

Abordagens microscópicas com macrofungos

Materiais e reagentes.	2
Meios de montagem (2)	
Água; KOH (ou NaOH) a 2–4 %; Hidrato de cloral; À base de glicerina; PVP	
Corantes e reagentes químicos (4)	
Vermelho de Congo; Floxina B; Azul de anilina; Azul de toluidina/ azul de cresilo; Reagente de Baral; Reagente de Melzer; Fucsina carbólica; Sulfoaldeídos; Carmim acético	
Impregnação e lubrificação de material seco (8)	
Solução de Abel; GSM; Solução de humedecimento	
Outros materiais (9)	
Fornecedores; Manuseamento; Lâminas de corte; Microscópios e acessórios	
Técnicas de preparação e suas aplicações.	11
Esporos.	13
Preparação (13)	
Esporada; Himenóforo	
Caracteres a determinar (13)	
Forma; Ornamentações; Disco supra-hilar ou depressão supra-apicular; Poro de germinação; Dimensões	
Himenóforo.	15
Preparação (15)	
Esfregaços; Corte transversal; Abordagem mista	
Caracteres a determinar (18)	
Basídios; Queilocistídeos; Pleurocistídeos e trama; Cistídeos especiais	
Superfície do píleo e do estipe.	19
Preparação (20)	
Corte vertical; “Epidermes” e esfregaços de escalpes	
Caracteres a determinar (20)	
Elementos da cutícula; Dermatocistídeos/pileocistídeos e caulocistídeos	
Trama e elementos do véu.	21
Preparação (21)	
Esfregaços; Cortes	
Caracteres a determinar (21)	
Morfologia dos elementos; Gelatinização; Reacções químicas	
Apêndice.	22

Materiais e reagentes

Não é uma lista exaustiva, mas inclui o mais importante para estudar macrofungos. Todas as referências a água significam água destilada (água para radiador, ou águas engarrafadas hipo-salinas, como a de Fastio, também servem). Apresentam-se nalguns casos os respectivos códigos CAS, que são identificadores únicos para os compostos químicos.

Meios de montagem

Isto é, o líquido que banha o material a observar, entre a lâmina e a lamela. Exemplificam-se os que são usados em micologia com preparações não-definitivas.

Água

Em algumas situações basta. Só quando se pretendam os realces das soluções básicas (KOH por exemplo) ou se precise de obter a máxima nitidez com objectivas de imersão (meios de montagem à base de glicerina, e outros), ou preservar a preparação durante algumas horas ou dias, é que apresenta desvantagens.

KOH (ou NaOH) a 2-4 %

As bases fortes diluídas podem evidenciar certos detalhes, ou realçar colorações, mas também podem destruir estruturas. Em princípio é preferível usar GS como meio de montagem por causa da glicerina. KOH e NaOH (potassa e soda cáustica, respectivamente) são preferíveis ao amoníaco diluído, que tem um vapor irritante mesmo diluído. KOH é incompatível com vermelho de Congo-SDS.

Aplicações

Para a identificação, são numerosas (em princípio aplica-se o mesmo para GS). Ornamentações de esporos castanhos, crisocistídeos, hifas do píleo (cutícula ou véu), estruturas gelatinizadas.

Hidrato de cloral

CAS 302-17-0. Aumenta a nitidez com objectiva de imersão por causa do índice de refração elevado, além de eliminar muita da interferência de elementos do citoplasma; é menos recomendável que os meios à base de glicerina, porque é um reagente potencialmente perigoso e convém salvaguardá-lo para o reagente de Melzer. Ver aplicações, em que é explicitamente requerido. O stock prepara-se a 100% (por exemplo 10 gramas em 10 mL de água), e se for utilizado sem mais nada dilui-se para 50% com igual volume de água. Susceptível à luz, tanto o pó como as soluções devem ser resguardados.

Aplicações

Meio de montagem para a reacção siderofílica. Pode melhorar a visualização de certas estruturas (talvez por destruir o conteúdo celular), por exemplo o tratamento com hidrato de cloral a 50% ajuda a visualizar o disco hilar em esporos de *Galerina*.

À base de glicerina

Em todas as formulações considera-se a glicerina (= glicerol, CAS 56-81-5) a solução a ~87%, densidade ~1,25 g/mL. A glicerina tem um índice de refacção elevado e não evapora facilmente, por isso as preparações duram mais tempo do que meios de montagem à base de água. Mesmo assim, uma preparação que se queira manter por vários dias deve ser selada, pincelando o perímetro da lamela com verniz das unhas.

GS (solução básica)

Dissolver 0,4–0,8 g NaOH em 15 mL água, adicionar 3,3 mL glicerina e perfazer com água para 20 mL. Substitui, com a vantagem das melhores qualidades ópticas conferidas pela glicerina, as bases fortes diluídas. Aplicações: ver acima em KOH/NaOH.

Lactoglicerol (solução ácida)

Juntar 1,65 mL ácido láctico (CAS 50-21-5) a 80–85% com 3,3 mL glicerina, e água para 20 mL. Especialmente indicado para colorações em meio ácido, como azul de anilina, fucsina carbólica e sulfoaldeídos, e para a floxina B.

PVP

Adaptado da fórmula de Kiernan, <http://publish.uwo.ca/~jkiernan/aqmount.htm>. Dissolver em 25 ml de tampão fosfato (0,1 M pH 7,5), com o auxílio duma espátula ou vareta, 25 g de polivinilpirrolidona 10000 (PVP-10, CAS 9003-39-8), juntar 1 mL de glicerina e 1 cristal de timol. Ir adicionando progressivamente o PVP, até completar a dissolução (pode ser necessário deixar num agitador magnético durante uma noite).

