

INITIATION ET PERFECTIONNEMENT A LA MICROSCOPIE

Société Mycologique du Dauphiné

(Samedi 7 novembre 2015)



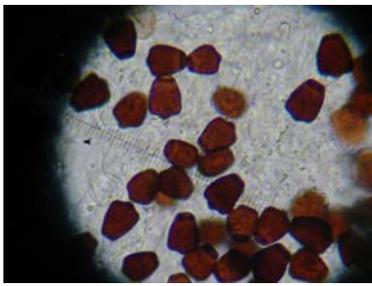
11 personnes ont assisté à cette journée dans une ambiance studieuse et sympathique où chacun s'est enrichi des connaissances de l'autre.

Programme de la matinée :

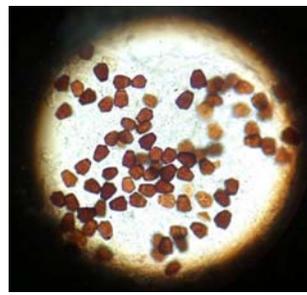
- . Présentation d'un diaporama
(principes de base concernant la microscopie – réactifs microchimiques – étude des spores...)
- . Examen microscopique des spores de différents genres :
 - amyloïdie des spores d'amanites.
 - amyloïdie des ornements des spores de différentes espèces.
 - forme et dimensions des spores.

Programme de l'après-midi :

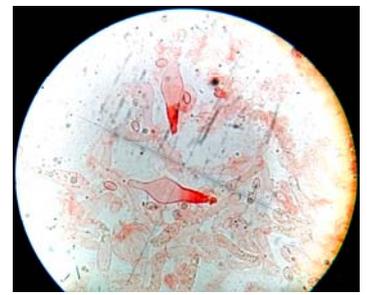
- . recherche des cystides d'un melanoleuca et examen des spores.
- . recherche de boucles sur *Tricholoma pardinum* et comparaison avec *Tricholoma orirubens*.
- . recherche de cheilocystides sur *Hebeloma edurum*.
- . recherche de chrysocystides sur *Hypholoma fasciculare*.
- . pratique de coupe et examen microscopique de la cuticule de *Tricholoma terreum*.



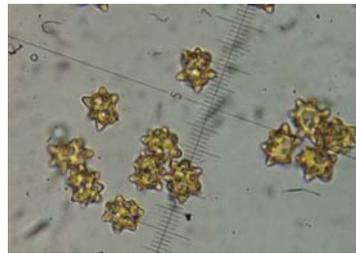
spores de *Coprinus angulatus*



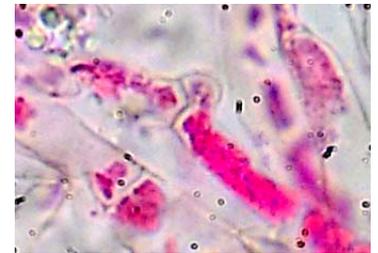
cystides de *Melanoleuca*



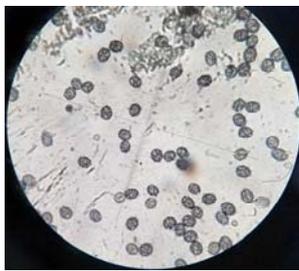
spores amyloides d'amanite



spores d'*Inocybe asteropora*



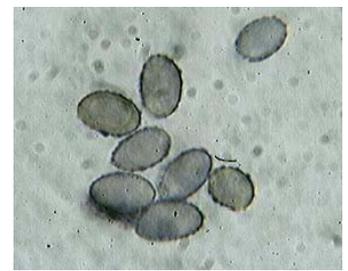
hyphe bouclée de *Tricholoma pardinum*



spores de *Lactarius decipiens*



vue de face



spores de *Melanoleuca*

vue de profil

Photos de Marcela Maftoul, Jean-Paul Serra-Tosio & Alessandro Cresti

QUELQUES PRINCIPES DE BASE AVANT DE COMMENCER

- Connaître les principaux réglages du microscope.
- Bien choisir l'emplacement du microscope.
- Etudier toujours des spécimens frais et adultes.
- Limiter au maximum les manipulations et utiliser les outils appropriés.
- Adapter la préparation à ce que l'on cherche suivant le champignon à étudier
(Choix du réactif, de la coupe, ...)
- Savoir renoncer en cas de doute et ne pas hésiter à refaire une préparation.
- Soigner les préparations (coupes minces – éviter les bulles d'air - ...)
- Commencer l'observation sous un petit grossissement et choisir la partie la plus intéressante à examiner.
- Décrire les caractères observés avec précision (choix du vocabulaire).

