

MICROSCOPISEREN: TIPS VOOR HET GEBRUIK VAN VLOEISTOFFEN EN REAGENTIA

Peter-Jan Keizer

Kruisweg 23, 3513 CS Utrecht

Keizer, P.J. 2001. Microscopy: hints for the use of dyes and reagents. *Coolia* 44(1): 19-23.

A survey of some currently used liquids for microscopical preparations is presented. Recommendations for their use are given.

Wie serieus met de paddestoelenstudie bezig gaat, merkt vroeg of laat dat het gebruik van de microscoop onvermijdelijk wordt. Vrijwel alle determineerboeken 'vragen' om kenmerken van sporen, cystiden, hyfen en dergelijke. Die zijn alleen bij sterke vergroting zichtbaar te maken. Dit gebeurt door van een klein stukje weefsel een dunne coupe of een pletpreparaat in een vloeistof te maken en het met behulp van een microscoop te bestuderen. Het preparaat wordt met doorvallend licht bekeken. Daarom is het noodzakelijk dat de soms zeer dunne celwanden zo goed mogelijk tegen de omgeving afsteken. Een goede afregeling van de lichtbundel van de lamp of spiegel en vooral de (optimale) stand van het diafragma in de condensor zijn essentieel voor een goed beeld. Hoe dat moet, valt buiten het kader van dit artikel.

Het kan zijn dat een preparaat dat gemaakt is in een heldere vloeistof, zoals water of ammonia, een onvoldoende duidelijk beeld oplevert. Er bestaan daarom diverse mogelijkheden om de zichtbaarheid van de cellen in het microscopische preparaat te verbeteren. Er zijn twee categorieën van microscoop-vloeistoffen: (1) media die helder zijn of bestanddelen bevatten die zich eventueel aan bepaalde onderdelen kunnen hechten, zoals celwanden en (2) reagentia die specifieke structuren of eigenschappen kunnen aantonen, zoals jodium dat met zetmeel donkerblauw kleurt. Veel van de stoffen die hiervoor in de mycologie gebruikt worden, zijn opgelost in water, ammonia of alcohol. Ze staan dus in vloeistofvorm, meestal in kleine pipetflesjes op de tafel van de mycoloog. Een klein aantal stoffen wordt droog bewaard en pas bij gebruik in kleine hoeveelheden opgelost.

Een beginnend microscoopgebruiker zal zich afvragen welke stoffen hij of zij in ieder geval moet aanschaffen, hoe er aan te komen, hoe ze optimaal bewaard moeten worden en vooral hoe en wanneer ze moeten worden toegepast.

Een belangrijke vraag die de gebruiker zich steeds weer moet stellen is: waarvoor ga ik een chemische stof gebruiken en is die wel noodzakelijk. In water zijn allerlei zaken vaak het beste te zien! Bovendien kan water gemakkelijk vervangen worden door een andere stof, die pas tijdens het determineren nodig blijkt te zijn. Wanneer een preparaat meteen in een of andere chemische stof wordt gemaakt, is zo'n wisseling van vloeistof meestal niet meer mogelijk. Wie bijvoorbeeld Melzers' reagens voegt bij een preparaat in katoenblauw (opgelost in melkzuur) krijgt wel een prachtig kleurenspektakel onder de lens maar niet de specifieke reactie waar Melzers' reagens in feite voor bedoeld is (zie onder).

Hieronder volgen enkele algemene tips voor het gebruik van vloeistoffen. Bij de bespreking van de afzonderlijke vloeistoffen staan meer specifieke aanbevelingen. Op pagina 21 wordt een overzicht gegeven van de bruikbaarheid van de vloeistoffen bij een aantal geslachten.

1. Donker gekleurde sporen kunnen het beste in water worden bekeken. Bij veel soorten, bijvoorbeeld *Psathyrella*'s, kleuren de sporen donkerder in alkalische vloeistoffen, zoals ammonia of KOH. Bij de omschrijving van de kleur van de sporen in het microscopisch beeld moet de gebruikte vloeistof dus vermeld worden.
2. Sterk basische vloeistoffen (bijv. KOH 10%) kunnen de contrasten verkleinen doordat sommige celwanden wat gelatineus opzwellen. Bovendien kunnen soms kleine kristalletjes op celwanden

oplossen en dus niet meer zichtbaar zijn. De grootte van sporen kan in KOH iets afwijken te opzichte van de grootte in water.

3. De drie heldere vloeistoffen: water, ammonia en verdunde KOH verschillen meestal maar weinig in het gebruik. Velen ontwikkelen zelf een bepaalde voorkeur voor een van deze vloeistoffen.