Fórmula para o tampão fosfato de Sódio (Gomori): 81,2 mL fosfato di-sódico (Na_2HPO_4) a 1 M + 18,8 mL fosfato di-ácido (NaH_2PO_4) a 1 M para 1 litro. Exemplo para preparar os indicados 25 mL directamente: adicionar 0,727 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (MW 358.14, CAS 10039-32-4) e 0,073 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (MW 156.01, CAS 13472-35-0), dissolvendo em água para 25 mL. Os valores de MW servem para orientar para diferentes alternativas; por exemplo se se dispuser de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (MW 137.99, CAS 10049-21-5), com regra de três simples deduz-se que a quantidade a utilizar é $0,073 \times (137,99/156,01) = 0,065$ g.

Os tampões fosfato são incompatíveis com álcoois.

Corantes e reagentes químicos

Vermelho de Congo

Corante geral, destacando principalmente as paredes mas também o conteúdo das células (CAS 573-58-0). Incubar cerca de 1 minuto, de preferência fora da lâmina onde se vai observar, a qual deverá ter um meio de montagem neutro ou alcalino (é incompatível com ácidos) preparado; caso se receiem dificuldades em manusear o material e por isso se pretenda corar directamente na lâmina, após o tempo de incubação colocar a lamela, juntar uma gota de meio de montagem dum dos lados da lamela e absorver o corante do outro lado.

Simple

Dissolver 0,1 g em 10 mL de água.

Etanólico

De preferência num frasco Erlenmeyer pequeno, dissolver 0,2 g em 14 mL de água, adicionar 0,2 g ácido bórico, e amornar antes de adicionar os restantes componentes: 2,1 mL etanol a 96% + 3,4 mL glicerina. Manter aquecido até assegurar completa dissolução, acertar volume final para 20 mL com água. Diz-se ser uma formulação muito estável.

Nota: caso se pretenda evidenciar com este corante os doliporos, os mesmos só são preservados em material fresco, e sem utilização de bases fortes (usar água, ou fosfato, antes e depois da coloração).

SDS

A fórmula é 1% vermelho de Congo, 1% SDS, mas esta mistura pode ser instável. Por isso, preparar os componentes separadamente e juntar apenas o necessário, como se exemplifica:

Solução a 1,25%: dissolver 0,2 g em 16 mL água.

Solução SDS (CAS 151-21-3) a 5%: dissolver 0,2 g em 4 mL água.

Preparar lotes de 5 mL, juntando 4 mL da solução de vermelho de Congo a 1,25% com 1 mL da solução SDS a 5%.

Nota: este corante é incompatível com KOH, por isso se forem necessários pré-tratamentos com bases fortes deve usar-se NaOH ou amoníaco diluído.

Aplicações

Himénio e trama, cutículas do píleo e do estipe.

Floxina B

Corante geral, destacando principalmente o interior das células (CAS 151-21-3).

Dissolver 0,1 g em 10 mL amoníaco diluído a 5% (feito de 2 mL amoníaco concentrado, ou seja a 25%, com 8 mL de água).

Nota: dissociar material em meio de montagem ácido!

Aplicações

Esporos (designadamente de *Laccaria*), hifas.

Azul de anilina

Paredes cianófilas, grânulos siderófilos dos basídios.

Geralmente referido como azul de algodão em Micologia, é utilizável indiferentemente como “azul aquoso” (índice de cor 42755), “azul de metilo” (índice de cor 42780), ou a mistura dos dois “azul de anilina” (índice de cor 42775). Ver

<http://stainsfile.info/StainsFile/dyes/707.htm> e

http://en.wikipedia.org/wiki/Category:Triarylmethane_dyes

Dissolver 20 mg de azul de anilina em 10 mL de ácido láctico.

Nota: esta coloração geralmente exige 10 a 20 minutos de incubação, ou mesmo 1 noite.

Aplicações

Esporos cianofílicos (por exemplo *Lepista*), crisocistídeos, gleohifas, grânulos siderofílicos.

Azul de toluidina/ azul de cresilo

Pode usar-se azul de toluidina (CAS 6586-04-5) ou azul de cresilo (CAS 81029-05-2), este último tem uma reacção menos forte mas mais distintamente metacromática.

Para uma solução a 0,05%, dissolver 5 mg em 6 mL água, juntando 2 mL glicerina e 2 mL EGME¹ (etileno glicol monometil éter/metil celosolve/2-metoxietanol, CAS 109-86-4)

¹ Na workshop utilizou-se etileno glicol monoetil éter/Cellosolve/2-etoxietanol, CAS 110-80-5

Aplicações

Reacções metacromáticas em esporos (nomeadamente em géneros lepiotóides), em crisocistídeos e na trama (por exemplo em alguns *Agrocybe*). Usar também em hifas gelatinosas.

Reagente de Baral

Também designado IKI. Proceder pela ordem indicada:

Dissolver 0,3 g de iodeto de Potássio (CAS 7681-11-0) em 10 mL de água e em seguida adicionar 0,1 g de iodo (I_2 , CAS 7553-56-2), agitando prolongadamente até terminar a dissolução deste último.

Nota: guardar em frasco de vidro!

Misturado 1:1 com hidrato de cloral, dá o reagente de Melzer.

Aplicações

Demonstração de reacções hemiamilóides nos himénios de ascomicetos (ver <http://www.gbif-mycology.de/HostedSites/Baral/IodineReaction.htm>): vermelho sem tratamento com KOH diluído, que passa a azul após esse tratamento (reacções euamilóides são azuis em ambos os casos; o reagente de Melzer dá azul com ou sem KOH).

