

CURSO DE INICIACIÓN A LA MICROSCOPIA FÚNGICA



Micologia.net 2008

Profesor:
Jesús Baz

Asesores:

Manuel Luque
Antonio Valero
Juana Arrabal

Contenido

El Microscopio

- ✓ Importancia del microscopio en la micología
- ✓ Partes del microscopio
- ✓ Utilización del microscopio
- ✓ Calibrado del ocular micrométrico
 - Medición de esporas con el programa Piximetre
- ✓ Utilización de la cámara para fotografía microscópica
- ✓ Mantenimiento del microscopio
- ✓ Elección de microscopio
- ✓ Errores a evitar

Reacciones microquímicas básicas

- ✓ Amoniaco
- ✓ Azul de Cresilo
- ✓ KOH (potasa)
- ✓ Reactivo Melzer
- ✓ Rojo Congo

Material a utilizar

- ✓ Portaobjetos
- ✓ Cubreobjetos
- ✓ Pinzas
- ✓ Cuchillas
- ✓ Punzón o aguja
- ✓ Aceite de inmersión
- ✓ Agua glicerinada
- ✓ Diversos colorantes y reactivos

Técnica de elaboración de preparaciones

- ✓ Realización de una esporada
- ✓ Preparación de la Arista para su observación

- ✓ Corte transversal de la lámina para su observación
- ✓ Corte de la cutícula y del pie para su observación
- ✓ Corte de los tubos para su observación

Técnicas microscópicas

- ✓ Preparación de un herbario
- ✓ Técnicas de lavado de una preparación
- ✓ Rehidratar
- ✓ Aceite de Inmersión
- ✓ Procedimiento amonio-acético de Locquin.

Basidiomycetes (teoría y ejercicios)

- ✓ Himenio
 - Observación de las esporas
 - Realización de esporada
 - Laminas
 - Observación de la arista
 - Fertilidad de la arista
 - Queilocistios
 - Observación de la cara de la lamina
 - Basidios y basidiolos
 - Pleurocistidios
 - Trama de la lamina
 - Tipo de trama
 - Hifas
 - Fíbulas
 - Tubos
 - Basidios y basidiolos
 - Cistidios
- ✓ Revestimiento
 - Pileipellis
 - Tipos de estructuras
 - Pileocistidios
 - Hifas
 - Pigmentación de las hifas
 - Estipitipellis o caulopellis

- Caulotrama
- Caulocistidios

Ascomycetes teoría y ejercicios

- ✓ Himenio
 - Ascosporas
 - Ornamentación de las esporas
 - Ascas
 - Parafisis
- ✓ Parte no fértil
 - Trama

Myxomyteces teoría y ejercicios

- ✓ Hipotalo
- ✓ Estipite
- ✓ Peridio
- ✓ Columela
- ✓ Pseudocapilicio
- ✓ Capilicio
- ✓ Esporas
- ✓ Medidas

Ejercicios

- ✓ [Ejercicio I \(Esporas\)](#)
- ✓ [Ejercicio II \(Arista\)](#)
- ✓ [Ejercicio III \(Trama Laminar\)](#)
- ✓ [Ejercicio IV \(Cutícula y pie\)](#)
- ✓ [Ejercicio V \(Poros\)](#)

Bibliografía

El Microscopio

Importancia del microscopio en la micología

Una vez analizados los datos macroscópicos del hongo, los cuales pueden variar mucho de unos ejemplares a otros, ayuda mucho y es imprescindible para la determinación de muchos géneros y especies, el conocer los datos microscópicos.

Los caracteres microscópicos, son mucho más estables y fiables que los macroscópicos.

Se puede secar el hongo o una parte de él, y guardarlo por muchos años en un herbario. De tal manera, que varios años después, podríamos determinar dicho hongo, compararlo con otro o incluso darnos cuenta que en su día se determinó mal.

Permite a los noveles o principiantes en el estudio de los hongos, a un coste relativamente bajo, determinar los propios hongos recolectados con bastante seguridad permitiendo un aprendizaje rápido y seguro, a la vez que nos da independencia y permite formarnos nuestras propias conclusiones e impresiones.

Ayuda mucho, saber llegar macroscópicamente a los géneros y aproximarnos a las posibles especies de los hongos que queremos determinar, para saber qué buscar. Saber lo que buscar, ayuda mucho a reconocer los elementos o estructuras que vemos a través del microscopio.