CE QU'IL FAUT FAIRE OU NE PAS FAIRE

- Toujours refermer le flacon de réactif après chaque utilisation.
- Ne pas toucher l'objet à examiner en déposant la goutte de réactif.
- Ne jamais utiliser l'huile à immersion avec un objectif non approprié.
- Nettoyer les lames, rasoirs et instruments après chaque usage, de même que l'objectif à immersion.

LES REACTIFS MICROCHIMIQUES DE BASE

Ce sont les réactifs indispensables pour toute détermination et utilisés dans plus de 80 % des cas.

L'eau (eau du robinet – eau distillée – eau bidistillée – eau salée ou sucrée)

- L'eau est un réactif regonflant que l'on devrait utiliser en premier (pour éviter tout risque de dissolution de certains éléments par des produits chimiques et pour apprécier les couleurs réelles s.m.). Dans la pratique, du fait de son très faible indice de réfraction (avec pour conséquence des préparations +/- lisibles), on préfère utiliser directement des réactifs plus appropriés.
- L'eau du robinet est suffisante pour une détermination classique, l'eau distillée ou bidistillée étant réservée à la préparation de réactifs aqueux ou pour des utilisations particulièrement pointues.
- L'eau salée ou l'eau sucrée favorisent la concentration des pigments de certaines cellules.

Le rouge congo (ammoniacal – aqueux SDS)

- Colorant universel, le rouge congo ammoniacal est excellent pour toutes les observations courantes : il permet de regonfler les cellules à observer et de colorer par contraste les parois des cellules à observer.
- Le rouge congo aqueux SDS (Sodium – Dodecyl – Sulfate) assure une excellente coloration tout en regonflant les tissus à observer.

La phloxine (ou éosine)

- La phloxine, utilisée seule, colore les cellules à observer en rose et permet de mettre en évidence certains éléments difficilement lisibles dans d'autres réactifs (terminaisons de poils, de cystides, ...)
- Utilisée avec la potasse, elle permet de regonfler les tissus +/- coriaces, tout en les colorant en rose. Très utile lors d'un travail sur exciccata et pour déterminer des Polypores, des croûtes, ...

Les bases fortes (Potasse ou soude)

- La potasse à 5 % est généralement utilisée pour étudier des structures particulièrement dures, pour observer la disposition des éléments entre eux ou pour les dissocier. (observations des boucles, de certains ornements) On l'utilise souvent en mélange avec la phloxine en guise de colorant.

Le Melzer

- Réactif iodé permettant de mettre en évidence l'amyloïdité (coloration en gris ardoise) ou la dextrinoïdité (coloration en brun rouge foncé) de certains éléments.
- Il colore en bleu l'extrémité des asques de certains Ascomycètes (notamment chez les Pézizes)
- Il colore en gris ardoise les parois des spores de certains champignons (spores amyloïdes)
- Il permet de contraster l'ornementation des spores de Russules, Lactaires, Melanoleuca dont l'rd verrues sont amyloïdes.

RECUEIL DES SPORES

S'assurer tout d'abord :

- Que le champignon à étudier n'a pas été en contact avec d'autres
- Que les spores sont bien mûres (donc prélevées sur un sujet adulte).

Recueil d'une sporée (spores en masse) :

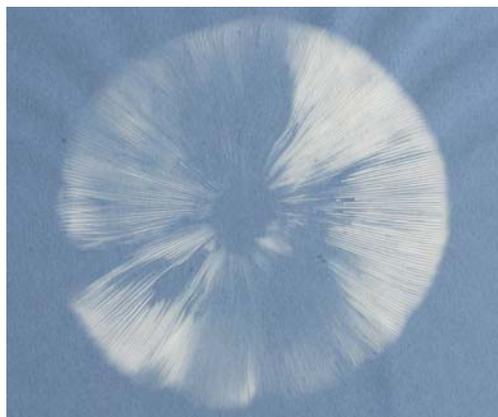
Pour cela poser le chapeau ou un morceau du chapeau à étudier sur du verre, par exemple sur une lame porte-objets (hyménium vers le bas) – poser un coton imbibé d'eau sur le chapeau et le recouvrir d'un bol ou tout autre récipient. Attendre de 12 à 24 heures pour recueillir une sporée suffisante. Il suffit ensuite de disposer les spores pour l'étude microscopique.