Reagente de Melzer

Reacção amilóide dos esporos (macroscópica), reacções amilóides e pseudoamilóides/dextrinóides (microscópicas). O hidrato de cloral é um reagente considerado perigoso (tem acção sobre o sistema nervoso, é potencialmente explosivo...) e para além das óbvias precauções isto pode implicar não ser fácil obtê-lo. No entanto, um farmacêutico amigo poderá mediar essa aquisição, pois o hidrato de cloral é utilizado para a preparação de medicamentos manipulados. Resguardar o hidrato de cloral da luz!

Existem pequenas variantes da fórmula do reagente de Melzer, segue a de Cléménçon:

Dissolver 0,75 g de iodeto de Potássio em 10 mL de água e em seguida adicionar 0,25 g de iodo (I_2), agitando prolongadamente até terminar a dissolução deste último. Finalmente, adicionar 11 g de hidrato de cloral e prosseguir com a agitação até ficar totalmente dissolvido.

Nota: guardar em frasco de vidro resguardado da luz! Havendo esse cuidado, o que se diz do prazo limitado desta solução é um mito.

Aplicações

Esporos (sobretudo os de cor clara), ornamentações dos esporos em russuláceas, trama do himenóforo, estipe ou píleo, ascos (embora seja preferível o reagente de Baral para os casos hemiamilóides), paráfises.

Fucsina carbólica

Reagente para estruturas resistentes a ácido. Depois da coloração, faz-se a diferenciação com várias mudas de lactoglicerol, até não sair mais corante.

A solução final pode durar até 3 anos, mas devido à sua instabilidade devem preparar-se pequenas quantidades a partir dos seus componentes estáveis, como se exemplifica:

Dissolver 250 mg fucsina básica (CAS 58969-01-0) em 5 mL de etanol a 96%. A dissolução faz-se com agitação. Solução estável.

Dissolver 2,5 g fenol em 45 mL água (o fenol, CAS 108-95-2, é um composto tóxico e abrasivo; deve-se evitar a inalação de odores; caso haja contacto com a pele, lavar imediatamente com água e detergente). Proteger a solução da luz. Solução estável. Evitar usar fenol que não esteja branco (sinal de oxidação).

Reagente: adicionar 1 mL de solução de fucsina a 9 mL de solução de fenol.²

Nota: algumas variantes da fucsina carbólica têm sido usadas em plantas para corar cromossomas; talvez seja uma das possibilidades (à parte os métodos de Feulgen ou Giemsa) para contar núcleos.

Sulfoaldeídos

Preparações de curta duração.

Sulfovanilina/sulfobenzaldeído

Juntar, estritamente pela ordem indicada: 3 mL água + 8 mL de ácido sulfúrico concentrado, misturar bem (usar um recipiente com pelo menos 30 mL, é altamente exotérmico!), e dissolver 1 g de vanilina (aromatizante de baunilha, encontra-se em supermercados), ou misturar igual volume de benzaldeído (CAS 100-52-7; o óleo essencial de amêndoas é rico em benzaldeído).

²No curso foi entregue a solução já preparada, para evitar o potencial problema de manusear a solução de fenol.

Sulfoformol

Juntar, estritamente pela ordem indicada: 1,5 mL água + 3,5 mL de ácido sulfúrico concentrado, misturar bem (altamente exotérmico!) + 5 mL formaldeído a 40%³

Aplicações

Demonstração de gleocistídeos em Russulales (ver <http://www.mycologia.org/content/98/6/960.full> e em especial <http://www.mycologia.org/content/95/6/1037.full>). No caso do sulfoformol, tem aplicações mais diversas (tribos Cortinariaceae e Tricholomataceae).

Carmim acético

A versão mais simples consiste em colocar um pedaço de himenóforo num vidro de relógio com solução de Ferro, ferver durante 1 minuto, e transferir para outro vidro de relógio contendo solução saturada de carmim acético, repetir a fervura, e fazer um esfregaço em hidrato de cloral a 50%. Fórmulas:

Ferro: dissolver em sulfato de amónio a 3%, ácido acético glacial a 1% e H₂SO₄ diluído a 1/1000, 5% FeCl₃·6H₂O (CAS 10025-77-1) ou 3% Sulfato de amónio e ferro (CAS 7783-83-7).

Carmim acético: solução de carmim (CAS 1390-65-4, C. I. 75470) saturada em ácido acético (CAS 64-19-7) a 50%.

Aplicações

Reacção siderofílica dos grânulos dos basídios, considerada diagnosticante de géneros liofilóides das Tricholomataceae (*Lyophyllum*, *Calocybe*, *Asterophora* (*Nyctalis*), *Hypsizygus*, *Tephrocybe* e *Termitomyces*), embora seja duvidosa essa generalização, não só porque há espécies com granulação indistinta, mas há espécies de géneros muito diversos que também a apresentam (*Agrocybe*, *Entoloma*, *Rhodocybe*, *Lactarius*, *Russula*, *Mycenella*, *Melanoleuca*, *Tylopilus*, *Typhula* e *Lindtneria*)

Impregnação e lubrificação de material seco

A solução de Abel e a GSM (Glicerina -sal alcalino- metilcelosolve) são usadas para re-hidratar material seco, e a de humedecimento como passo intermédio caso se esteja para realizar cortes: o material impregnado fica demasiado mole para os cortes, mas o material seco é geralmente demasiado rijo e quebradiço para estes saírem bem. Os cortes são depois

³A solução distribuída no curso pode não estar em condições, pois estava turva

re-hidratados para que as observações sejam fidedignas, nomeadamente para efectuar medições.