Por otra parte, una vez tengamos los datos microscópicos, y junto con los datos macroscópicos recopilados, podremos ir avanzando en la determinación del hongo e ir llegando al género y luego a la especie con certeza a reducir la posibilidad de equivocarnos. Nos ayudaremos de las claves y libros especializados, en los que vengan los datos microscópicos. ¡Y como no! de la ayuda de otros micólogos, foros, listas y demás personas que estén dispuestas a echarnos una mano.

Los reactivos microscópicos nos van a ayudar mucho a la hora de llegar al género e incluso a la especie. Por eso es muy importante, conocer todo lo que podamos sobre las reacciones microscópicas existentes.

Sin duda el papel principal en el estudio microscópico recae en las esporas, siendo uno de los parámetros más importantes a tener en cuenta.

Tanto para las esporas, como para el resto de elementos o estructuras microscópicas; necesitaremos conocer las medidas, para lo cual tendremos que ayudarnos de un ocular micrométrico.

Partes del microscopio

Los microscopios ópticos son instrumentos que nos van a permitir ver una imagen ampliada por medio de un conjunto de lentes. Los que nos interesan, para la microscopía de hongos estarán en el rango de ampliación comprendido entre 40 y 1000 aumentos (con oculares de 10X).



Los oculares

Deben su nombre a la proximidad a los ojos, los más comunes suelen ser 10X esto quiere decir que aumentan la imagen que vemos diez veces. Cuando el microscopio tiene dos oculares (microscopio binocular) tienen un mecanismo intermedio que sirve para ajustar la distancia interpupilar, su correcto ajuste ocurre cuando al mirar a través de los dos vemos únicamente un círculo, un mal ajuste nos haría ver dos círculos o uno superpuesto en el otro

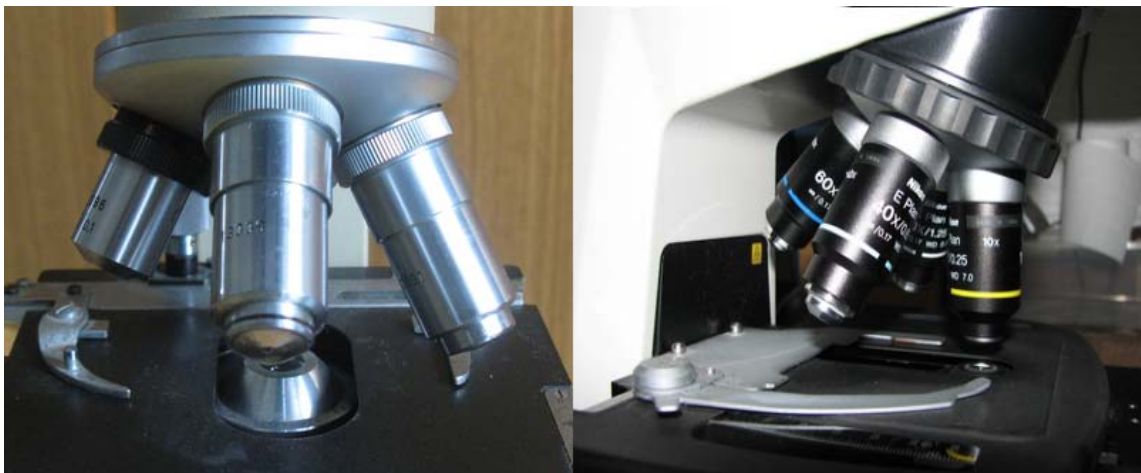


Los Objetivos

Son lentes con diferente tipo de aumento, se encuentran insertados en una pieza metálica llamada revolver y que gira en ambas direcciones

Lo más frecuente es encontrar revolver con cuatro objetivos que suelen ser de 4X 10X 40X 100X aumentos

Cuando giremos el revolver para cambiar de objetivo debemos mantener la vista en ellos para evitar que rocen la preparación y dañen las lentes con ello



Tipos de Objetivos

Acromático: son los que se usan más comúnmente en la micología. Se han corregido cromáticamente para dos longitudes de onda, azul y rojo y la aberración de esfericidad se fija para una longitud de onda, generalmente de color amarillo-verde. Ventaja: son los más baratos y fáciles de encontrar. Inconveniente: solo se observa con calidad aceptable en el centro del campo de visión.

Semiapocromáticos: están ajustados para corregir las aberraciones cromáticas de dos o incluso tres colores básicos y las aberraciones de esfericidad. Con ellos se suele tener una mayor apertura numérica. Es raro encontrarlos a la venta.