Geregeld wordt in Coolia aangekondigd dat kleurstoffen en reagentia kunnen worden besteld. Op de jaarlijkse grote verenigingsbijeenkomsten zijn deze dan verkrijgbaar. In diverse paddestoelen-determinatieboeken staan ook recepten van de microscoopvloeistoffen voor hen die ze graag zelf willen bereiden. De NMV-bibliotheek heeft boeken beschikbaar voor diegenen die zich verder in deze materie willen verdiepen.

Ammonia (NH_4OH). Net als de kaliumhydroxide-oplossing is ammonia een base, alleen minder sterk. Huishoudammonia is bij de drogist of supermarkt verkrijgbaar. Het kan gebruikt worden om gedroogd materiaal in op te weken. Bij de determinatie van *Conocybe*-soorten (Breeksteeltjes) is ammonia aan te bevelen, omdat bij sommige soorten lange naaldvormige kristallen in de vloeistof ontstaan; bij andere soorten is dat niet het geval.

Congorood. Deze stof kleurt celwanden van de hyfen. Congorood kan daarom helpen om zeer dunwandige structuren of moeilijk te vinden onderdelen - zoals gespen aan de basis van basidiën - beter zichtbaar te maken. Congorood wordt erg veel gebruikt. De congoroodkleuring is vooral succesvol als je:

1. bij vers materiaal: direct in congorood laten kleuren, teveel aan kleurstof wegzuigen met een filtreerpapiertje en vervangen door ammonia of KOH 5%;
2. bij gedroogd materiaal: eventueel eerst opweken in ammonia, zonodig verwarmen, dan de procedure als bij vers materiaal.

Cresylblauw. Deze paarsblauwe vloeistof wordt gebruikt om te bepalen of de wanden van sporen metachromatisch zijn. Dat betekent dat de wand van de spore er roodachtig uitziet terwijl de omgeving blauw gekleurd is. Metachromatische sporen komen voor bij sommige soorten Parasolzwammen en verwanten. Het onderscheid tussen *Oligoporus tephroleucus* (Asgrauwe kaaszwam) en *Tyromyces chioneus* (Sneeuwwitte kaaszwam) is mede te maken doordat de hyfen van de context in cresylblauw bij de eerste blauw blijven en bij de tweede soort violet kleuren.

Kaliumhydroxide (Kaliloog, KOH). Wordt in verschillende concentraties gebruikt: 2%, 5% of 10%. Van gedroogd materiaal kan een preparaat in KOH gemaakt worden, omdat het daarin goed opweekt (beter dan in water). Wordt te geconcentreerde KOH gebruikt, dan kunnen hyfen wat opzwellen en glazig worden en daardoor slecht zichtbaar worden. Men moet er rekening mee houden dat sporenmaten in sterk geconcentreerde loog geringer kunnen worden in vergelijking met die in water. De cystiden van sommige korstzwammen (*Tubulicrinis* - Oploskorstje, *Dacryobolus* - Papil-korstzwam) lossen op in loog. Wanneer het vermoeden bestaat dat zo'n soort bekeken wordt, moet

Tabel op rechterpagina:

Lijst met genera of grotere groepen (vet) met aanbevolen microscoop-vloeistof (×). Geslachten of groepen waar geen bijzondere reactie te verwachten is (bijvoorbeeld *Clitocybe*, Trechterzwammen) kunnen naar believen in water, ammoniak, verdunde kaliumhydroxide en/of congorood bekeken worden. Deze staan niet in onderstaande lijst vermeld.