Solução de Abel

Juntar 5 mL etanol 96%, 3 mL glicerina, 5 mL amoníaco concentrado (25%), e água para 20 mL

GSM

Dissolver 0,2 g NaOH em 10 mL água, juntar 3,2 mL glicerol e 4 mL EGME⁴, perfazendo com água para 20 mL.

Solução de humedecimento

Junta-se 16 mL etanol 96%, 0,2 mL glicerina e 0,8 mL amónia concentrada, perfazendo para 20 mL com água.

Outros materiais

Fornecedores

Sugestões, a título de exemplo. Ver ainda <http://www.biolaboratorio.com/>

Produtores

Para os químicos, a Sigma-Aldrich: <http://www.sigmaaldrich.com/portugal.html>

Para material plástico, a Sarstedt: <http://www.sarstedt.com/> v. p. ex. “Transfer Pipette”

Para microscopia, Leica: <http://support.leica-microsystems.com/portugal/>

Representantes

Nome	Endereço web	Comentário
Reagente 5	http://www.reagente5.pt/	preencher formulário para pedir catálogo
VWR	https://pt.vwr.com/app/Header?tmpl=/healthcare_clinical/microscopy.htm	grupo que inclui a Merck
Vidrolab	http://www.vidrolab.pt/	contactar por email

⁴Ver nota 1.

Nome	Endereço web	Comentário
Dias de Sousa	http://www.dias-de-sousa.pt/sa	procurar em produtos ou, melhor, pedir para ser contactado
JMGS	http://www.jmgs.pt/	menu produtos
Futurlab	http://www.futurlab.pt/	ver grupo de produtos
Galactica	http://www.galactica.pt	produtos ópticos
Quirumed	http://www.quirumed.com	ver material de laboratório

Manuseamento

Pinças microcirúrgicas (caso uma pinça comece a ficar romba ou com as pontas desacertadas, pode continuar a ser usada para manipulações menos delicadas, guardando-se uma “boa” para as que requerem grande precisão debaixo de lupa).

Agulhas lanceoladas.

Vidros de relógio: importante o facto de poderem ser aquecidos, se não for o caso até um pires de café pode servir.

Pipetas de Pasteur (de vidro, que requerem bolbo, ou de plástico).

Papel absorvente.

Água destilada.

Lâminas de corte

Bisturi (mesmo comentário que para as pinças).

Lâminas de barbear (isoladas, ou desmontadas de máquinas de lâmina dupla).

Cartolina negra (baça).

Microscópios e acessórios

Microscópio (que tenha objectiva de 100×, condensador regulável, e iluminação).

Lupa (em geral será suficiente uma lupa com 3 dioptrias e um pé; se se procurarem lupas binoculares em referências internacionais, costumam aparecer sob o nome “Stereo microscope”)

Lâminas e lamelas

Lápis com borracha na ponta

Micrómetro objectivo e ocular micrométrica

Óleo de imersão

Técnicas de preparação e suas aplicações

De modo a obter a informação desejada há sempre mais do que uma estratégia, e isso é importante porque, dependendo do material disponível (fresco ou seco, volumoso ou muito pequeno, etc.), pode ser necessário optar por uma diferente. Há 3 categorias de preparações: montagens directas (*whole mounts*), os esfregaços e os cortes. A montagem directa não é mais do que a colocação de material suficientemente fino entre a lâmina e a lamela, os esfregaços são o material dissociado por pressão da lamela sobre a lâmina (geralmente precedida de dissociação grosseira com a ajuda dum bisturi e pinça), e os cortes são fatias do material, orientadas de modo a poder interpretar-se correctamente a anatomia do material preparado. Nas tabelas seguintes resumem-se as 5 técnicas recomendadas.

Tabela 2 — Aplicações da montagem directa (*whole mount*)

Estruturas	Caracteres	Vantagens	Desvantagens
Esporada	esporos	é o ideal: esporos ma- duros em abundância, simplicidade	nem sempre disponível
Himenóforo lamelado	queilocistídeos	simplicidade	preparação espessa; nem sempre fáceis de observar (por exemplo em <i>Agaricus</i>)
Cutícula do píleo ou do estipe	pileocistídeos, caulocistídeos	relativamente simples	pode não ser fácil, se for muito espessa, ver os detalhes ou interpretar

Tabela 2 — Aplicações dos esfregaços e diferentes técnicas de corte. A secção deste texto onde se encontra a explicação de como cada uma se realiza vem indicada entre parêntesis.

Técnica	Vantagens	Desvantagens	Estruturas	Caracteres
Esfregaço	simplicidade, resolução ao nível da célula	sem estrutura histológica, esporos separados dos basídios (perturbação), pode não ser fácil interpretar	Himenóforo	basídios, cistídeos, hifas, ansas de anastomose, esporos
			Aresta das lâminas	queilocistídeos
			Contexto	hifas, ansas, esferocistos
Corte tangencial (pág. 16)	simplicidade, pouca perturbação, anatomia excelente	espessura, orientação da trama (eventualmente), incompatível com material re-hidratado	Himenóforo lamelado	trama, cistídeos, esporos em diferentes fases
Corte em “dupla faca” (pág. 17)	simplicidade, orientação do corte, anatomia excelente	espessura (menos que corte tangencial), mais difícil em material re-hidratado	Himenóforos	trama, cistídeos, esporos em diferentes fases, basídios
			Superfícies em geral	pileipellis, restos de véu
Corte em guilhotina (pág. 18)	universal (a única técnica de corte boa para material re-hidratado), espessura	difícil, perturbação do material, risco de decepar hifas	Todas	todos

Esporos

Preparação

Esporada

Se houver esporada, é o ideal pois a esmagadora maioria dos esporos são maduros e em quantidade, e permite também testes macroquímicos. A melhor maneira de guardar uma esporada é a impressão em cartão branco (superfície brilhante), mas pode também suplementar-se com uma folha de acetato. A quantidade de esporos necessária para uma preparação microscópica é bastante reduzida, basta em geral o que adere à ponta duma agulha lanceolada previamente humedecida, que se dispersam directamente no meio de montagem ou corante já colocado sobre a lâmina.