Apocromáticos: están calibrados para 3 o cuatro longitudes de onda (cada una de ellas representa un color básico) y la aberración de esfericidad se corrige con azul y rojo. Bastante caros.

Planacromáticos: acromáticos donde la curvatura de campo está eliminada. Esto es que el campo de visión es igual en el centro que en cualquier lado. Lo mejor que podemos adquirir sin arruinarnos. Ideales para fotografía (evidentemente sin contar con los últimos).

Planapocromáticos: apocromáticos donde la curvatura de campo está eliminada. Son los ideales a fecha actual pero el precio nos hace descartarlos.

Existen además los Semiplanacromáticos pero no merecen la pena pues la diferencia de precio con los Planacromáticos no es significativa (por lo general).

Mesa de trabajo “Platina”

Es la plataforma donde colocaremos las preparaciones para su observación, tiene un orificio central por donde pasa la luz procedente de la fuente de iluminación. Tiene dos pinzas para sujetar el portaobjetos y dos tornillos que nos van a permitir mover la preparación de adelante a atrás, de izquierda a derecha y viceversa



Condensador

Justo debajo de la mesa de trabajo se encuentra el condensador, es un sistema de lentes que concentra la luz de la fuente de iluminación hacia la preparación

En su interior tiene un diafragma-iris con el que podremos condensar (limitar) el haz de rayos de luz que atraviesa el sistema de lentes, eliminando los rayos demasiados desviados consiguiendo aumentar o disminuir el contraste, obteniendo una mayor nitidez en la visión

Tiene un filtro de color azul para corregir el exceso de amarillo de la luz y proteger la visión

Este filtro es intercambiable por otros de distinto color con los que se puede obtener distintos efectos



Fuente de iluminación

Esta se encuentra en la parte inferior del microscopio y encargada de proporcionarnos la iluminación para ver la preparación tiene dos pulsadores uno de encendido y apagado y otro para regular la intensidad de luz



Tercer ocular

En los microscopios trioculares tienen un tercer ocular diseñado para instalar una cámara digital específicas para microscópicos o en su defecto por medio de unos adaptadores también podremos acoplar nuestra cámara digital para resultarnos mas cómoda la fotografía



Macrométrico y micrométrico

Son los mandos que están situados en la parte baja del pie que se usan para enfocar, subiendo y bajando la mesa de trabajo. Con el de mayor tamaño (macrométrico) subiremos y bajaremos de manera rápida mientras que con el mando pequeño enfocaremos con más precisión ya que son micras el desplazamiento que se obtiene con este mando



Utilización del microscopio

En primer lugar encenderemos la luz del microscopio y ajustaremos los oculares a nuestro espacio interpupilar.

Deberemos tener colocado el objetivo de menor aumento 4X y la mesa de trabajo (Platina debe estar en su posición mas baja y totalmente recogida sin que ninguna pieza sobresalga de ella.

Cuando terminemos de trabajar con el, después de realizar la limpieza que le corresponda, esta debe ser siempre la posición en que lo guardemos.

Seguidamente colocaremos la preparación sobre la mesa de trabajo y procederemos a enfocar con el tornillo macrometrico, una vez enfocado cambiaremos al siguiente objetivo, siempre sin saltarnos el objetivo inmediatamente superior, y así lo haremos hasta llegar al de 40x que será el objetivo que mayormente usemos.

En el objetivo de 40X Sujetaremos el tornillo micrométrico y jugaremos (subir y bajar ligeramente y continuamente) para tener profundidad de campo ya que el microscopio nos da una visión bidimensional .

Calibrado del ocular micrométrico

Para el calibrado del ocular micrométrico necesitamos de un portaobjeto micrométrico ya que la regla que aparece en el ocular, en muchos casos no corresponde a ninguna unidad de medida.

Con el calibrado del ocular micrométrico conseguiremos determinar el valor que tiene cada división que vemos en el, generalmente suele tener cien divisiones.

Si es posible este proceso lo dejaremos en manos de un experto, o alguien que lo haya realizado con anterioridad o lo realizaremos bajo su supervisión, ya que el portaobjeto micrométrico suele resultar costoso y romperlo no sería del todo complicado para los que no tienen experiencia con el microscopio.

