Kernfärbung und Färbung von sideriphilen Granula nach Clemencon 2009

Karmin ist einer der ältesten Farbstoffe, die in der Mikroskopie verwendet werden. Es kann sowohl in Säure, als auch in basischen Lösungen verwendet werden um Zellkerne, siderophile Körnchen und das Deuteroplasma von einigen sekretorischen Hyphen und Cystidien zu färben.
Die weitverbreitete Acetokarminfärbung ist eine gesättigte Lösung aus Karmin in 45-50% Essigsäure zur Färbung von Chromosomen (SEMICHON 1924; BELLING 1926). Die meisten kommerziellen Lösungen sind nicht besonders hilfreich für die Mykologie, da sie zu niedrige Mengen Karmin enthalten. Es wird daher empfohlen das Acetokarmin wie in Box 10 beschrieben herzustellen. Die Lösungen müssen nahezu undurchsichtig dunkelrot sein. Sie kann auf unbestimmte Zeit gelagert werden. Eisen ist notwendig um Zellkerne und siderophile Granula zu färben.
Eisen-Acetokarmin für Zellkerne (Box 10; Abbildungen 2.6, 2.7A-C).
Das Zytoplasma sollte schwach rosa oder nahezu farblos sein, Chromosomen, Nukleoli und Spindelpolkörper dunkelrot oder sogar schwarzrot. Chromatin wird nicht erhalten, und Interphasezellkerne erscheinen körnig (korrekt fixiertes Chromatin erscheint homogen und unstrukturiert). Siderophile Granula in Basidien, falls vorhanden, werden intensiv gefärbt.

FM-Acetokarmin zur Färbung von siderophilen Granula in Basidien (Abbildungen 2.6; 2.7D). Die Lösung FM („Fixation & Mordant") ergibt eine stärkere Färbung bei Anwesenheit von anderen Metallen (CLEMENCON 1978), und das Material kann für einige Wochen darin gelagert werden.
Es ist wichtig anzumerken, dass die Farbe fast unmittelbar verblasst, wenn das Material in Chloralhydratlösung zerquetscht wird, die Farbe aber in Hoyer's Medium stabil ist, auch wenn dieses große Menge Chloralhydrat enthält.
FM-Acetokarmin färbt auch Zellkerne (Abbildung 2.7E), aber in Basidien und Asci verdeckt die Hintergrundfärbung des Zytoplasmas oft die Kerne.
Heißes Acetokarmin ohne Eisen färbt Teile des Deuteroplasmas der Chrysocystidia (Abbildung 2.7F). Das Pilzmaterial wird in Acetokarmin bis zum Siedepunkt zwischen Objektträger und Deckgläschen erhitzt und dann gequetscht. Kein Eisenbeizmittel wird verwendet und Fixierung ist nicht nötig.

BOX 10: EISEN-ACETOKARMIN
ENTWICKELT um Zellkerne, siderophile Granula in Basidien, siderophile Wände zu zeigen.

HERSTELLUNG

FM:

10% $FeCl_3$ in 50% Essigsäure	5ml
10% Cu-Acetat in 50% Essigsäure	5ml
Pikrinsäure, gesättigte wässrige Lösung	5ml
Konz. Formaldehyd	5ml
1% Pb-Acetat in 50% Essigsäure	1ml

Die erstere Azetatlösung muss langsam Tropfen für Tropfen zugegeben werden, um Niederschlagsbildung zu vermeiden.
FM ist stabil und toxisch!

Acetokarmin:
In einer gut verschlossenen Flasche 3g Karmin in 100ml 50% Essigsäure lösen, für 2 Tage bei 90-95°C inkubieren, gelegentlich umrühren. Nach dem abkühlen filtrieren. Überschüssiges Karmin kann wieder verwendet werden.

AE31: Ethanol-Essigsäure: 3 Volumenanteile 95-96% Ethanol + 1 Volumenanteil konzentrierte Essigsäure.

Hoyer's Medium:
Gummi in Wasser bei 50-60°C in einer gut verschlossenen Flasche auflösen. Klare Stücken Akaziengummi verwenden, kein Pulver. Es dauert etwa 1 Tag, um es aufzulösen. Dann Chloralhydrat hinzugeben und gelegentlich umrühren. Anschließend das Glycerol einrühren. Es sind verschiedene Varianten dieses Mediums publiziert worden. Das hier verwendete, scheint das Beste zu sein.