Himenóforo

Se não houver esporada, desde que o esporóforo seja suficientemente maduro (e convém que o seja, para os caracteres do himénio), os esporos podem ser observados nas preparações de himenóforo (cf. secção respectiva). Certos corantes (vermelho de Congo) poderão permitir a distinção entre esporos maduros e imaturos, nesse caso estes últimos são impregnados pelo corante, o que é importante pois só os maduros servem para medições (atenção que tem de ser uma distinção dentro do esporóforo; por exemplo em *Lepiota* a congofilia dos esporos é usada para a distinção entre espécies).

Caracteres a determinar

Forma

Na maior parte dos casos os esporos têm formas que variam desde o globoso até ao cilíndrico (cf. dimensões na página seguinte, para a correspondência numérica das designações), sendo convencionado analisá-los lateralmente, ou seja com o apículo de perfil.

Certas formas especiais (alantóides, amigdaliformes, poligonais, lacrimóides, faseoliformes, fusiformes, etc.) precisam de ser identificadas correctamente.

Na face “ventral” do apículo (= hilo) vista de perfil, pode estar presente uma concavidade, a depressão hilar.

A extremidade distal (oposta ao apículo) pode ter uma forma especial, nomeadamente truncada, papilada ou aguda, e apresentar um poro de germinação (v. abaixo).

Ornamentações

Algumas são evidentes apenas com coloração (por exemplo as das russuláceas, com reagente de Melzer), outras beneficiam do uso de meios de montagem que não a água — ou porque o pH reforça os detalhes (caso de *Cortinarius* em KOH) ou porque o índice de refração aumenta a clareza da observação em altas ampliações (lactoglicerol ou GS). As equínulas das Hydnangiaceae (nomeadamente, *Laccaria*), cujas dimensões podem ser importantes, podem ser mais evidentes com floxina B ou azul de anilina, ou com contraste de fase.

Disco supra-hilar ou depressão supra-apicular

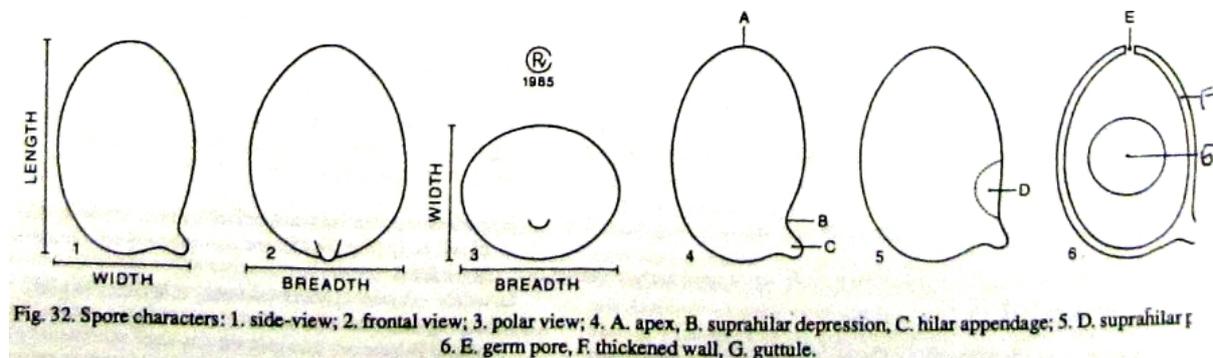
Muitas vezes referida em Inglês e Francês como “plage”, define-se pela exclusão das ornamentações numa área de contorno curvo próxima do apículo, na face “ventral”, o que é distinto da depressão hilar (v. forma, acima)

Poros de germinação

Pode ou não ser discernível na extremidade distal do esporo, sendo o critério mais seguro verificar-se uma interrupção da parede. Pode ser central ou excêntrico.

Dimensões

Há três medidas, todas elas do contorno do esporo sem contar com ornamentações nem com o apículo: comprimento máximo (L), largura máxima dorsoventral (l), e largura máxima bilateral (l_b). Quase sempre a terceira não é mencionada, mas no glossário de Vellinga na *Flora Agaricina Neerlandica* as três medidas são mencionadas (com as iniciais do Inglês, *length*, *width* e *breadth*, respectivamente):



(imagem retirada de <http://www.shroomery.org/forums/showflat.php/Number/9654208>, onde se incluem digitalizações do glossário de Vellinga completo)

Não se excluem elementos do contorno como sejam vértices ou bossas, como por exemplo nos esporos de *Entoloma* ou de diversos *Inocybe*, respectivamente. Por outro lado, em certos

casos (alguns *Coprinus* s.l.) existe um “perispório” que não é para incluir, e há que ter em atenção a possibilidade da parede inchar na presença de químicos como amoníaco ou acetato, como é o caso de *Macrolepiota*, *Chlorophyllum* e *Leucoagaricus*.

