

MICROSCOPIE VAN INOPERCULATE DISCOMYCETEN, LEVEND OF DOOD?

Stip Helleman

Sweelinck 78, 5831 KT Boxmeer, e-mail: helleman4@zonnet.nl

Helleman, S.B.R. 2003. Microscopy of inoperculate discomycetes, dead or alive? *Coolia* 46(2): 57-65.

This paper provides an overview of microstructural and microchemical features of inoperculate discomycetes (Helotiales). Specific reactions of (parts of) the discomycete fruitbody to certain chemicals provide additional characters that can be used for classification and identification. In this respect, it is important to keep the differences between dead and living cells in mind.

De ascomyceten zijn in beweging, of in ieder geval hun systematiek. In de laatste twee decennia is de min-of-meer vertrouwde indeling van Dennis' British Ascomycetes (Dennis, 1981) tamelijk grondig overhoop gehaald. Als amateurmycoloog raak je daardoor het overzicht behoorlijk kwijt. Niettemin is er een groeiende belangstelling voor de ascomyceten, ook voor de kleintjes; uiteindelijk zijn ze vaak wel erg mooi om te bekijken.

Dit verhaal gaat over de microscopie van kleine ascomyceten, en wel over de kleine schijfjes die onder naam 'inoperculate discomyceten' door het leven gaan. Gezien de groeiende belangstelling voor deze kleinoden, en de slechts spaarzaam in meestal anderstalige literatuur voorhanden zijnde kennis erover, probeer ik in dit verhaal een inleiding te geven in de morfologische en chemische kenmerken die deze groep microscopisch te bieden heeft. De veronderstelling is meestal dat die in slechts zeer geringe mate aanwezig zouden zijn, zodat het dus moeilijk of oninteressant is om een collectie te determineren. Dat het moeilijk is valt niet te ontkennen, maar door het materiaal in levende toestand te onderzoeken komt er een scala aan aanvullende kenmerken bij die zeker interessant en zeer waardevol kunnen zijn voor het op naam brengen van een collectie, als men deze maar weet te interpreteren. De kenmerken die hier behandeld worden zijn voor iedereen die beschikt over een lichtmicroscop met een vergroting van 1000× (olie-immersie) met enige oefening goed te zien.

Inoperculate discomyceten of Helotiales zijn ascomyceten met een schijf-, beker- of urnvormig vruchtlichaam, dat meestal een doorsnede heeft van 0,2 tot 2 mm. De ascus, een zakvormige cel waarbinnen zich de sporen vormen, opent zich aan de top door middel van een porie. De Helotiales onderscheiden zich hierin van de operculate discomyceten, de Pezizales, waarbij de ascus zich opent door middel van een scharnierend deksel, het operculum, in de ascustop. De vruchtlichamen of apothecia van de Helotiales kunnen behaard of kaal zijn, zittend of gesteeld, solitair of dicht opeengedrongen groeiend, met een saprotrofe of parasitaire leefwijze.

Bij microscopisch onderzoek van inoperculate discomyceten is het van belang om enige basiskennis te hebben van hun bouw en vorm, en van de chemische kenmerken en reacties van de vruchtlichaamonderdelen. Daarnaast is het ook belangrijk om te weten in welke toestand de cellen zich bevinden, levend of dood. Er kunnen namelijk aanzienlijke maat- en vormverschillen optreden bij het afsterven van de cellen door het verlies van hun celspanning of turgor. In dood materiaal (ook als het voor microscopisch onderzoek eerst is opgeweekt) kunnen cellen tot wel 10-20% kleiner zijn dan in levend materiaal (vooral bij de

Tabel 1: Chemicaliën voor microscopische reacties en kleuringen. De meest gebruikte soorten, met hun toepassingen en een indicatie voor dodelijk (†) of neutraal (*) voor de cellen. (VB = vacuolelichaam, zie tekst)