Destilliertes Wasser	25ml	Akaziengummi (Gummi arabicum)	15g
Krist. Chloralhydrat	100g	Konz. Glycerol	8ml (=10g)

VERWENDUNG:

FM-Acetokarmin für siderophile Granula in Basidien und siderophile Wände (Abbildung 2.6.).

1. Frisches Pilzmaterial oder rehydriertes Trockenmaterial (0.2-0.5mm² einer Lamelle sind ausreichend) wird in einem kleinen Behälter für 5-10 min in einige Tropfen FM gegeben (es kann auch für einige Monate in FM gelagert werden).
2. Die Probe wird anschließend direkt in ein mit Acetokarmin gefülltes Eppendorfröhrchen gegeben. Es ist wichtig nicht zu spülen, da ein bisschen der Beize in der Farblösung vorhanden sein muss. Das Eppendorfröhrchen muss gut schließen sonst öffnet es sich während des Erhitzens im Wasserbad im Reagenzglas. Die Lösung muss sich nahezu schwarz färben aufgrund der Anwesenheit des Beizmittels.
3. Nach dem Kochen für 2 min wird kaltes Wasser in das Reagenzglas gegeben und das Eppi herausgeholt. Gießen sie den Inhalt auf ein festes Papiertuch (evtl. müssen sie dafür heftig klopfen). Das Pilzmaterial (jetzt fast schwarz) wird mit einer Nadel aufgenommen und in einen großen Tropfen Hoyer's Medium auf einem Objektträger gegeben. Tauchen Sie das Material unter und rühren Sie um sicher zu stellen, dass die Probe gut penetriert wird vom Medium. Nehmen Sie eine kleine (!) Menge des gefärbten Materials und zerquetschen Sie es in einem kleinen Tropfen Hoyer's Medium auf einem neuen Objektträger. Die Präparation wird trocknen und dauerhaft werden, und die Färbung wird nicht verblassen.

Zellkerne und Chromosomen in sich entwickelnden Basidien und Asci.

1. Kleine Proben für 1-3h bei Raumtemperatur in Ethanol-Essigsäure tauchen, ohne einen Unterdruck zu erzeugen.
2. Aus dem Fixativ direkt in 20% (nach Volumen) Schwefelsäure überführen. 1-2h bei Taumtemperatur.
3. 30-60 min bei Raumtemperatur in 1-5% Eisen(III)chlorid (normalerweise reicht 1%).
4. 1-2h bei 90°C oder in einem kochenden Wasserbad in Acetokarmin.
5. In Hoyer's Medium einbetten.