Para cada medição costuma-se relatar o valor médio de 20 medições de esporos maduros, mas é mais correcto apresentar a margem de valores abarcando aproximadamente 90% da distribuição gaussiana, isto é entre $m - 1,65d$ e $m + 1,65d$, sendo m a média e d o desvio-padrão, por exemplo 8,1–10,3 μm ; se houver valores fora deste intervalo, os mais extremos são apresentados entre parêntesis, por exemplo (7,9)8,1–10,3 μm .

Com as três medidas podem calcular-se 3 quocientes, mas em geral só se regista o quociente $Q = L/l$ para cada esporo. Bas estabeleceu a nomenclatura conforme a tabela à direita:

Os valores de Q são calculados individualmente para deles extrair-se um valor médio e/ou uma margem de variação.

descrição	Q
globoso	1,00–1,05
subgloboso	1,06–1,15
elipsóide largo	1,16–1,23
elipsóide ou amigdaliforme	1,24–1,6
oblongo	1,60–2,0
cilíndrico ou subfusiforme	2,0–3,0
baciliforme	> 3,0

Himenóforo

Preparação

Esfregaços

Retirar uma pequena porção de material (por exemplo 1 mm × 1 mm de lâmina, tubo ou agulha), embebê-la no corante, e transferir para meio de montagem numa lâmina de microscópio. Pode ser importante dissociar um pouco o material, se for mais consistente, com uma pinça e uma agulha. Aplicar então a lamela e, usando um lápis com borracha, pressionar com esta última sobre a lamela, com movimentos circulares, para esmagar o material e dispersá-lo sob a lamela. Retirar o excesso de líquido da borda da lamela com papel absorvente.

Os himenóforos de ascomicetos, levemente dispersos sob a lamela, costumam apresentar os ascos agrupados, e com eles as paráfises.

Convém que o grau de dispersão do material seja suficiente para expor células individualmente, mas não a ponto de desfazê-las (hifas interrompidas, cistídeos dispersos).

Para estudar queilocistídeos, ou se faz uma montagem directa da lâmina, em cuja aresta eles

são proeminentes (mas nem sempre, e não quer dizer que não existam), ou se separa o material da aresta de modo a obter material quase só constituído por queilocistídeos; assim, retira-se uma porção de lâmina contendo cerca de 2–3 mm de aresta, e faz-se um corte tangencial (0,5 mm ou até menos) da aresta, sendo o mesmo dispersado levemente sob a lamela; pelo mesmo procedimento pode fazer-se um esfregaço numa lâmina à qual se retirou a aresta, para estudar separadamente os pleurocistídeos.

Por vezes pode não ser fácil perceber qual dos lados é a aresta, para evitar esse problema é recomendável que se corte o pedaço de lâmina em forma de trapézio rectângulo, sendo a aresta delimitada pelos dois ângulos rectos.

Corte transversal

Importante para determinar o arranjo das hifas da trama (lâminas ou tubos), e para dar o contexto anatómico da inserção de elementos do himénio (cistídeos, pseudocistídeos, paráfises, pseudoparáfises). Isto significa as seguintes exigências de orientação dos cortes: que os himénios apareçam de perfil, e que as hifas da trama corram paralelamente à superfície do corte.

Um dos principais problemas técnicos depende largamente da espessura dos cortes: quanto mais espessos, mais tendem a assentar sobre o himénio, e os elementos a observar (himénio, trama) não aparecem de perfil como é pretendido. Cortes demasiado espessos também colocam dificuldades para discernir cada elemento (embora se possa sempre ter uma imagem razoável das estruturas que estão mais próximas da lamela, para tal usando-se uma reduzida profundidade de campo).

No que respeita à segunda exigência, a orientação das hifas pode não ser exactamente perpendicular à aresta da lâmina, e para tal pode proceder-se da seguinte maneira: separar uma lâmina, assentá-la sobre uma das faces numa lâmina de microscópio, levantar a partir da base (isto é, junto à união com o píleo) a outra face, desdobrando de modo a ficar com os dois folhetos lado a lado, separados pela aresta, e com a trama virada para cima; deste modo é possível verificar o ângulo da trama em relação à aresta (preferencialmente com exemplares jovens para não ter a interferência dos esporos na visualização).

Segundo parece os himenóforos de tubos podem ser mais fáceis de sectionar após secagem.

Técnica tangencial

Passos a realizar, em himenóforos de lâminas:

1. cortar um sector do píleo de modo a abranger algumas lâminas (quando muito uma dúzia);

2. cortar transversalmente de modo a separar o material da margem, para expor a superfície de corte (que se apresenta como uma “arcada” formada pelas lâminas e espaços intersticiais), tendo em atenção que o ângulo em relação às arestas seja perpendicular (ou outro, tal que permita um diagnóstico correcto do arranjo das hifas na trama, ver acima);
3. segurar o material a cortar pressionando-o pelos lados, obrigando as “folhas” das lâminas a formarem uma massa compacta (não é necessário forçar);
4. de preferência com a ajuda dum lupa, percorrer a superfície de corte com uma lâmina de barbear, de modo a obter fatias mais ou menos finas, transferindo directamente para o meio de montagem ou para o corante. Na medida do possível, manter cada grupo de cortes unido (especialmente fácil em esporóforos pequenos, se se incluir uma parte do contexto subjacente ao himenóforo), pois facilita a orientação na lâmina do microscópio.

Em himenóforos de tubos, o procedimento poderá ser análogo, embora pareça menos necessário aplicar a pressão no passo 3.