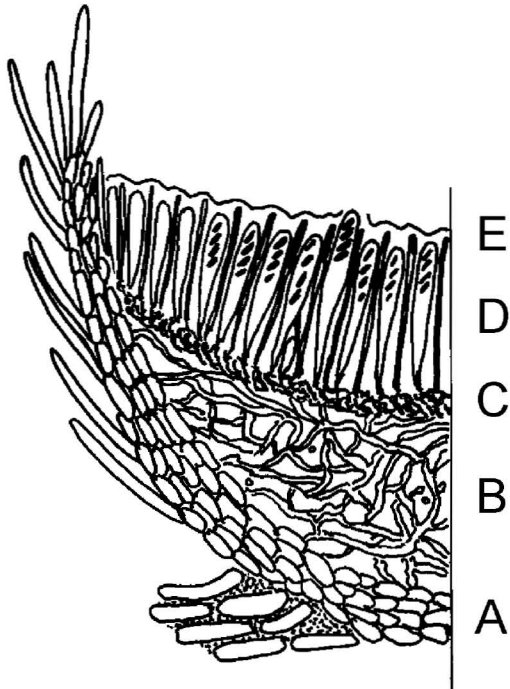
MLZ	Melzer's reagens (†); kleuring van ascus-pore en excipulum.
LUG	Lugol (*); kleuring van ascus-pore, glycogeen en VB's.
CB	Katoenblauw in melkzuur (†); kleuring van het celplasma.
CRB	Briljant-Cresylblauw (*); kleuring van celplasma en VB's.
CR	Congorood in 5% ammonia (†); kleuring van celwand.
KOH	5% of 10% kalilooplossing in water (†); voor het permeabel maken van weefsel voor latere kleuringen, het doen vrijkomen van pigmenten en het controleren of eventuele granulatie of haarverdikking oplosbaar is.
H ₂ O	Water (*). Leidingwater wordt geprefereerd boven demiwater omdat dit ongeveer de zelfde osmotische waarde heeft als de celinhoud.

ascusbreedte is het verschil opvallend). Het is dus belangrijk om te noteren of de metingen en/of tekeningen zijn betrokken van levend of dood materiaal. Ook dient men dit in gedachten te houden bij vergelijking van een collectie met de literatuur, aangezien veel beschrijvingen berusten op (dood) herbarium-materiaal.

Of weefsel dood of levend is hangt niet alleen af van de toestand van het vruchtlichaam waar het uit gehaald is, maar ook van het medium waarin het microscooppreparaat gemaakt wordt (zie bijv. Huhtinen, 1987). Veel van de standaard-chemicaliën die daarvoor gebruikt worden zijn namelijk dodelijk voor de cellen. Tabel 1 geeft een lijstje hiervan (inclusief de afkortingen die ik in de tekst verder zal gebruiken), met een indicatie of ze al-dan-niet dodelijk zijn voor levende cellen. Levend weefsel herkent men aan een hogere doorzichtigheid en contrast; ook bevatten de cellen rechte septen (dwarswandjes) en zijn ze daar iets ingesnoerd (in dood weefsel zijn de septen meestal onregelmatig verbogen, en de hyfen niet ingesnoerd), en ze bevatten vacuoles. Bij levende sporen is een eventueel aanwezige olie-achtige substantie vaak verdeeld over vele kleine druppeltjes terwijl dode sporen bijvoorbeeld maar 1 of 2 grotere druppels bevatten.

Het preparaat

Bij het maken van een preparaat begint men altijd in water, om de eventueel aanwezige celbekleding niet te beïnvloeden. Later kunnen de overige chemicaliën via de zijkant onder het dekglas gezogen worden. Met vruchtlichamen kleiner dan 0,5 mm die men op eventueel aanwezige haren wil onderzoeken dient men een druppel water op het objectglas te leggen waarin het hele vruchtlichaam gelegd wordt. Zuig vervolgens het grootste gedeelte van het water af (filtreerpapiertje), waarna men het vruchtlichaam manoeuvreert tot het met het hymenium naar beneden gekeerd ligt. Vervolgens plaatst men voorzichtig het dekglaasje, zonder het aan te drukken, en laat weer vers water onder het dekglas vloeien. Met deze truc krijgt u de kleinste vruchtlichaampjes, die zich vaak slecht in water laten onderdompelen, toch in de stand waarin u ze hebben wilt. Een binoculaire loop is wel heel handig!