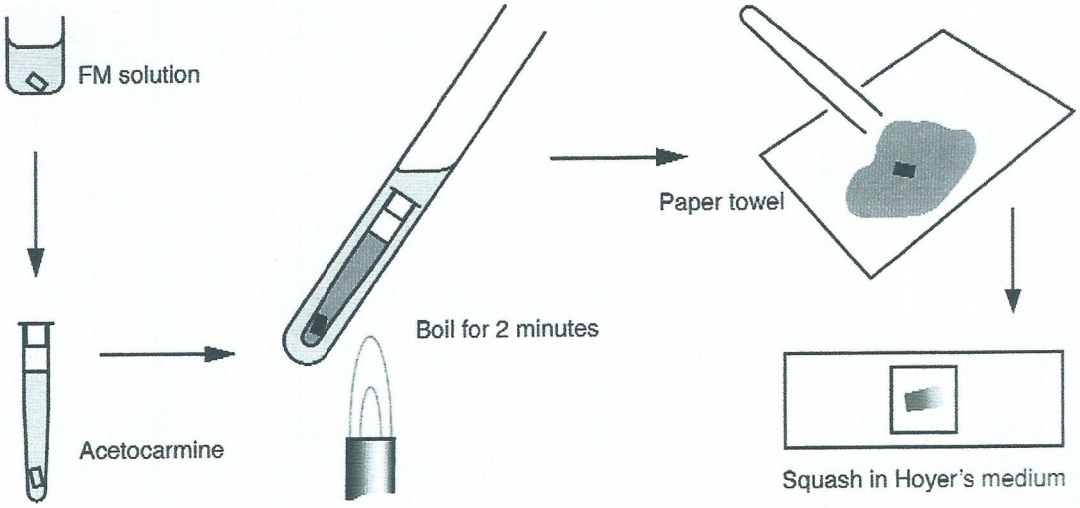

Abbildung 2.6. Färbung von siderophilen Granula in Basidien. Kleine Probe einer Lamelle in FM für 2-5 min fixieren, dann in ein mit Acetokarmin gefülltes langes, enges Eppendorfröhrchen mit langem Pfropfen überführen, dabei sicherstellen dass der Pfropfen richtig sitzt. Für 2 min in kochendem Wasser erhitzen (oder für 10-20 min bei etwa 90°C in einen Ofen geben), dann das Eppi auf einem Papiertuch ausleeren. Eine kleine Menge des fast schwarz gefärbten Materials in einen Tropfen Hoyer's Medium geben und quetschen.

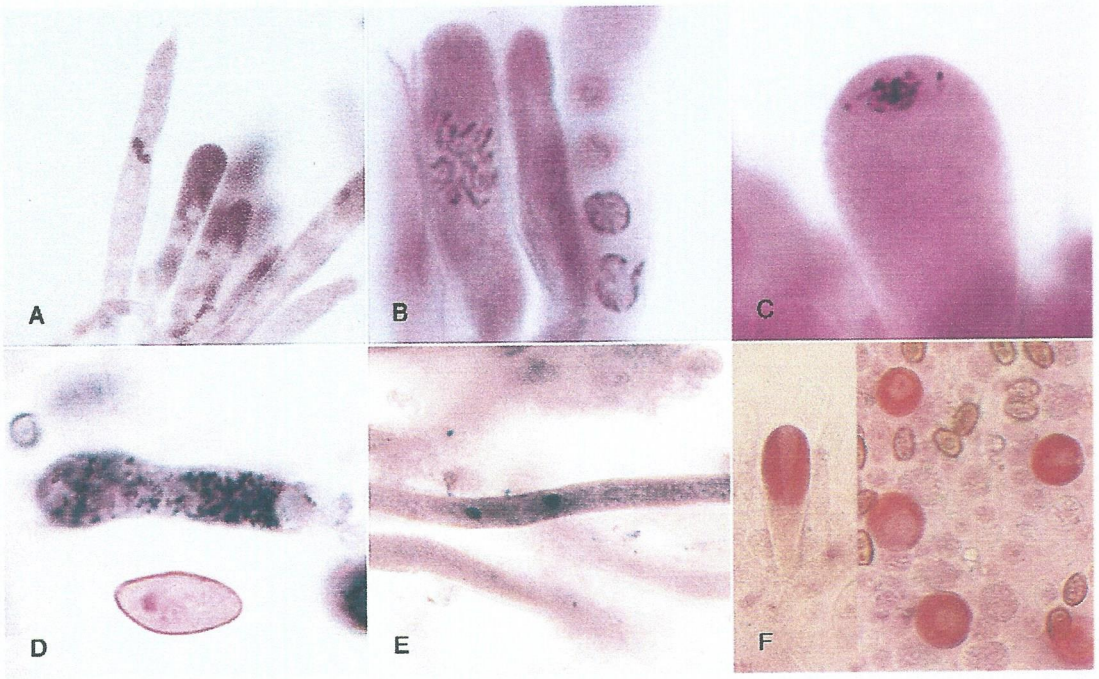

Abbildung 2.7. Färbung mit Karmin. A-C: Ethanol-Essigsäure-Fixierung, Hydrolyse mit Schwefelsäure, Eisenchlorid, Acetokarmin. A: *Russula firmula*, hymeniales Gloeocystidium mit 2 Zellkernen. B; *Mycena aetites*, linke Basidie mit diploidem Kern während der Prophase der Meiose; Chromosomen. Rechte Basidie mit 4 post-meiotischen Zellkernen, Chromatin teilweise aufgelöst. C: *Lepiota magnispora*, erste meiotische Teilung; Chromosomen und 2 Spindelpolkörper. D-E: FM-Acetokarmin. D: *Lyophyllum* spec., Basidie mit siderophilen Granula, und eine Spore mit siderophilen Wänden und einem Zellkern. E: Zweikernige Hyphe von der Pileusoberfläche von *Climacocystis borealis*. F: Heißes Acetokarmin ohne Eisen, Chrysocystiden von *Hypholoma lateritium* in frontaler und axialer Sicht.