Técnica da dupla faca

Aplicável a qualquer tipo de himenóforo, incluindo de ascomicetos, e talvez a única que poderá dispensar uma lupa para obter cortes finos. Em certas circunstâncias pode revelar-se muito fácil, e pode ser compatível com material muito mole (nomeadamente himenóforos re-hidratados com solução de Abel ou GSM).

Consiste em justapor duas lâminas de barbear idênticas, formando uma dupla “faca”. Por exemplo, com uma lâmina de himenóforo: esta é colocada sobre cartolina ou outra superfície mole (pormenor importante para a durabilidade das lâminas, pois o vidro é duro demais e o gume perde-se rapidamente) e, dando atenção ao ângulo formado com a aresta, fazer a dupla faca descer verticalmente para efectuar o corte, que fica retido entre os dois gumes. Se não aparecer material, pode dever-se à elasticidade do material da lâmina, e recomenda-se que antes de levantar a dupla faca se faça um par de movimentos laterais (isto é, ao longo da linha de corte). O uso dum cartolina negra costuma facilitar a visualização do material cortado.

Em geral são cortes relativamente espessos. Mas é provável que diferentes modelos de lâmina de barbear dêem diferentes espessuras de corte, por isso vale a pena tentar vários e escolher um que seja o ideal, ou mesmo descobrir a melhor especialização de cada modelo.

No caso dum himenóforo tubulado, para ver também a orientação das hifas na trama, o corte faz-se ao longo do eixo dum tubo.

Técnica da guilhotina (bisturi curvo)

De aplicação ainda mais generalizada, tira partido da curvatura dos bisturis cirúrgicos para controlar a espessura do corte. É altamente recomendável usar lupa para aumentar a precisão.

Novamente, é sobre superfície mole que deve realizar-se o corte, para evitar o desgaste do gume do bisturi. Usualmente, uma cartolina negra é o ideal. No caso dum himenóforo lamelado, a lâmina é deitada sobre a superfície e a superfície de corte exposta segundo a orientação adequada (perpendicular à aresta, ou outra). A seguir, os cortes são realizados seriadamente, tão finos quanto possível, começando a partir da ponta do bisturi, com o cabo quase vertical, e ir cortando à medida que se baixa o cabo (ao estilo dum guilhotina, sem deslizar) para fazer o gume do bisturi percorrer a superfície de corte. É em geral uma boa ideia manter o material imóvel sujeitando-o com uma lamela de microscopia.

Orientando cada corte *ligeiramente* oblíquo, em relação à superfície de corte, “provoca-se” um corte “incompleto”, que no seu limite pode ser muito fino.

Abordagem mista

Boa parte dos caracteres podem ser obtidos em esfregaços ou em cortes. Pode tentar-se um compromisso entre ambas as abordagens pela dissociação parcial de preparações de cortes transversais, isto é, realizar uma pressão como a descrita para esfregaços, mais moderada, para ajudar a dispersar os elementos mas sem lhes retirar por completo a referenciação anatómica.

Caracteres a determinar

Basídios

Os basídios constituem o essencial do himénio e radicam no sub-himénio. O seu comprimento deve ser medido (sem incluir os esterigmas), e o número de esterigmas contado (pode haver variações mesmo dentro do mesmo esporóforo).

Obtidos em esfregaços, deve contar-se com alguma dificuldade em encontrar os adequados para observação em esporóforos imaturos, que podem não apresentar ainda os esterigmas. Nos cortes transversais, a imagem do himénio pode ser muito compacta, tornando-se difícil a observação especialmente se os cortes não forem suficientemente finos.

Mesmo quando não se encontrem ansas de anastomose em mais parte nenhuma, deve estar-se atento à base dos basídios pois pode ser o único local onde existem.

Queilocistídeos

Em esfregaços de arestas de lâmina ou poros de tubos, mas também em cortes transversais. Formas, colorações, abundância/ densidade, continuidade (a “risca estéril contínua” descrita para algumas arestas é composta por uma fiada contínua de queilocistídeos).

Pode ser importante determinar o comprimento dos queilocistídeos.

Pleurocistídeos e trama

Em esfregaços de himenóforo, mas principalmente em cortes transversais, permitem identificar células que se destacam no himénio por terem uma forma e/ou dimensão (e, muitas vezes, conteúdo celular) distintos dos basídios. Quando a semelhança com estes últimos pode ser interpretada como células imaturas, então não são cistídeos mas basidíolos. O termo pseudocistídeos aplica-se quando radicam mais profundamente que os basídios (em cortes transversais). A medição do comprimento de cistídeos e pseudocistídeos pode ser importante.

Metulóides designa cistídeos com acumulação de cristais na extremidade apical.

Nos himénios de ascomicetos podem encontrar-se células que se distinguem nitidamente dos ascos, designam-se paráfises.

A trama do himenóforo, em corte transversal, deve ser estudada quanto à orientação das hifas (bilateral/divergente, paralela/regular, inversa/convergente, subregular a entrelaçada), à presença de esferocistos, às dimensões das células (largura das células, distância entre septos) e à presença de ansas de anastomose. O arranjo de hifas no sub-himénio pode ser distinto do da restante trama.

Cistídeos especiais

Definidos não pela localização mas pelo facto de terem colorações distintivas: crisocistídeos têm o interior amarelo depois de tratamento com bases fortes (KOH, NaOH, amoníaco, meio de montagem GS), contrastando com o restante (não coram com vermelho de Congo); gleocistídeos metacromáticos com azul de cresilo/toluidina; feocistídeos levemente dextrinóides; gleocistídeos de russulales corados com sulfoaldeídos...

