achter in het epiplasma. Glycogeen is dextrinoïd, het kleurt bruinrood in Lugol of Melzers reagens, en is dus goed te lokaliseren in de ascus. Vetachtige reservestoffen worden als oliedruppels opgeslagen in de sporen.



Figuur 4. Toppen van unitunicate inoperculate asci in Lugol onder de lichtmicroscop (1000x), opgezwollen apicaalapparaat met blauwkleurende ring (zwart). a-e. Salomonsstromabekertje (*Stromatinia rapulum* (Bull. : Fr.) Boud.). a. jonge ascus, tijdens meiose, apicaalapparaat nog niet volgroeid, b. idem, apicaalapparaat volgroeid, c. halfrijpe ascus, met ascospore en epiplasma, d. rijpe ascus met volledig gevacuoliseerd epiplasma, e. zojuist leeggeschoten ascus, f. Slank vlieskelkje (*Hymenoscyphus repandus* (W. Phill.) Dennis), als c.

Het glycogeen van het epiplasma kan in korte tijd worden omgezet in oplosbare, en dus osmotisch wel actieve suikers. Hierdoor wordt het passieve proces van wateropname door osmose in gang gezet en stijgt de druk in de ascus.

Meestal schieten asci niet direct na het bereiken van de maximale interne druk. Dat gebeurt door prikkels als licht, trillingen en drukverschillen. Bekerzwammen 'puffen' (van het Engelse 'puffing'), zij produceren een wolk van sporen wanneer veel asci gelijktijdig schieten. Dit gebeurt bijvoorbeeld als het regent, of wanneer een mycoloog zijn doosje met verzamelde bekerzwammen openmaakt.

Kijken naar asci

Afhankelijk van de toestand waarin ze verkeren kunnen asci er heel verschillend uitzien. Dit leidt nogal eens tot verwarring. De interne druk beïnvloedt lengte, breedte en vorm van de ascus (Figuur 3a). Afhankelijk van de soort zijn unitunicate asci op maximale spanning 20–40% langer dan dode of onrijpe levende asci. De unitunicate asci van bepaalde *Podospora*-soorten (met peritheciën op mest) worden kort voor het schieten zelfs wel viermaal zo lang, waarbij de wand in zijn geheel opgerekt wordt. Zo kunnen de asci elk op hun beurt de top in stelling brengen in de nauwe opening van het perithecium. Na het schieten krimpt de wand weer ineen.

Is de ascus op maximale spanning, dan is het apicaalapparaat meestal grotendeels platgedrukt en vrijwel onzichtbaar (Figuur 3a, meest linkse ascus). In dode en onrijpe, levende asci is het daarentegen duidelijk te zien (Figuur 3a, meest rechtse ascus). Asci in herbariummateriaal of ander gedroogd en weer opgeweekt materiaal zijn altijd dood. Er is dus geen sprake meer van interne druk want de membranen functioneren niet.

Verder worden de grootte van de ascosporen en hun positie in de ascus beïnvloed door de druk in de ascus. In maximaal gespannen asci zijn de sporen dicht bijeen gedreven, direct onder de ascustop (linker ascus in Figuur 3a,b) en vinden we daaronder één of meer grote vacuolen. Zonder die druk liggen de sporen meestal verder uiteen en ook onderin de ascus (rechter ascus in Figuur 3a). Afhankelijk van hun vorm en wand(dikte) zijn de sporen kort voor het schieten iets kleiner dan erna (vrijliggend in water). Aanzienlijk groter zijn de verschillen tussen levende, volledig met water verzadigde sporen en dode (bijv. in opgeweekte herbariumcollecties) of enigszins uitgedroogde sporen, met name als de sporewand dun is.

Kleuring van asci met jodium-houdende oplossingen

Twee veelgebruikte reagentia zijn Melzers reagens (3,75 g KI, 1,25 g I₂, in 50 ml H₂O en 50 ml chlooraalhydraat [giftig]) en Lugol (0,3 g I₂, 0,6 g KI in 100 ml H₂O). I₂ (jodium) geeft een blauw of grijsachtig verkleuring ('amyloïd') of een bruine ('dextrinoid'). De apicaalapparaten van unitunicate asci en de asci van veel korstmossen zijn amyloïd.