Si no tuviésemos a nadie que nos ayudase estos serían los pasos a seguir:

- 1°- Sustituiremos el ocular del microscopio por el ocular micrométrico
- 2°- Bajaremos la mesa de trabajo al punto mas bajo y colocaremos el objetivo de menor aumento 4x
- 3°- Colocaremos el portaobjeto micrométrico en la mesa del microscopio y enfocaremos hasta ver las dos escalas micrométricas
- 4°- Situaremos una escala sobrepuesta sobre la otra y haremos que coincidan en el punto 0
- 5°- Buscar una división del ocular que coincida con otra del portaobjeto micrométrico tomando el máximo de divisiones posibles tanto en el ocular micrométrico como en el portaobjeto micrométrico
- 6°- Por una regla de tres se calcula la medida en micras a lo que corresponde cada división del ocular
- 7° Este proceso lo realizaremos con el resto de objetivos

Medición de esporas con el programa Piximetre

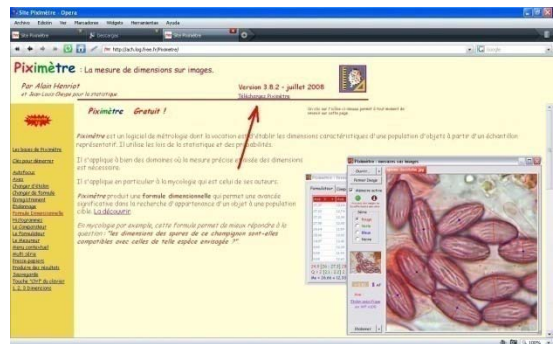
- ✓ Instalación
- ✓ Funcionamiento
- ✓ Medición
- ✓ Otras características del programa

Instalación

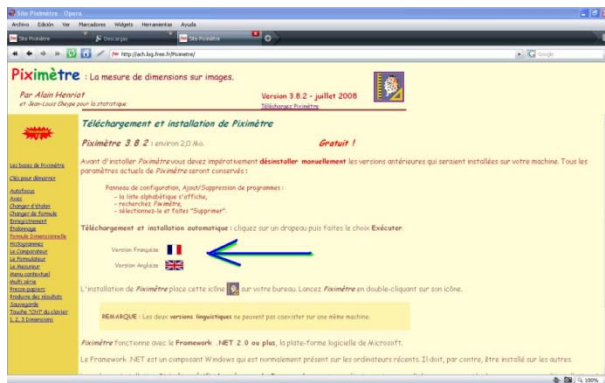
Para los que no disponemos de un microscopio con una cámara digital de fotografía adaptada para el tercer ocular con su propio programa de medición

Tenemos varios programas informáticos para la medición de esporas y demás elementos, hemos elegido este por ser gratuito y de un sencillo manejo.

Se llama Piximetre es totalmente gratuito y funcional, lo podéis descargar de esta pagina <http://ach.log.free.fr/Piximetre/>
Pinchado sobre el vínculo que hemos señalado



Luego debéis elegir el entre los dos idiomas disponibles. Francés e Inglés



La versión de Piximetre 3.8.2 requiere que tengáis instalado en el Ordenador Microsoft .NET Framework 3.5, si no lo tenéis instalado el mismo programa de instalación os llevara a la pagina de Microsoft donde tenéis que elegir la versión 3.5 también gratuito
Luego ya podréis instalarlo como cualquier programa

Funcionamiento

Configuración

Antes de empezar a medir tendremos que calibrar el programa, para una correcta medición.

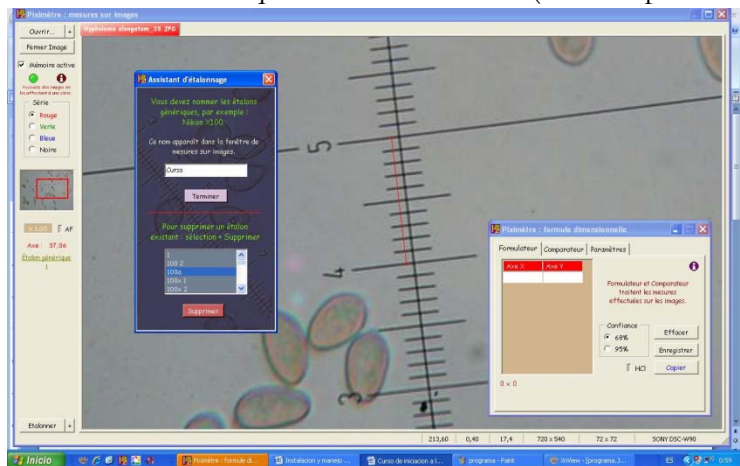
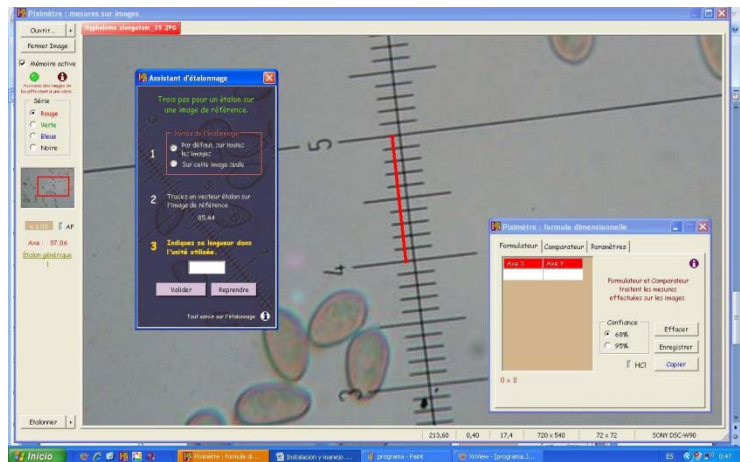
Primero pulsaremos sobre el botón **Ouvrir** que se encuentra en la parte superior izquierda para abrir una imagen que hemos hecho con el ocular micrométrico, a continuación tenemos que calibrar el programa para una correcta medición de los elementos que vemos en la fotografía