Superfície do píleo e do estipe

Uma questão de crucial importância é definir o que se entende por cutícula, por exemplo nas espécies lepiotóides esta é representada pelas escamas que se separam devido ao crescimento do píleo, enquanto noutros casos os elementos sobre o píleo são restos de véu universal.

Preparação

Corte vertical

Esta preparação é fundamental para a determinação do arranjo das hifas à superfície (cútis, tricoderme, etc.) e também para verificar a gelatinização das camadas subjacentes (ixocútis, ixotricoderme, etc.). Há que ter em atenção evitar decepar os elementos terminais com uma orientação errada do corte, que é no sentido radial salvo alguma especificação em contrário.

De todas as técnicas, a melhor é a da dupla faca descrita para os cortes transversais de himenóforo (em apêndice reproduz-se a descrição original dos cortes em escalpes, mas essa técnica é muitíssimo mais difícil e não é recomendada). A principal adaptação, para além de orientar-se segundo um raio do círculo do píleo, tem a ver com a resistência que se encontra em algumas cutículas e com a profundidade que é necessário dar ao corte.

Assim, enterra-se a dupla faca obliquamente, no ponto mais próximo do centro do píleo, e com um movimento de guilhotina (rotação sobre aquele ponto) prolonga-se a linha de corte radialmente até onde se deseje, tendo o cuidado de manter as duas lâminas imóveis entre si; a profundidade do corte deve ter se possível 1 mm, para que depois o mesmo assente lateralmente na lâmina de microscópio. Retira-se a dupla faca e, com a ajuda dum pinça e bisturi, separa-se a fatia produzida para colocar no meio de montagem ou no corante.

No caso do píleo podem obter-se resultados diferentes entre o disco e a coroa ou a margem, ou seja, pode implicar examinem-se separadamente diferentes amostras de cutícula.

Para o estipe, a técnica é semelhante. A demonstração de caulocistídeos ou restos de véu colados ao estipe pode depender da altura a que se fazem os cortes.

“Epidermes” e esfregaços de escalpes

Para a detecção de cistídeos ou para o arranjo dos elementos da camada superficial, pode ser suficiente espalhar uma pequena porção (até 3 mm × 3 mm) desta última sobre a lâmina do microscópio, *camada superficial para cima*, vendo-se os elementos à transparência (geralmente deitados) e não de perfil.

A dissociação dos elementos dum escalpe (uma porção da cutícula, com o contexto subjacente a ela agarrado) faz-se como para os esfregaços de himenóforo.

Caracteres a determinar

Elementos da cutícula

O arranjo das hifas em cútis, himeniderme, tricoderme ou epitélio; a presença de camada

gelatinosa (ixocútis, ixotricoderme). Hifas especiais, pigmentos.

Dermatocistídeos/pileocistídeos e caulocistídeos

Caracterizar a forma, abundância, eventualmente as medições.

Trama e elementos do véu

Preparação

Esfregaços

Usando a lógica descrita para queilocistídeos, separar o material a examinar preferencialmente, por exemplo restos de véu universal sobre o píleo ou estipe em certas espécies de *Amanita*, ou o contexto da metade inferior do estipe nalgumas de *Xerocomus*.

Cortes

Certos casos, como a gelatinização, requerem uma referenciação anatómica que se perde nos esfregaços, devendo nesses casos usar-se cortes adequados (técnica da dupla faca, ver cutícula e superfície do estipe).

Caracteres a determinar

Morfologia dos elementos

Exemplos: esferocistos abundantes nos restos de véu universal dos grupos de *Amanita rubescens* e *A. citrina*, e em geral para este género para diversas localizações desde a base até ao topo do estipe (elementos de diferentes origens).

Gelatinização

Exemplo: a subcutícula gelatinosa em *Hohenbuehelia* (corte vertical).

Reacções químicas

Exemplo: hifas amilóides (tipo “pruinatus”) do contexto na metade inferior do estipe em *Xerocomus pruinatus* e *X. cisalpinus*.

Apêndice

Descrição de técnicas de preparação de cortes verticais a partir de escalpes de píleo ou de estipe (segundo Largent; estas técnicas não são recomendadas).

Para a cutícula do píleo:

1. recortar um retângulo de cutícula, por exemplo com cerca de 0,5 cm de largura no sentido radial ao píleo, e 1 cm de comprimento transversalmente ao raio do píleo (geralmente é esta a orientação desejada, para realizar cortes orientados segundo os raios do píleo; se eventualmente pretender-se a orientação transversal a esta, basta delimitar o escalpe perpendicularmente ao descrito acima);
2. usando uma pinça, e a partir dum dos extremos do comprimento, levantar um escalpe com uma espessura de cerca de 1 mm (pode ser necessário ajudar com um bisturi, para evitar que o escalpe fique demasiado fina, o que já seria uma “epiderme” e não um escalpe).

A partir daqui, os cortes finos podem realizar-se com as técnicas da dupla faca e do bisturi curvo (v. himenóforo, corte transversal), ou ainda com lâmina de barbear usando os dedos como apoio, como se passa a descrever:

3. usar a prensão entre polegar e face lateral do indicador (da mão que não realiza os cortes) para segurar o escalpe na vertical, deixando 1–2 mm deste a descoberto para efectuar os cortes;
4. realizar uma primeira incisão para expor a superfície de corte, segundo o lado mais curto
5. realizar os cortes seriadamente, tão finos quanto possível, se possível com auxílio duma lupa para conferir maior precisão.