	Ammo- nia	Congo- rood	Cresyl- blauw	KOH	Katoen- blauw	Melzers'	Zout	Water
Amanita	.	.	.	.	.	x	.	.
Amylostereum	.	.	.	.	.	x	.	.
Antrodia	.	.	.	.	.	x	.	.
Antrodiella	.	.	.	.	.	x	.	.
Armillaria	.	.	.	.	.	x	.	.
Ascomycetes	x	.	.	.	x	x	.	x
Asterostroma	.	.	.	.	.	x	.	.
Baeospora	.	.	.	.	.	x	.	.
Cantharellula	.	.	.	.	.	x	.	.
Ceriporiopsis	.	.	.	.	.	x	.	.
Conocybe	x	.	.	.	.	.	.	.
Cystoderma	.	.	.	.	.	x	.	.
Cystolepiota	.	.	.	.	x	x	.	.
Dermoloma	.	.	.	.	.	x	.	.
Diplomitoporus	.	.	.	.	.	x	.	.
Entoloma	x	x	.	.	.	.	x	x
Gasteromycetes	x	.	.	x	.	.	.	x
Gloeocystidiellum	.	.	.	.	x	x	.	.
Hebeloma	.	.	.	.	.	x	.	.
Hemimycena	.	.	.	.	.	x	.	x
Hericium	.	.	.	.	.	x	.	.
Hydropus	.	.	.	.	.	x	.	.
Inocybe	.	.	.	x	.	.	.	.
Lactarius	.	.	.	.	.	x	.	.
Laxitextum	.	.	.	.	.	x	.	.
Lentinellus	.	.	.	.	.	x	.	.
Lepiota	.	.	.	.	x	.	.	.
Leucoagaricus	.	.	x	.	.	.	.	.
Leucocoprinus	.	.	x	.	.	.	.	.
Leucopaxillus	.	.	.	.	.	x	.	.
Lyophyllum	.	.	.	.	.	.	.	.
Macrolepiota	.	.	x	.	x	x	.	.
Megalocystidium	.	.	.	.	x	x	.	.
Melanoleuca	.	.	.	.	.	x	.	.
Mucronella	.	.	.	.	.	x	.	.
Mycena	.	.	.	.	.	x	.	.
Myxomphalia	.	.	.	.	.	x	.	.
Oligoporus	.	.	x	.	x	.	.	.
Peniophora	x	.	.	.	.	.	.	.
Pholiota	.	.	.	.	x	.	.	.
Phragmobasidiomycetes	x	.	.	.	.	.	x	.
Plicaturopsis	.	.	.	.	.	x	.	.
Polyporen	x	.	x	x	.	.	.	.
Porpoloma	.	.	.	.	.	x	.	.
Pseudobaeospora	.	.	.	.	x	.	.	.
Pseudoclitocybe	.	.	.	.	x	.	.	.
Psilocybe (s.l.)	.	.	x	x	.	.	.	.
Ramaria	.	.	.	.	x	.	.	.
Russula	.	.	.	.	.	x	.	x
Russulales	.	.	.	.	.	x	.	x
Scytinostroma	.	.	.	.	.	x	.	.
Stereum	.	.	.	.	.	x	.	.
Typhula	.	.	.	.	.	x	.	.
Tyromyces	.	.	x	.	.	.	.	.
Typhula	.	.	.	x	.	.	.	.
Tyromyces	.	.	.	x	.	.	.	.

het preparaat in water worden gemaakt. Voeg dan tijdens het kijken een druppeltje loog toe en de cystiden lossen op en verdwijnen, een bijzonder aardig gezicht. Is het preparaat meteen in loog gemaakt, dan zijn deze cystiden onvindbaar. De algemeen aan oude dode dennen groeiende *Diplomitoporus lindbladii* (Lichtgrijze poria) heeft in loog sterk opzwellende tot vrijwel oplossende hyfen. Bij sommige bruinsporige soorten, zoals *Cortinarius* (Gordijnzwam), wordt de sporenornamentatie in KOH wat beter zichtbaar.

Katoenblauw. Katoenblauw hecht zich aan bepaalde delen van het preparaat. Het preparaat moet even verhit worden ofwel moet de stof enige tijd, bijvoorbeeld een uur, inwerken. Het kan worden gebruikt om de ornamentatie op sporen beter zichtbaar te maken. Celwanden die met katoenblauw kleuren worden cyanofiel genoemd. Vooral heel fijne wratjes, lijntjes en dergelijke worden duidelijker gekleurd. Katoenblauw is onder andere te gebruiken bij geornamenteerde sporen van ascomyceten en *Ramaria*'s (Koraalzwammen). Chrysocystiden (cystiden met een lichtbrekende, wittige of gele inhoud) trekken de blauwe kleurstof sterk aan en worden opvallend donker blauw en zijn dan gemakkelijk te vinden. Daarom is katoenblauw te gebruiken bij sommige soorten van het geslacht *Psilocybe* (ondergeslachten *Pholiota*, *Hypholoma*, *Stropharia*).

Melzers' reagens. Jodium in deze vloeistof reageert met zetmeelachtige bestanddelen van de cellen in het preparaat. Een donkere grijzige of blauwige kleur is het gevolg. Vaak zijn het sporen die donker kleuren in Melzers' reagens; deze worden dan amyloïd genoemd. Diverse geslachten hebben sporen die amyloïd zijn, bijvoorbeeld *Mycena* en *Amanita* (zie overzichtstabel). Sporen van de geslachten *Russula* en *Lactarius* hebben een sterk amyloïde ornamentatie van wratjes en lijntjes. Het bestuderen van de sporen van deze groepen kan uitsluitend in Melzers' reagens. De amyloïde reactie is ook belangrijk bij de determinatie van ascomyceten, waarbij vele soorten een amyloïde ascustop of een amyloïde apicale pore hebben. Bij een aantal genera zijn de asci geheel amyloïd. Bij sommige groepen van ascomyceten wordt het preparaat eerst in KOH voorbereid en vervolgens in Melzers' reagens bestudeerd. Een mooie hemelsblauwe kleur ontstaat dan.

Bij sommige soorten is de amyloïde reactie van de sporen zwak en daardoor moeilijk waar te nemen. Het kan dan soms helpen om ophopingen van sporen in het preparaat te zoeken. Door dit reagens op een sporenfiguur toe te passen, is ook zonder microscoop te zien of sporen amyloïd zijn.