Pulsando sobre el botón **Etalonner** aparecerá el cuadro de dialogo donde elegiremos en el primer punto Por défaut sur toutes les imágenes con lo que se activará la opción dos que nos indica que tracemos una línea en la imagen (es recomendable que al menos ocupe diez rayas de la regla que vemos en la fotografía).

A continuación se activa la opción tres donde nos indica que introduzcamos en el cuadro en blanco el valor numérico que representa la línea que hemos trazado (en el apartado complementos del microscopio hemos explicado como calibrar nuestro ocular micrométrico para saber a cuanto equivale cada raya)

A continuación pulsaremos sobre el botón **Valider**

En el nuevo cuadro de dialogo que nos aparece, escribiremos en el cuadro en blanco una palabra que nos apetezca o nos resulte familiar y pulsaremos sobre **Terminer** con esto ya podemos empezar a medir

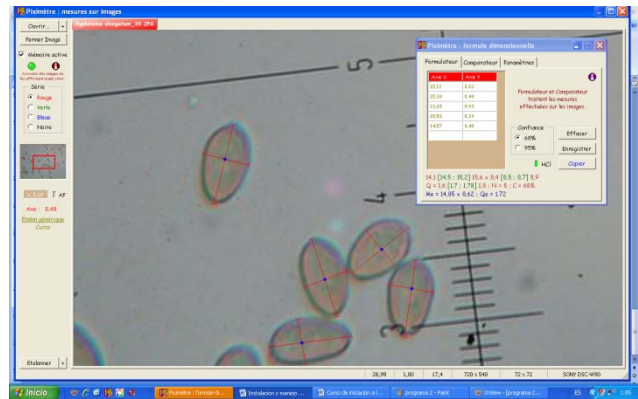


Medicion

Ahora solamente tenemos que pinchar con el ratón para trazar líneas desde los extremos de las esporas, primero el largo y después el ancho

El programa nos ira mostrando los datos de las mediciones en la ventana pequeña

También nos mostrara un resumen de los datos donde aparecen las medidas de mas pequeñas a mas grandes, así como la media de todas ellas



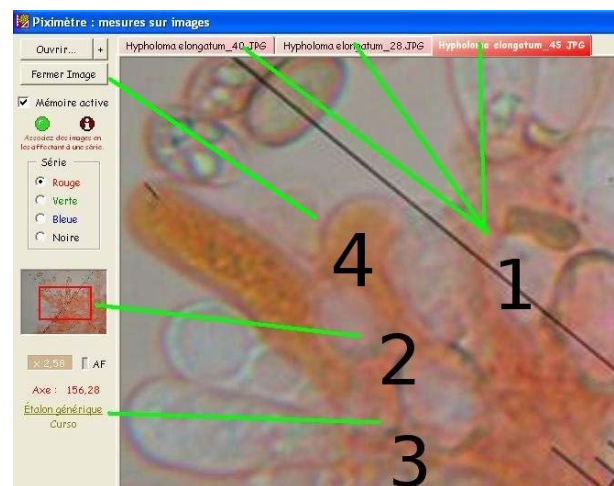
Otras características del programa

1.- Podemos abrir mas de una imagen pulsando sobre **Ouvrir** pero debemos tener presente que las fotografías debe haberse tomado si mover la cámara para que cumplan el mismo calibrado