Figuur 1

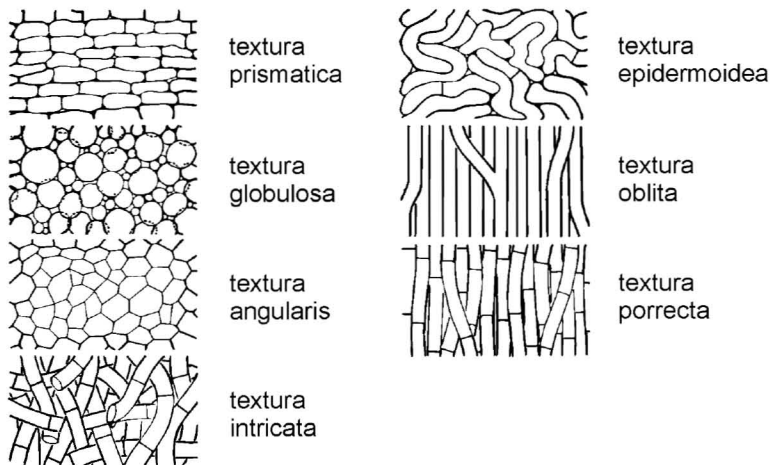
Schematische doorsnede door een vruchtlichaam van een inoperculate discomyceet. De verschillende weefsellagen die te onderscheiden zijn (A-E) worden besproken in de tekst.

Vruchtlichaambouw

De globale bouw van alle inoperculate discomyceten is ongeveer hetzelfde. Een radiale doorsnede door een vruchtlichaampje is schematisch weergegeven in figuur 1, en de verschillende weefsellagen die te onderscheiden zijn worden hieronder kort toegelicht.

- A. Ectaal excipulum (weefsel aan de buitenkant); kan kaal, melig of behaard zijn, en is van belang voor het herkennen van de families.
- B. Medullair excipulum (binnenste vruchtvlees).
- C. Subhymenium; tussen het hymenium en het medullaire excipulum kan nog een laag anders gevormde of anders gerichte cellen voorkomen.
- D. Hymenium (kiemvlies); bevat de asci en de parafysen (steriele cellen).
- E. Epithecium; optioneel, een gelatineuze laag waarin de parafysen zijn ingebed en die de asci afdekt (dit komt voor in sommige families, bijv. de *Orbiliaceae*).

De structuur van het excipulum (lagen A en B uit figuur 1) kent een grote variatie, en is ook van groot belang voor de classificatie van inoperculate discomyceten. De excipulum-structuren van ascomyceten, zoals deze voorgesteld zijn door R. Korf (1951), zijn onderverdeeld in 2 groepen (zie figuur 2):



Figuur 2: Weefselstructuren bij inoperculate discomyceten (uit Brummelen (1967)).

Groep 1: kortcellige structuren

Textura prismatica: cellen rechthoekig, in doorsnede langer dan breed.

Textura globulosa: cellen rond, de tussenruimte is gevuld met kleine tussencellen.

Textura angularis: cellen veelhoekig zonder tussenruimte, lengte en breedte ongeveer gelijk.

Groep 2: langcellige structuren

Textura intricata; hyfenverloop niet parallel, celwanden onderling niet verkleefd, met ruimte tussen de hyfen.

Textura epidermoidea; hyfenverloop niet parallel, celwanden onderling verkleefd, zonder tussenruimtes.

Textura oblita; hyfenverloop parallel, celwanden sterk verdikt en met elkaar verkleefd.

Textura porrecta; hyfenverloop parallel, celwanden niet verdikt en niet verkleefd.

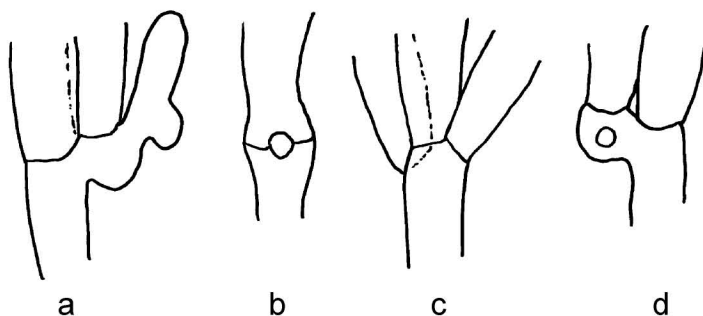
Het belang van de structuur van het ectaal excipulum voor de taxonomie van de inoperculate discomyceten werd als eerste onderkend door Nannfeldt (1932), die deze kenmerken gebruikte voor een nieuwe indeling. Hij onderscheidde de drie grootste families als volgt:

Helotiaceae: textura oblita / porrecta soms neigend naar een textura prismatica dat onder een hoek staat op de excipulumbuitenkant (er dus niet parallel aan loopt).

