

Préparation extemporanée : observation des éléments d'une lame de Basidiomycète !

Afin de répondre à une série de questions formulées par diverses personnes, nous allons vous décrire ici notre manière de travailler, afin d'obtenir des préparations extemporanées permettant la réalisation de photos correctes (c'est-à-dire avec une couleur générale qui ne soit ni terne ni sombre) et bien contrastées.

Ceci ne constitue pas une solution universelle ni miraculeuse : c'est la narration d'une expérience personnelle qui donne de bons résultats ! mais il en existe sans doute beaucoup d'autres, et vraisemblablement meilleures ! ...

Nous précisons également que l'objet ici n'est pas d'étudier les spores, mais bien les cystides diverses, basides, hyphes, trame, etc.....

Il s'avère possible de transformer ces préparations extemporanées en préparations définitives, avec peu de manipulations supplémentaires !

Recherche des éléments constitutifs d'une lame de Basidiomycète

1/ Travail sur du matériel frais

Notre choix se porte sans hésitation vers le rouge Congo SDS (voir sa fiche technique), qui met en évidence de manière remarquable la finesse des détails et qui s'avère sans égal à nos yeux pour l'étude de matériel frais.

1. Comme les spores ne nous intéressent pas directement, nous n'hésitons pas à rincer rapidement la surface fertile du sporophore, afin d'éliminer les éventuels grains de sable et les particules de terre (c'est indispensable pour les espèces ammophiles).
2. Prélever un petit fragment de lame du champignon avec une pince fine et le déposer sur une lame porte-objet
3. A l'aide d'une lame de rasoir mécanique, retailer le fragment de manière à obtenir un fragment d'à peine 1,5 mm² (Une grosse erreur consiste à travailler sur des fragments trop volumineux qui résistent à la dissociation)
4. Poser une minuscule goutte de colorant A COTE du fragment, sous peine de le voir rentrer dans la pipette ou le flacon compte-goutte (ce qui peut être une catastrophe, car votre flacon de colorant, après quelques manipulations douteuses, va receler quantité de spores différentes qui vont polluer les futures préparations)
5. Faire glisser le fragment dans le colorant avec une fine aiguille (l'outil idéal, pour nous, est représenté par des aiguilles d'acupuncture !)
6. Poser une lame couvre-objet SANS presser, afin de pouvoir observer l'arête entière, avec les cheilocystides et les spores encore attachées sur les stérigmates des basides
7. Laisser agir le colorant durant 30 secondes à une minute
8. Observer
9. Rincer la préparation à l'eau distillée (poser une goutte contre le bord de la lame couvre-objet, et on voit la goutte qui diffuse sous celle-ci et qui chasse le colorant) ; éponger le surplus avec de l'ouate de cellulose (essuie-tout ou papier WC)

10. Répéter l'opération jusqu'à ne plus voir que l'élément coloré entouré d'un milieu incolore
11. Dissocier par tapotement avec une gomme ou mieux encore, par écrasement modéré avec un bouchon de bouteille à vin (le millésime importe peu !)
12. Vous avez maintenant sous les yeux une préparation très claire, où les éléments colorés sont contrastés et nettement visibles.

2/ Travail sur du matériel d'herbier (exsiccata)

Nous avons le choix entre deux possibilités :

- l'utilisation classique du rouge Congo ammoniacal
- l'utilisation du rouge Congo SDS, après utilisation du ramollisseur de CLEMENCON

2 A./ l'utilisation classique du rouge Congo ammoniacal

Celui-ci constitue un classique des colorants en mycologie et est utilisé depuis des décennies. La solution ammoniacale est très intéressante à cause des propriétés regonflantes naturelles de l'ammoniaque.