Soms kleuren celwanden van bepaalde groepen paddestoelen in Melzers' reagens niet grijsblauw maar donker roodbruin. Deze reactie wordt dextrinoïd genoemd. De lameltrama van sommige *Mycena*-soorten (bijv. *Mycena galericulata*, *Helmmycena*) is dextrinoïd.

Net als bij sommige andere vloeistoffen beïnvloedt deze stof de sporenmaten; sporen kunnen dus beter niet in Melzers' reagens worden gemeten.

Verzadigde zoutoplossing (NaCl). Het effect van de zoutoplossing is dat vocht aan de cel wordt onttrokken, waardoor de celinhoud zich samentrekt. Dat heet plasmolyse. Daardoor kan men beter beoordelen of een pigment in de celvloeistof (celinhoud) of in de celwand aanwezig is. Dit komt o.a. van pas bij de determinatie van *Entoloma*'s (Satijnzwammen).

Water. Voor vers materiaal is dit in de meeste gevallen de beste vloeistof om het eerste preparaat mee te maken. Het reageert niet en eventuele tere incrustaties of pigmenten blijven gewoonlijk intact. Een zeer kleine hoeveelheid vloeibare zeep in het water kan helpen om hinderlijke luchtballen tussen het weefsel te verdrijven, doordat de oppervlaktespanning van het water met zeep wordt verlaagd. Een klein nadeel van water is soms dat bij vers materiaal het beeld in

beweging blijft door allerlei in de vloeistof rondzwemmende eencelligen. Wie dit teveel voor de ogen vindt duizelen kan een kleine hoeveelheid ammonia toevoegen.

Twee minder vaak toegepaste en bewerkelijke kleuringen worden hieronder genoemd. Beginners zullen deze in het algemeen niet nodig hebben. Deze stoffen staan niet in de onderstaande tabel.

Acetokarmijn. Toepassing van deze stof is nogal bewerkelijk. Acetokarmijn geeft een ingewikkelde reactie, waarbij ijzer gebonden wordt aan bepaalde eiwitten, die min of meer specifiek zijn voor bepaalde genera. Bij een positieve reactie wordt gesproken van een siderofiele of karminofiele reactie, die zichtbaar is als een zwarte, korrelige inhoud van basidiën. Sommige geslachten zoals *Lyophyllum* (Bundelridderzwam) hebben siderofiele basidiën. Omdat deze reactie binnen de genoemde geslachten niet onderscheidend is en de korreling ook zonder reactie al enigszins zichtbaar is, wordt er hier niet verder op ingegaan.

Sulfovanilline. Dit is een oplossing die direct voor het gebruik op het objectglas wordt gemaakt door enige kristallen vanilline op te lossen in een druppel zwavelzuur 50%. In deze vloeistof wordt een stukje van het te bestuderen materiaal gebracht. Indien het preparaat gloeocystiden bevat, kleurt de inhoud hiervan opvallend zwart. De cystiden in de hoedhuid van veel russula's zijn een voorbeeld van sterk reagerende gloeocystiden. Bij soorten uit het geslacht *Peniophora* (Schorszwam) zijn de gloeocystiden soms onopvallend; hier is de sulfovanilline reactie een goed hulpmiddel bij de determinatie. Verder is het gebruik van dit reagens niet altijd noodzakelijk, omdat gloeocystiden met enige ervaring zonder reagens herkenbaar zijn aan de olie-achtige korrelige inhoud.

De kleurstoffen fuchsine, eosine en phloxine worden weinig gebruikt. Fuchsine wordt bij russula's gebruikt om incrustaties op primordiale hyfen beter zichtbaar te maken. Eosine en phloxine kleuren onder andere sommige hyfen van bepaalde *Oligoporus*-soorten helder rood.

In de volgende boeken kan bruikbare informatie over microscoopvloeistoffen worden gevonden. Vooral Meixner (1975) geeft veel informatie, o.a. met een overzicht van de bekende reacties van alle gangbare stoffen op veel soorten macrofungi.

1. Erb, B., Matheis, W. 1983. Pilzmicroscopie. Präparation und Untersuchung von Pilzen. Stuttgart: Gesellschaft der Naturfreunde: Frankh'sche Verlagshandlung.
2. Meixner, A. 1975. Chemische Farbreaktionen von Pilze. J. Kramer, Vaduz.
3. Moser, M. 1978. Kleine Kryptogamenflora; Die Röhrlinge und Blätterpilze (Polyporales, Boletales, Agaricales, Russulales). 4te völlig umgearbeitete Auflage. Gustav Fischer Verlag Stuttgart. (Idem voor de 5^e druk 1983).

Veel dank aan Huub van der Aa voor commentaar bij een eerdere versie van dit artikel.