Hyaloscyphaceae: textura prismatica / angularis dat parallel loopt aan de excipulum-buitenkant en voorzien is van haren.

Dermataceae: textura globulosa / angularis, dus zonder specifieke oriëntatie.

De textura's intricata en epidermoidea vindt men voornamelijk in het medullaire excipulum. Eventueel kunnen de cellen verkleefd zijn met een intercellulaire gel, en/of kunnen ze kristallen bevatten.



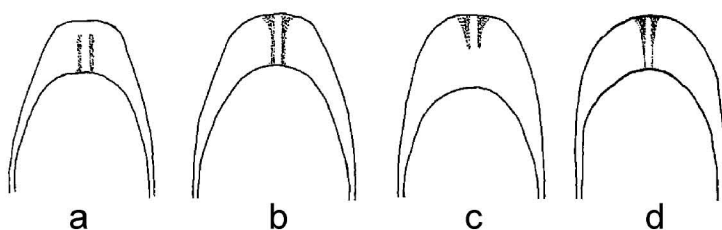
Figuur 3: Vorm van de ascusbasis. In de figuren is de bovenste cel steeds een ascus.

a: haken (croziers); b: open haken, ook wel gevorkte basis (bifurcate) genoemd; c: zonder haken; d: doorboorde haken.

Ascus

De ascus is het voortplantingsorgaan waarin zich de sporen bevinden; meestal is ze achtsporig. In de literatuur wordt vaak gesproken van het feit dat de sporen zich één- of twee-rijig in de ascus zouden bevinden. Echter, dit duidt bij inoperculate discomyceten slechts op het ontwikkelingsstadium van de ascus. Bij volledig rijpe asci bevinden zich de sporen altijd paarsgewijs bovenaan in de ascus. Voor een meer gedetailleerde beschrijving van de ontwikkeling van de asci verwijs ik naar Verkley (1995, 1998).

De ascusbasis kent verschillende vormen (figuur 3). Voor het vaststellen van de aan- of afwezigheid van haken bekijkt men de aanhechting van jonge asci. Bij oudere asci treden vaak vergroeiingen op, waardoor de aan- of afwezigheid van haken moeilijk vast te stellen is. De dwarswand aan de ascusbasis is, als hij pas is aangelegd, niet helemaal gesloten, maar geperforeerd: er zit een zgn. porie in. Deze porie raakt later verstopt door wat een prop genoemd wordt. Deze prop kan soms sterk kleuren in CR. Bij losse asci in een CR preparaat kunnen in sommige gevallen een of twee zeer sterk gekleurde punten (zgn. CR+ punten) aan de basis te onderscheiden zijn. Dit betreft dan vermoedelijk de propfen van de poriën in de basale septen. Als er duidelijk twee punten zichtbaar zijn aan één ascusbasis kan dit duiden op de aanwezigheid van haken. De aan- of afwezigheid van haken wordt soms gezien als een kenmerk op soort- of variëteitniveau, maar hierover bestaat nog geen zekerheid.



Figuur 4: Ascustoppen met verschillende vormen en verschillende versies van het apikaalapparaat (gekleurd in LUG).

De top of apex van de ascus (figuur 4) kan verschillend gevormd zijn, van rond tot conisch, met of zonder afgeplatte top en allerlei variaties hierop. In de top zit een kanaaltje (porie), waardoor bij rijpheid de sporen naar buiten schieten. Dat kanaaltje, en het deel van de ascuswand eromheen, wordt apicaalapparaat genoemd. Het kan verschillende vormen aannemen, en kleurt vaak althans voor een deel in LUG of MLZ. Bij de beschrijving ervan is het belangrijk om te noteren of de asci dood of levend zijn. Evenzo bij de beschrijving van de vorm van de poriewand of in ieder geval dat gedeelte dat kleurt in LUG of MLZ. Maar beter is het om de top met verkleurende gedeelte te tekenen. Voor bestudering van de poriewandvorm neemt men het beste een onrijpe ascus aangezien bij rijpe asci de poriewand vervormd wordt door de inwendige druk.