1. Comme les spores ne nous intéressent pas directement,
2. Prélever un petit fragment de lame du champignon
3. Déposer 2 gouttes d'ammoniaque pur et laisser agir 2 ou 3 minutes : ce liquide va déjà ramollir le fragment (on peut obtenir le même résultat avec de la potasse à 5 %)
4. Eliminer le liquide de ramollissement avec un papier essuie-tout
5. A l'aide d'une lame de rasoir mécanique,
6. Poser une minuscule goutte
7. Faire glisser le fragment
8. Poser une lame couvre-objet SANS presser,
9. Laisser agir
10. Observer
11. Rincer la préparation à l'eau ammoniacale (ammoniaque 10 – eau distillée 90) : poser une goutte contre le bord de la lame couvre-objet, et on voit la goutte qui diffuse sous celle-ci et qui chasse le colorant) ; éponger le surplus avec de l'ouate de cellulose (essuie-tout ou papier WC)
12. Répéter l'opération jusqu'à ne
13. Dissocier par tapotement
14. Vous avez maintenant sous les yeux une préparation très claire, où les éléments colorés sont contrastés et nettement visibles.

2 B./ utilisation peu connue du rouge Congo SDS sur du matériel sec

Nous allons utiliser ici les propriétés regonflantes et ramollissantes du Ramollisseur de CLEMENCON (ammoniaque, éthanol, glycérine) qui constitue un milieu propice à l'utilisation du rouge Congo SDS et ne génère pas de précipités.

1. Comme les spores ne nous intéressent pas directement,
2. Prélever un petit fragment de lame du champignon

3. Déposer 2 gouttes de Ramollisseur de CLEMENCON et laisser agir 5 à 10 minutes : ce liquide va ramollir le fragment et lui donner la consistance d'un objet en cire
4. Eliminer le liquide de ramollissement avec un papier essuie-tout
5. A l'aide d'une lame de rasoir mécanique,
6. Poser une minuscule goutte
7. Faire glisser le fragment
8. Poser une lame couvre-objet SANS presser,
9. Laisser agir
10. Observer
11. Rincer la préparation à l'eau distillée
12. Répéter l'opération jusqu'à ne
13. Dissocier par tapotement
14. Vous avez maintenant sous les yeux une préparation très claire, où les éléments colorés sont contrastés et nettement visibles

3/ Passage à la préparation définitive

La préparation que nous venons de réaliser nous semble particulièrement réussie et mériterait d'être conservée. Nous allons donc la traiter de manière à appliquer un liquide conservateur.

Les 4 grands conservateurs sont les suivants :

- **le Baume du Canada** : excellente pour les préparations définitives à durée quasi illimitée ; il est à exclure ici car son application demande une déshydratation totale qui amènerait la déformation complète de la coupe.
- **la glycérine gélatinée** : excellente pour les préparations semi-définitives. Nous lui reprochons la nécessité de la chauffer qui génère très souvent des bulles d'air quasi impossibles à éliminer.
- **le PVA lactophénolé** : excellent pour les préparations définitives. Nous lui reprochons la présence fréquente de petites bulles d'air quasi impossibles à éliminer. De toute manière, il fait mauvais ménage avec le rouge Congo, car la coloration disparaît en quelques jours.
- **le Conservateur de HOYER** (voir notre fiche technique) : excellent pour les préparations définitives à durée quasi illimitée ; l'indice de réfraction est élevé et il s'applique à froid. Notre préférence va à ce dernier !

1. Soulever la lame carrée couvre-objet que vous avez utilisée
2. Poser une goutte d'eau distillée au centre de la lame porte-objet
3. Rassembler les éléments de la dissociation dans la goutte d'eau
4. Eponger le pourtour de la goutte avec du papier essuie-tout et mettre les éléments en place avec une fine aiguille
5. Quand il ne reste quasi plus d'eau, laisser évaporer encore 5 minutes
6. Poser une petite goutte de Conservateur de HOYER
7. Poser une lame couvre-objet RONDE : vous allez constater que la goutte s'étale avec une facilité remarquable
8. Poser un système de pression (nous utilisons personnellement des pinces à linge en PVC) durant quelques heures
9. Enlever la pince
10. Luter au vernis à ongles incolore (pas obligatoire avec le Hoyer)