Pour apprécier la couleur des spores, les ramener en tas avec une lame de rasoir et transporter le tout sur une feuille de papier noir.

Si l'on veut contrôler l'amyloïdie, poser une goutte de melzer sur les spores en tas. Elles noirciront si elles sont amyloïdes.

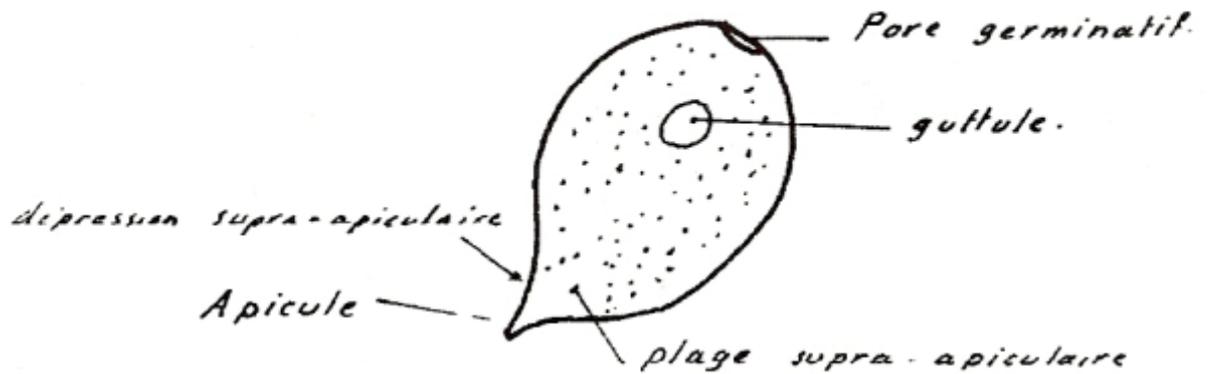


- . Si on dispose de peu de temps, déposer un morceau de l'hyménium sur une lame porte-objets ; Attendre une demi-heure et rechercher les spores tombées.
- . Si on est très pressé, tapoter le chapeau au-dessus de la lame porte-objets ; Avec un peu de chance et d'expérience on trouvera quelques spores bien mûres et bien dégagées.
- . Une dernière méthode, la plus utilisée mais la moins efficace, consiste à rechercher les spores noyées dans l'hyménium, avec le risque d'étudier des spores immatures, et parfois difficilement observables car noyées dans les tissus.



L'OBSERVATION DES SPORES

Détails d'une spore de Basidiomycète



- . L'observation des spores permet d'apprécier des caractères indispensables à la détermination (couleur – forme – dimensions – ornements – réactions).
- . La forme et l'ornementation des spores sont des caractères généralement homogènes dans un même genre. D'où le rôle pédagogique du microscope..
- . Pour chaque genre, il est indispensable de faire le bon choix concernant les réactifs ou les milieux d'observation utilisés.
 - . Spores de Russules et de Lactaires dans le Melzer.
 - . Champignons coriaces (Polypores – exsiccata ...) dans la Phloxine + KOH ...

La forme et l'ornementation

- . Penser qu'une spore représente un volume, non une surface : Il faut donc en examiner plusieurs dans toutes les positions en modifiant judicieusement la profondeur de champ.
 - . Une spore peut être allantoïde, amygdaliforme, citriforme, cylindracée, elliptique, pruniforme, globuleuse, oblongue, phaséoliforme, réniforme, ventrue, ... tous ces termes étant rigoureusement définis.
 - . Une spore peut être lisse, ruguleuse, pustuleuse, verruqueuse, échinulée, gibbeuse, caténulée, cristulée, ailée, réticulée, ... Utiliser toujours le qualificatif le plus juste si l'on veut être compris de tous.