Chemische reacties

De ascushoud (of een deel daarvan) kan zich in MLZ, LUG, CB of CRB kleuren. Een orangerode verkleuring in MLZ of LUG duidt op de aanwezigheid van glycogeen. De poriewand (figuur 4) kan in MLZ of LUG kleuren of niet. Bij het gebruik van LUG kunnen drie types onderscheiden worden:

type **rr**: roodbruinverkleuring (hemi-amyloïd of dextrinoïd);

type **rb**: een roodgrijsverkleuring of een roodverkleuring die bij een hogere jodiumconcentratie overgaat in blauw;

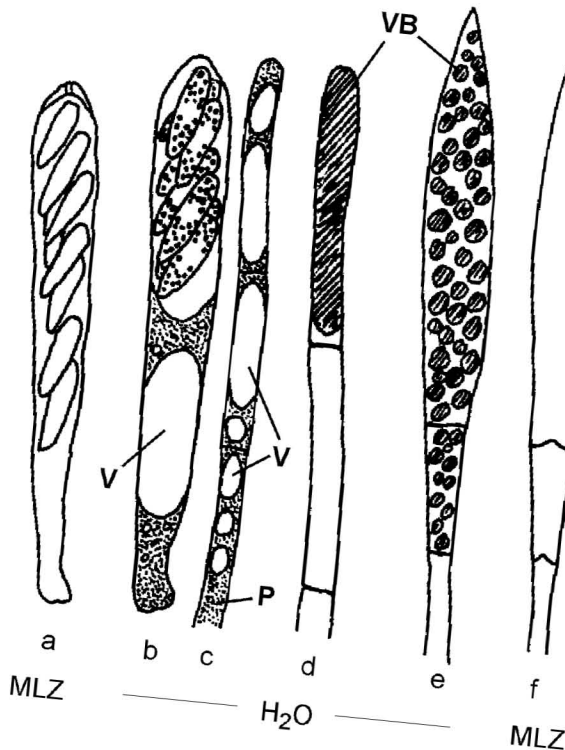
type **bb**: een blauwverkleuring (euamyloïd of amyloïd).

Bij het gebruik van MLZ worden slechts twee types reactie onderscheiden, namelijk roodbruinverkleuring (rr) en blauwverkleuring (bb; in de literatuur vaak met J+ aangeduid). Bij het niet verkleuren van de poriewand in MLZ dient het vruchtlichaam met KOH voorgeweekt te worden. In veel gevallen verschijnt pas daarna een blauwverkleuring in MLZ. Deze gevallen, waarbij een KOH voorbehandeling nodig is om een reactie vast te stellen in MLZ, staan meestal gelijk aan een type rr of rb reactie in LUG zonder voorbehandeling.

Celinhoud

Celplasma is meestal niet zichtbaar als zodanig, maar kan soms met CB of CRB positief reageren (zie figuur 5). In sommige gevallen kan het ook vaste vorm aannemen in de vorm van ophopingen tegen de binnenkant van de celwand. De eventuele granulatie van de haren (bijv. *Cistella* subgenus *Verrucotricha*) of de intercellulaire gel (bijv. *Mollisina*) kan ook van plasmatische oorsprong zijn. Dit is dan aantoonbaar door een CB of CRB kleuring.

Lichtbrekende vacuolelichamen ("refractive Vacuolar Bodies", verder aangeduid als VBs) onderscheiden zich van normale vacuoles door het feit dat ze kristallijn aandoen. Dit in tegenstelling tot de normale vacuoles die zich manifesteren als lege plekken in het celplasma. Bij sommige *Calycellina*-soorten nemen ze zelfs vaste vorm aan in de hoedanigheid van een gele olieachtige harsklont die zelfs in dood materiaal aanwezig blijft. Tijdens dit 'verharsingsproces' wordt een zeer hoge activiteit waargenomen in de cel wat duidt op een zeer typisch chemisch proces waardoor het samenklonteren plaatsvindt. Dit fenomeen toont zich als een grote harsklont waaromheen vele kleine VBs stuiten die één voor één met de grote klont samensmelten. Dit type VBs is jong al herkenbaar: in een preparaat met LUG kleuren ze goudgeel.