Voor asci verdient Lugol de voorkeur over Melzers reagens. De hogere jodiumconcentratie in Melzers reagens geeft meer achtergrondkleuring, die vooral hinderlijk is bij het waarnemen van een zwakke kleuring van de ring in het apicaalapparaat van bepaalde schijfzwammetjes. Bovendien zwellen in Melzers reagens de wanden sterker op door de chloraalhydraat, en kleurt het ascoplasma sterker (glycogeen kleurt roodbruin!). Tenslotte kleuren bepaalde ascustoppen in Lugol rood-violet in plaats van blauw, terwijl ze in Melzers reagens niet kleuren, of blauw worden na voorbehandeling met KOH. Dergelijke asci worden in de literatuur wel 'hemi-amyloïd' genoemd.

Handel met vers materiaal als volgt:

1. Maak een dun preparaat in kraanwater. Noteer de lengte en breedte van de asci en vergelijk de groepering van de ascosporen in de langste en kortste asci (met sporen). Bij wat geluk zullen rijpe, maximaal gespannen asci (epiplasma is helder of bevat veel vacuolen, sporen allemaal in de top) hun sporen schieten. Bekijk de zojuist leeggeschoten asci en bepaal aan de hand van de openingswijze het type.
2. Voeg aan de ene zijde van het dekglasje een kleine druppel Lugol of Melzers reagens toe. Zuig aan de andere zijde met een filtreerpapiertje water weg terwijl je kijkt door de microscoop. Jodium maakt de membranen lek waardoor de interne druk in de asci afneemt. Hierdoor zal een apicaalapparaat dat eerst nauwelijks zichtbaar was duidelijk naar binnen opzwellen (Figuur 4 a, b). Let op eventuele verkleuring in het apicaalapparaat of langs de buitenzijde van de wand (sommige operculaten!). Hetzelfde gebeurt ook in Melzers reagens, maar dan veel sneller.

Behandel gedroogd materiaal als boven beschreven, maar laat het eerst enige tijd opweken in kraanwater. Daarna pas een dekglasje aanbrengen. In ieder geval nooit in Melzers reagens laten opweken!

Wie meer wil weten over achtergronden en onderzoek van asci kan putten uit onderstaand literatuurlijstje. Helaas is er weinig tussen de nogal oppervlakkige behandeling in cursus- en studieboeken en de gespecialiseerde vakliteratuur over asci, en niets in het Nederlands. Leden met vragen, opmerkingen of interessante waarnemingen kunnen natuurlijk bij mij terecht.

Tenslotte wil ik Huub van der Aa bedanken voor het kritisch doorlezen van het manuscript.

Literatuur

- Arnolds, E., Kuyper, Th.W., Noordeloos, M.E. (red.). 1995. Overzicht van de paddestoelen in Nederland. Uitgave Nederlandse Mycologische Vereniging.
- Baral, H.O. 1987a. Lugol's solution/IKI versus Melzer's reagent: hemiamyloidity a universal feature of the ascus wall. *Mycotaxon* 29: 399-450.

- Baral, H.O. 1987b. Der Apikalapparat der Helotiales. Eine Lichtmikroskopische Studie über Arten mit Amyloidring. Zeitschrift für Mykologie 53: 119-135.
- Baral, H.O. 1992. Vital versus herbarium taxonomy - morphological differences between living and dead cells of ascomycetes, and their taxonomic implications. Mycotaxon 44: 333-390.
- Bellemère, A. 1994. Asci and ascospores in ascomycete systematics. In D.L. Hawksworth (ed.), Ascomycete systematics. Problems and perspectives in the nineties. NATO ASI series A. 269: 111-126.
- Brummelen, J. van. 1978. The operculate ascus and allied forms. Persoonia 10: 113-128.
- Eriksson, O. 1981. The families of bitunicate ascomycetes. Opera Botanica 60: 1-209.
- Read, N.D., Beckett, A. 1996. Centenary review. Ascus and ascospore morphogenesis. Mycological Research 100: 1281-1314.
- Verkley, G.J.M. 1995. The ascus apical apparatus in Leotiales: an evaluation of ultrastructural characters as phylogenetic markers in the families Sclerotiniaceae, Leotiaceae, and Geoglossaceae. Proefschrift, Rijksuniversiteit Leiden, pp. 1-209.
- Verkley, G.J.M. 1996. Ultrastructure of the ascus in the genera *Lachnum* and *Trichopeziza* (Hyaloscyphaceae, Ascomycotina). Nova Hedwigia 63: 215-228.
-

NATUUR en BOEK in Naturalis

specialist voor natuurliefhebber, geoloog en bioloog !

Uw specialist maakt nu deel uit van het Nationaal
Natuurhistorisch Museum Naturalis te Leiden

Goede dienstverlening, grote voorraad

Bezoekadres: Pesthuislaan 7 - Telefoon 071 568 7691