Les dimensions

- . Mesurer les spores les plus représentatives et noter les dimensions des spores mûres.
- . Noter le rapport longueur/largeur (Q)
- . Ne mesurer que les spores bien horizontales, extrémités bien nettes (apicule visible pour les basidiomycètes).
- . Les dimensions extrêmes de quelques spores, sont entre parenthèses.
Exemple de notation : (5) 8-10 x 5-6 (12) μ avec $Q = 1,6 - 1,7$.

Autres caractères

- . Noter la présence éventuelle d'un pore germinatif, d'une plage supra-apiculaire (chez les Russules), de guttules (gouttes oléagineuses).
- . Décrire l'apicule lorsqu'il est caractéristique

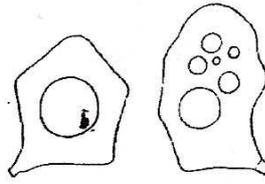
DIFFERENTES FORMES DE SPORES CHEZ LES BASIDIOMYCETES



allantoïdes



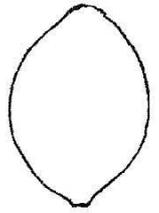
amygdaliforme



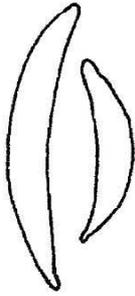
anguleuses



en banane



citriforme



crescentiformes



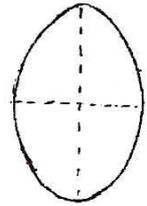
cylindrique



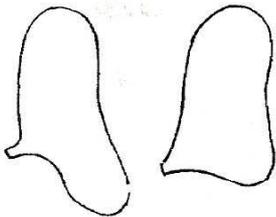
aciculaires



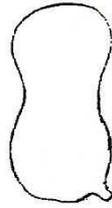
ellipsoïde



elliptiques



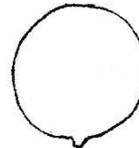
éperonnées



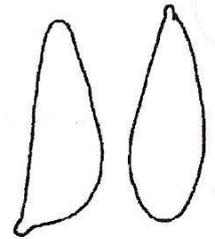
étranglée



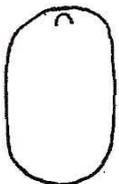
fusiforme



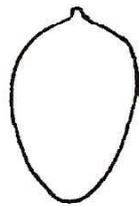
globuleuse



naviculaires



oblongue



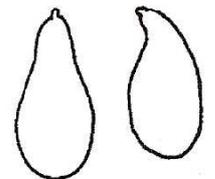
ovoïde



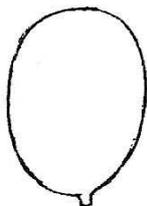
papillée



phaséoliforme



piriformes



pruniforme



réniforme



**rhomboïdale
ou losangique**

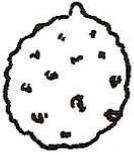


sigmoïde

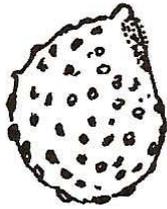


triangulaire

DIFFERENTS TYPES D'ORNEMENTATION SPORIQUE



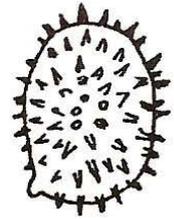
spore ruguleuse



spore verruculeuse



spore verruqueuse



spore échinulée



spore aculéolée



spore costulée



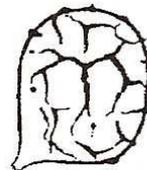
spore ailée



spore caténulée



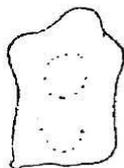
spore cristulée



spore interrupto-réticulée



spore réticulée



spore gibbeuse



spore noduleuse

ORNEMENTATION DES SPORES DE LACTAIRES



Epines isolées



Verrues en partie connectées



Crêtes simples non connectées



Crêtes ramifiées en partie connectées



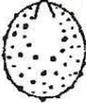
Réticule incomplet à mailles ouvertes



Réticule presque complet

ORNEMENTATION DES SPORES DE RUSSULES

(d'après code de M. Bon)

