

## Tehnica examenului microscopic al ciupercilor

Caracterele morfologice și/sau ultrastructurale ale ciupercilor pot fi studiate în preparate la microscopul optic și/sau la microscopul electronic.

### 8.4.1. Microscopie optică la ciuperci

Pentru examinare la microscopul optic, ciupercile trebuie fixate pe un suport transparent, într-un mediu al cărui indice de refracție este cât mai apropiat de cel al sticlei. În general, în preparate se montează sporii ciupercilor, împreună cu structurile pe care se formează sau fragmente ori secțiuni din țesuturile vegetale în care acestea se găsesc.

Preparatele microscopice pot fi provizorii sau permanente. Preparatele provizorii se păstrează numai atât cât este necesar pentru examinare rapidă, iar cele permanente pot fi conservate timp îndelungat în colecții. Efectuarea preparatelor presupune parcurgerea mai multor etape: prelevarea, montarea, colorarea, fixarea și lutarea (Constantinescu, 1974).

#### Prelevarea materialului

Pentru efectuarea unui preparat microscopic, de pe substrat (frunze, semințe etc.) sau din cultură, se detașează direct un fragment de ciupercă, folosind un ac spatulat sau un ac de însămânțat. Fragmentul detașat se pune pe o lamă de sticlă, într-un lichid de montare, iar apoi, se acoperă cu lamela de sticlă și se examinează la microscop.

#### Montarea

Pentru efectuarea preparatelor micologice se pot folosi diferite medii de montare (soluții în care se include materialul fungic), precum apa, lactofenolul și altele.

**Apa.** Dacă există suficient material, orice ciupercă trebuie examinată într-un preparat provizoriu în apă, deoarece niciun mediu de montare nu are un indice de refracție, atât de scăzut, precum apa.

**Lactofenolul.** Este folosit frecvent în micologie, deoarece într-o singură operație, se asigură fixarea, clarificarea țesuturilor, colorarea (dacă se adaugă un colorant) și conservarea (Constantinescu, 1974).

Se prepară din:

Fenol cristalizat .....	20 g
Glicerină .....	31 ml
Acid lactic .....	16 ml
Apă distilată .....	20 ml

Primele trei componente se amestecă și se încălzesc până se dizolvă cristalele de fenol. Se filtrează prin hârtie de filtru și se obține astfel lactofenolul anhidru. Acesta se poate hidrata prin adăugarea apei distilate (Constantinescu, 1974). La prepararea lactofenolului hidratat, se încălzește fenolul cu apă până la dizolvare, apoi se adaugă acidul lactic și glicerina. Pentru a împiedica oxidarea (înnegrirea) sa, lactofenolul se păstrează în sticle brune (Șerbănescu-Jitariu și colab., 1983).

**Cloral-lactofenol.** Acest lichid de montare are un indice (1,49) de refracție ridicat și clarifică mai bine decât lactofenolul (Dade, 1960 a, citat de Constantinescu, 1974).

Se prepară din:

Cloral hidrat (cristalizat) .....	20 g
Fenol (cristalizat) .....	10 g
Acid lactic .....	10 ml

**Acidul lactic.** Este un lichid (mediu) foarte bun de montare, dar mărește volumul materialelor incluse (Constantinescu, 1974). La acidul lactic, se poate adăuga bleu coton sau alt colorant.

## Colorarea

Pentru colorarea citoplasmei și pereților celulari la ciuperci, se folosesc diferiți coloranți.

**Bleu coton (Albastru de anilină, Cotton blue) în lactofenol.** Se folosește pentru colorarea citoplasmei celulelor fungice. Se prepară din 1,0 g bleu coton pulbere la 200 ml apă distilată, se încălzește, se agită până la dizolvarea completă a colorantului și apoi se filtrează. Se amestecă (per volum) o parte din soluția obținută cu 4 părți lactofenol anhidru. Astfel, se obține o soluție cu o concentrație de 0,1%.

Colorarea se poate face prin introducerea materialului prelevat în soluție concentrată (0,1%), încălzire și apoi transferare în lactofenol pur sau prin montarea directă în soluție diluată. Soluția diluată se obține din o parte bleu coton 1% în lactofenol și 2 părți lactofenol hidratat.

**Bleu coton în acid lactic.** Se obține prin dizolvare, la temperatura camerei, a 0,05 g bleu coton pulbere în 30,0 ml acid lactic. După 24 ore, soluția se filtrează. Este un colorant la fel de bun ca bleu coton în lactofenol (Constantinescu, 1974).

**Bleu coton în acid acetic.** Colorantul se prepară din apă distilată (100 ml), bleu coton (0,5 g) și acid acetic (3 ml). Este indicat pentru colorarea culturilor fungice pe lame sau a secțiunilor prin țesuturi vegetale care conțin ciuperci.