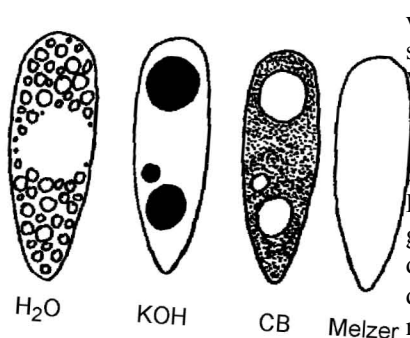
Figuur 5: Asci en parafysen in verschillende media. a: rijpe ascus in MLZ; b: dezelfde ascus in H₂O; c-e: verschillende parafysen in H₂O; f: parafyse (dezelfde als in e) in MLZ. Let ook op de vervormde septen (dwarswandjes). P = celplasma, V = vacuoles, VB = Vacuolar body.

Vacuoles en VBs komen alleen in levend weefsel voor en verdwijnen onmiddellijk in dodelijke reagentia zoals KOH, MLZ, CR of CB. Bij de VBs van sommige *Mollisia*-soorten komt onder toevoeging van KOH een kleurstof vrij. Ook kunnen de VBs onder toevoeging van LUG soortspecifiek koperrood verkleuren; dit is mij bekend van verschillende *Hyaloscyphaceae*. Deze reacties kunnen als een bijkomend determinatiekenmerk worden gezien. Hopelijk, als te zijner tijd meer genetisch onderzoek is gedaan naar deze soorten, kunnen deze chemische reacties, die alleen in levend materiaal waargenomen worden, hun nut bewijzen in het lichtmicroscopisch vaststellen van meer natuurlijke groepen door hun specifieke chemie. Olie-druppels (Lipid bodies, LBs) onderscheid men van VBs doordat ze resistent zijn tegen dodelijke reagentia (bijv. KOH). In CB of CRB zijn ze als ongekleurde druppels te herkennen in het gekleurde celplasma; MLZ maskeert de LBs meestal geheel (zie ook figuur 6). Voor een uitgebreidere

en diepgaande lichtmicroscopstudie over cel-inhoud wordt Baral (1987a,b, 1992) aanbevolen.

Parafysen

De parafysen zijn de steriele cellen tussen de asci. Zij dienen ter bescherming van de (jonge) asci. De toppen van de parafysen zijn lancetvormig of cilindrisch, en in het laatste geval kunnen ze apicaal gezwollen zijn en al dan niet ingebed in een gellaag die de asci afdekt (epithecium; zie figuur 1). In *Orbilia* zijn ze bijvoorbeeld aan de top knopvormig verdikt. Op soortniveau wordt de lengte die de parafysen uitsteken boven de asci als kenmerk gezien (noteer levende of dode asci!). De inhoud van de parafysen bestaat voornamelijk uit plasma waarin zich soortspecifieke lichtbrekende vacuolelichamen kunnen vormen. Deze VBs zijn de oorzaak van het bij beschadiging of indroging roodbruin



Figuur 6: Olie druppels in vier maal dezelfde ascospore in verschillende media.

krimpen ze (zie figuur 6). In sommige gevallen, bijv. in *Phaeohelotium*, worden ze dan ook bruin van kleur. Sporen bevatten meestal oliedruppels die qua spreiding (levend) en hoeveelheid redelijk constant zijn op soortniveau. Let er op dat de spreiding er bij levend en dood materiaal en in verschillende media zeer verschillend uitziet (figuur 6). De oliehoeveelheid in de sporen blijft onveranderd in dood materiaal en kan worden weergegeven in de schaalverdeling die hiervoor is ontworpen door Baral, en gepubliceerd door Gminder (1996). In het Nederlandse taalgebied is ze ingevoerd door Declercq (2002), die er de naam Olie Inhoud Index (O.I.I.) voor gebruikt (zie tabel 2). Verder kan men eventueel in de sporen nog een glycogeendepot als een roodbruin lichaam waarnemen in een preparaat dat gekleurd is met LUG. De sporewand kan soms ook paars-violet verkleuren in CRB of CB, of in een kleurloos gelatineus omhulsel verpakt zitten.

Haren

Onder haren worden verstaan cellen die zich door vorm, kleur, afmetingen, consistentie of bekleding onderscheiden van het excipulum waaruit ze voortkomen. Hierbij is het belangrijk te letten op de volgende kenmerken.