	A	B	C	D
1	 <i>R. sublevispora</i>	 <i>R. aurora</i>	 <i>R. nigricans</i>	 <i>R. melliolens</i>
2	 <i>R. cyanoxantha</i>	 <i>R. luteotacta</i>	 <i>R. sardonica</i>	 <i>R. raoultii</i>
3	 <i>R. cuprea</i>	 <i>R. paludosa</i>	 <i>R. alutacea</i>	 <i>R. romellii</i>

EXAMEN DE L'ORNEMENTATION DES SPORES D'UNE RUSSULE

. Comme dans le jeu de « batailles navale », Il s'agit de situer les spores de la russule à étudier dans l'une des cases du tableau

exemple de notation : une spore cotée 2B concerne une spore ornée de verrues jumelées de 0,5 μ de haut.

En ordonnée, on notera la hauteur des ornements

1 = pas ou peu de relief.

2 = de l'ordre de 0,5 μ de haut.

3 = de l'ordre de 1 μ ou plus.

En abscisse, on notera l'interconnexion des verrues.

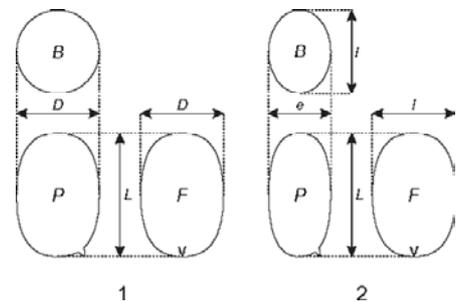
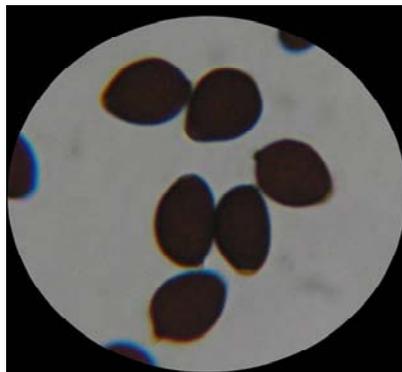
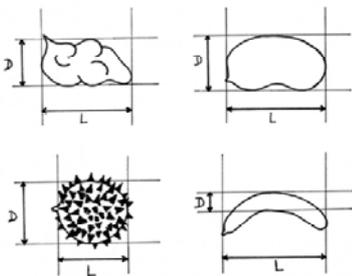
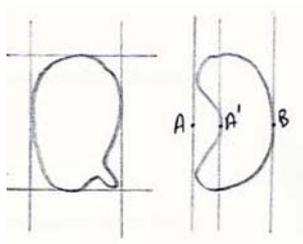
A = verrues isolées.

B = quelques verrues jumelées représentant de très courtes crêtes.

C = verrues reliées de façon à représenter un filet à mailles ouvertes.

D = verrues reliées de façon à représenter un filet à mailles fermées.

Mesure des spores

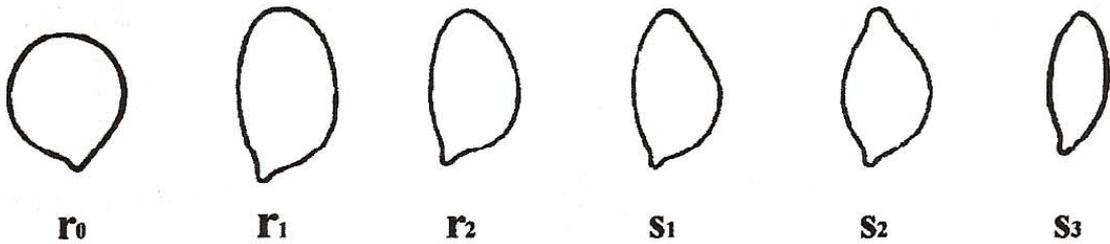


(12) 13-14 X 9-10 (12) μm

Q = 1.4

SPORES DES CORTINAIRES

Forme des spores



subglobuleuses.