Cultura se deshidratează la 37°C, se fixează cu o picătură de alcool etilic 95% care se lasă să se evapore. Se colorează cultura câteva minute cu o picătură de colorant, se spală în apă, se deshidratează cu alcool etilic și se montează în balsam (Constantinescu, 1974).

**Albastru de tripan (Trypan blue).** Colorează citoplasma în albastru-indigo și se folosește în concentrație de 0,1-0,5% în acid acetic. De asemenea, se poate folosi în concentrație de 0,2% în lactofenol. Încălzirea preparatului grăbește colorarea, care se continuă, apoi, în timp.

**Fucsina acidă.** Este un colorant citoplasmatic care se prepară din 0,1 g fucsina acidă în 100 ml lactofenol.

**Lacto-fucsina.** Este un colorant superior bleu cotonului în lactofenol, deoarece colorarea este mai rapidă, iar celulele se văd mai bine și pot fi fotografiate cu ușurință. Acest colorant citoplasmatic se prepară din 0,1 g fucsina acidă care se dizolvă în 100 ml acid lactic anhidru.

## Montarea și lutarea preparatelor microscopice

Montarea și colorarea materialului fungic prelevat se fac concomitent pe aceeași lamă de sticlă, folosind lichide de montare care conțin colorant (fucsina acidă, lactofucsina, bleu coton în lactofenol etc.). Dacă lichidul de montare nu conține colorant, atunci, colorarea se face înainte de montare.

Lamele de sticlă și lamelele folosite pentru efectuarea preparatelor microscopice trebuie spălate cu detergent, clătite cu apă de robinet, apă distilată și apoi uscate. După curățire, lamele și lamelele se păstrează în alcool etilic 70% sau în vase de sticlă acoperite, pentru a fi ferite de praf. În cazul păstrării în alcool etilic, lamele și lamelele se scot din lichid și se șterg cu o pânză moale, curată, înainte de utilizare.

## Montarea materialului

Pe o lamă microscopică curată se pune la mijloc sau la 1/3 față de unul din capete o picătură din lichidul de montare (fucsina acidă, lactofucsina, bleu coton în lactofenol etc.). Materialul fungic – miceliu, spori etc. – prelevat se pune apoi în lichidul de montare de pe lamă, cu ajutorul unui ac de înșămânțat. După aceea, se așează lamela cu o latură pe suprafața lamei, la o distanță mică față de picătura de lichid. Cu ajutorul unui ac, se coboară lent lamela peste picătura din lichidul de montare. Dacă lichidul de montare este foarte fluid, lamela se ține paralel cu lama, la o distanță foarte mică și se așează apoi. Astfel pregătit, preparatul microscopic se poate examina la microscop. Dacă dorim să realizăm preparat durabil, acesta se încălzește până la evaporarea completă a urmelor de lichid.

## Etanșarea sau lutarea preparatelor

Etanșarea preparatelor în medii lichide este necesară, pentru a evita evaporarea lichidului de montare și pentru obținerea unor preparate durabile. Preparatele microscopice montate în medii (balsam de Canada, gumă arabică, glicerină gelatinată etc.) care se solidifică, nu se etanșează.

Pentru lutarea preparatelor, se folosesc diferite materiale, precum lacul pentru unghii, rășini naturale, rășini sintetice etc. (Constantinescu, 1974).

#### **8.4.2. Microscopie electronică la ciuperci**

Caracteristicile morfologice ale ciupercilor pot fi evidențiate în preparate, la microscopul electronic scanning, iar cele ultrastructurale, la microscopul electronic cu transmisie, conform datelor din literatură (Vanky, 1994; Hayat, 2000).

Pentru evidențierea caracteristicilor ultrastructurale la microscopul electronic cu transmisie, se parcurg următoarele etape, necesare realizării unei probe: recoltarea materialului micologic; prefixarea cu soluție de glutaraldehidă (2,7%) în tampon fosfat; spălări succesive cu tampon fosfat 0,15 M (după a patra spălare se lasă peste noapte, la frigider); postfixarea în soluție de OsO<sub>4</sub> 2 % în tampon fosfat 0,15 M; deshidratarea în soluții de acetonă de concentrații crescătoare (50%-100%); infiltrarea și includerea în rășină poliestică; efectuarea secțiunilor la ultramicrotom și contrastarea cu acetat de uranil și citrat de plumb; examinarea secțiunilor la microscop, analiza imaginilor și interpretarea rezultatelor.

Pentru evidențierea aspectelor morfologice ale ciupercilor, la microscopul electronic scanning, trebuie parcurse următoarele etape: recoltarea directă a probelor; centrifugarea materialului, dacă este necesar; acoperirea materialului, prin stropire, cu Au sau Ag, în vid; examinarea probei la microscop, analiza și interpretarea rezultatelor.