- Vorm (taps toelopend, puntig, cilindrisch, apicaal gezwollen etc.);
- Bekleding (buitenkant van de haren kaal, of met granulatie, kristallen, stekels of harsafscheidingen (zijn deze vast, los of oplosbaar in verhitte KOH of CB?));
- Wanddikte (is de haar dik of dunwandig?);

verkleuren van witte vruchtlichamen bij sommige soorten. Voor de chemische reacties van deze VBs zie onder het kopje “Celinhoud”.

Sporen

De sporen kunnen ééncellig tot veelvoudig gesepteerd zijn. In sommige gevallen worden door de ascosporen secundaire sporen gevormd, de zogenaamde ascoconidiën. Dit soort kenmerken heeft vooral diagnostische waarde als ze worden waargenomen aan sporen in levende asci of aan recent uitgestoten sporen. Veel soorten vormen namelijk (secundaire) septen enige tijd nadat ze zijn vrijgekomen of kort voor de kieming (dit kan ook in de afgestorven asci plaatsvinden). Bij afsterven veranderen de sporen ook van afmetingen: net als elk ander weefsel

Tabel 2: De olie-inhoud-index (OII) (naar Declercq (2002)).

OII	percentage olie
0	zonder olie
1	ca. 3% van het sporenvolume
2	ca. 10%
3	ca. 25%
4	ca. 50%
5	ca. 80%

- Pigment (zijn de haren gekleurd, en zo ja zit het pigment in het celsap (intracellulair) of in de wand (pariëtaal)?);
- Septering (zitten er dwarswandjes in de haren, en zo ja, hoe zijn ze verdeeld: gelijkmatig, of apicaal of basaal geconcentreerd?);
- Glasachtige delen of wandverdikkingen (reageren deze in LUG of MLZ, bestaan ze uit wandeigen materiaal of niet?).

Dit laatste kenmerk is aan te tonen door 10% KOH toe te voegen aan het preparaat om te zien of de haarwand of delen daarvan oplosbaar zijn of hun lichtbrekendheid verliezen. Hierna wordt CR toegevoegd, dit zal dan al het wandeigen materiaal moeten kleuren. Vaak worden na KOH voorbehandeling ook de jodiumreacties duidelijker. Bij *Olla*-soorten, bijvoorbeeld, kleuren de massieve, glasachtige haren in jodium roodbruin, en ook in sommige *Hyaloscypha*-soorten gebeurt dat bij delen van de haren.

De laatste stap

Ten slotte, voor wie een collectie wil bewaren is het aan te raden om op het substraat de plaats van de vruchtlichamen te merken met een stift. Dit om later nog iets terug te kunnen vinden, aangezien de vruchtlichamen sterk krimpen en vaak ook verkleuren bij indroging. VEEL SUCCES!

Ten slotte wil ik G. Verkley en L. Rommelaars bedanken voor het kritisch doorlezen van de tekst en hun waardevolle aanvullingen, en J. van Brummelen voor toestemming voor het reproduceren van figuur 2.

Literatuur

- 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. *Z. Mykol.* 53: 119-136
- Baral, H.O. 1992. Vital versus herbarium taxonomy: Morphological differences between living and dead cells of ascomycetes, and their taxonomic implications. *Mycotaxon* 44(2): 333-390
- Brummelen, J. van, 1967: A world monograph of the genera *Ascobolus* and *Saccobolus*. Persoonia, suppl. 1: figuur 1
- Declercq, B. 2002. Studies omtrent het genus *Pyrenopeziza*. *Sterbeekia* 21/22: 67-73
- Dennis, R.W.G. 1981. British ascomycetes (2nd revised ed.). Cramer, Vaduz
- Gminder, A. 1996. Studien in der Gattung *Mollisia*. *Z. Myk.* 62: 181-193
- Huhtinen, S. 1987. Three new species and the histochemical delimitation of genera in the glassy haired Hyaloscyphaceae. *Mycotaxon* 29: 267-283
- Korf, R.P. 1951. A Monograph of the Arachnopezizeae. *Lloydia* 14 (3):129-180
- Nannfeldt, J.A. 1932. Studien über die Morphologie und Systematik der Nicht-Lichenisierten Inoperculaten Discomyceten. *Nov. Act. Reg. Sci. Upsal. Ser. 4*, vol. 8(2): 1-368
- 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, Leiden (NL)
- Verkley, G.J.M. 1998. De ascus en de ascomyceten. *Coolia* 41(4): 202-211