ellipsoïdes (sommet largement arrondi)

ellipsoïdo-amygdaliformes (sommet étroitement arrondi)

amygdaliforme (sommet étiré)

limoniforme (sommet papillé)

fusiformes

r0

r1

r2

s1

s2

s3

Ornementation des spores



V1

V2

V3

W

X

C. armillatus

C. varius

C. salor

C. odorifer

C. turmalis

verruës isolées, plus ou moins densément distribuées

petites

v1

moyennes

v2

grandes

v3

grosses verruës plus ou moins coalescentes

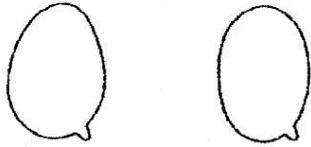
w

spores lisses, pas de verruës visibles

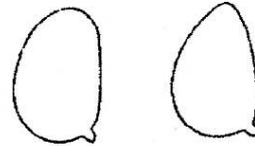
x

SPORES D'INOCYBES

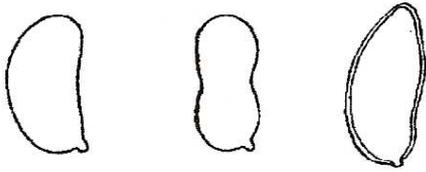
Aspect des spores lisses (sous-genres *Inosperma* et *Inocybe*)



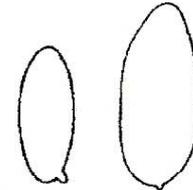
spores ovoïdes ou elliptiques



spores amygdaliformes

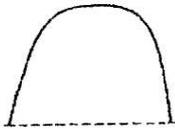


spores phaséoliformes, étranglées
ou à dépression supra-hilaire

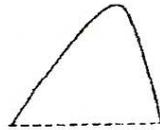


spores cylindriques-allongées

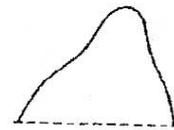
Sommet des spores lisses



sommet obtus



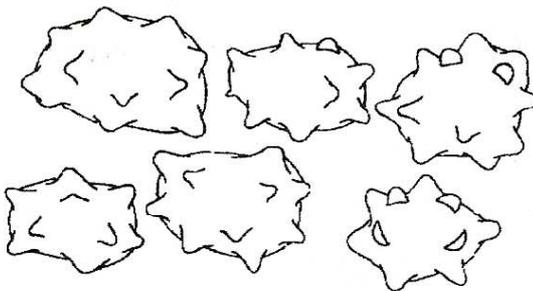
sommet aigu, ogival



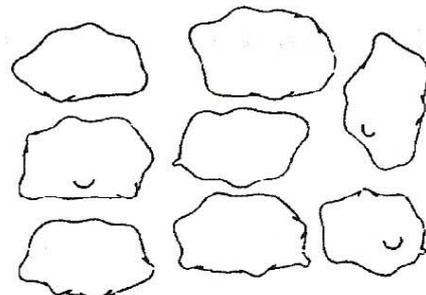
sommet étiré, papillé

Aspect des spores gibbeuses

(sous-genre *Clypeus*)

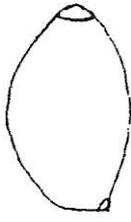


aspérités bien marquées



aspérités peu marquées

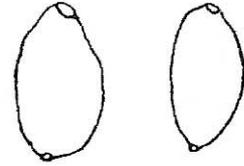
SPORES DE PANAEOLUS



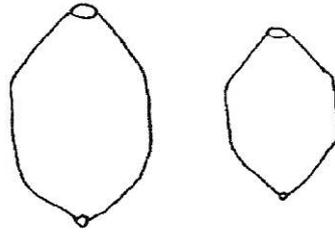
spore lisse



spore verruqueuse

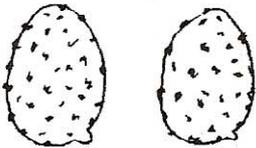


pore germinatif oblique

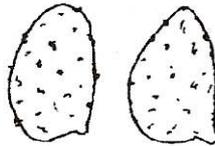


spores anguleuses avec bords presque parallèles

SPORES D'HEBELOMES



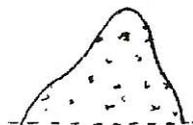
ovoïdes ou elliptiques



amygdaliformes



ectospore décollée



sommets étirés

Le microscope, un outil indispensable à l'étude des champignons ?

Vous avez fait votre demande d'adhésion à une Société mycologique, vous avez payé votre cotisation annuelle: vous avez pleinement droit au titre de MYCOPHYLE, c'est à dire que vous êtes un ami des champignons.

Mais qu'est-ce qui vous a déterminé dans votre démarche ? Très probablement - car la chose est vraie pour la très grande majorité des membres de nos sociétés - dans le but d'apprendre à reconnaître davantage d'espèces à mettre au menu du dimanche, peut être aussi pour éviter de vous intoxiquer, vous-même et les membres de votre cercle familial. Autrement dit, votre intérêt était celui d'un MYCOPHAGE. Aucune raison de considérer ce terme comme péjoratif ! Si notre langue est couverte de papilles gustatives, c'est probablement pour que nous ayons le droit de savourer ce qui est bon. Il existe d'ailleurs une institution officielle en Suisse, la VAPKO, dont le but premier est de protéger les consommateurs de champignons contre de fatals empoisonnements. Les contrôleurs officiels ont subi des examens sérieux, ils connaissent bien plus d'espèces que le commun des mortels.

Parmi les activités de votre nouvelle société, il y a les séances de détermination des Lundis soirs, il y a les sorties et les discussions autour d'une table où sont disposés les champignons récoltés le matin. Bien vite, vous allez constater que certains membres en « savent plus que les autres » et c'est à eux que vous allez demander: comment s'appelle ce champignon ? Est-ce qu'on peut le manger ? Est ce qu'on peut le confondre avec un autre ? Et peut-être aussi: comment fais-tu pour le reconnaître ? Comment faut-il faire pour apprendre ? Si vous avez posé les deux dernières questions, il y a bien des chances pour que vous deveniez un MYCOLOGUE, c'est à dire qu'à l'intérêt du mycophage va se greffer une curiosité supplémentaire vieille comme la Genèse: « Yahvé amena à l'homme toute créature pour voir comment celui-ci les appellerait; chacune devrait porter le nom que l'homme lui aurait donné ».

Si vous continuez sur votre lancée, vous allez apprendre à consulter de bons livres, vous allez rapidement faire de grands pas en suivant les conseils des « anciens »: bien observer les formes et les couleurs, les odeurs et les saveurs, les viscosités, les méchules, la consistance, les éventuels virages de couleur dans le temps ou à la blessure, etc... Chaque année, vous allez apprendre quelques noms et vous serez bientôt à peu près sûr de reconnaître 200 à 300 espèces.

Mais, dans votre société, vous avez été intrigué par l'un ou l'autre membre qui, à peu près chaque Lundi soir, dans son coin, installe un appareil nommé MICROSCOPE. Vous vous posez inévitablement la question figurant dans le titre de ces quelques lignes: cet appareil est-il nécessaire à l'étude des champignons ? Il faut d'abord savoir que l'utilisation d'un microscope en mycologie exige un patient apprentissage. Il est à souhaiter que, dans nos sociétés mycologiques, les utilisateurs expérimentés de ce remarquable outil d'étude aient le souci, et la patience, d'initier graduellement aux techniques spécifiques du microscope ceux qui manifestent de l'intérêt (sans dévaloriser pour autant ceux qui se limitent à la seule observation macroscopique). On peut affirmer d'ailleurs, que les détails observables uniquement à travers les lentilles d'un microscope sont souvent d'une fascinante beauté. Enfin, sans microscope, un grand nombre d'espèces resteraient indéterminables.

La science n'est pas chose statique, elle évolue constamment. Des espèces de champignons qui ne pouvaient être séparées autrefois, ont pu l'être plus tard grâce à l'observation d'importants caractères microscopiques. Qu'on pense simplement à la cohorte des *Inocybes* (spores lisses ou gibbeuses) ou aux *Melanoleuca* (Tricholomes cystidiés et à spores ornementées) ou encore aux *Lyophyllum* (Tricholomes à basides sidérophiles). Qu'on pense au discomycète *Discina spinospora*, qui n'a pu être séparé de la commune *Discina perlata* qu'en 1989, surtout grâce au fait que ses spores sont échinulées, ce qui n'aurait pas été observable sans microscope.