2.- Para una medición mas cómoda Piximetre nos permite ampliar la imagen y para desplazarnos sobre ella, utilizaremos el cuadro rojo, pinchado sobre el y arrastrándolo en la ventana pequeña

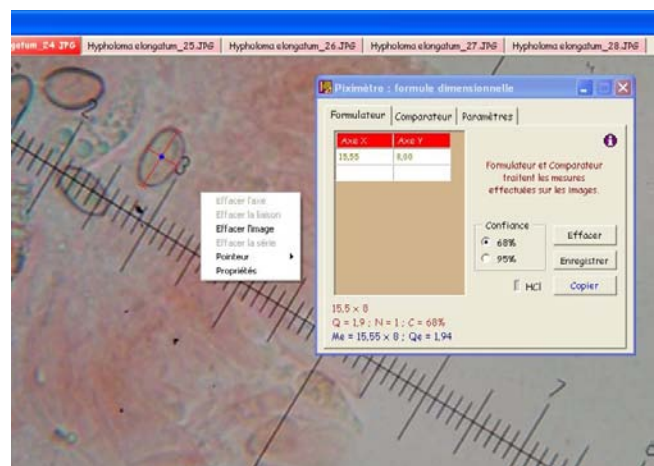
3.- Pulsando sobre el botón Etalon générique se iniciara un menú despegable donde poder elegir las diferentes configuraciones guardadas

4.-En el botón Fermer Image podremos cerrar la imagen activa, eliminando los datos de la medición en ella



Si cometemos algún error en las mediciones, siempre podremos borrar las líneas que hemos dibujado.

Para borrar una sola línea dibujada pincharemos con el botón derecho del ratón sobre ellas y eligiendo la opción Effacer l'axe, para borrar todas pincharemos sobre Effacer l'image



Utilización de la cámara para fotografía microscópica

No resulta fácil realizar una buena fotografía microscópica, será tan importante el buen conocimiento de nuestra cámara como la buena realización de la preparación a fotografiar. Con práctica conseguiremos poco a poco ir mejorando los resultados.

Existen cámaras en el mercado exclusivas para la fotografía microscopía que se introducen dentro del tercer ocular o en su defecto en el tubo donde va uno de nuestros oculares de visión. Estas cámaras además de costosas suelen carecer de una buena lente óptica por lo que las fotografías realizadas carecen de buena calidad, existen algunos modelos expresamente diseñados por los propios fabricantes de microscopios que serían de un elevadísimo coste. A favor tienen que son muy cómodas de usar ya que se conectan al ordenador mediante un cable USB viendo la imagen en la pantalla de este, facilitándonos la realización de la fotografía y la selección de la zona a fotografiar.

Tenemos también unos adaptadores para nuestra cámara digital por medio de adaptadores, anillos y oculares de rosca que conseguirán unir a los tubos de nuestro microscopio consiguiendo unos resultados muy buenos. Existen ciertos modelos de cámaras digitales en el mercado que podemos conectar a nuestro pc mediante el cable Usb con las que obtendremos las mismas comodidades que las anteriores. Este es el mejor método por que nos permite en un futuro cambiar de cámara si necesidad de cambiar el resto del material, además de la gran calidad en las fotografías que podemos obtener. Con un coste bajo.

Para los que no dispongan de estos adaptadores para la cámara también podemos realizar fotografía. Para la realización de esta, colocaremos la cámara sobre un trípode y haremos coincidir el objetivo de la cámara con el del microscopio, aproximándolos lo mejor posible. Existen en el mercado cámaras con unos objetivos muy pequeños que se acoplan al ocular del microscopio y con las que obtendremos buenos resultados.

Mantenimiento del microscopio

Solamente se requiere de unos pocos consejos para el mantenimiento de un microscopio

Al terminar de trabajar con él, dejaremos el objetivo de menor aumento, dejaremos la mesa de trabajo (Platina) completamente recogida, sin quedar ningún elemento que sobresalga de ella

Siempre que usemos el objetivo de inmersión debemos eliminar de él los restos de aceite

Lo ideal es que utilicemos toallitas especiales para la limpieza de lentes con un compuesto también diseñado para la limpieza de las lentes llamado xilol, el mismo método emplearemos para la limpieza de las demás lentes siempre que lo necesiten y si abusar de ello

No utilizaremos nunca alcohol para limpiar las lentes ya que su uso reiterado, dañará las lentes y su sujeción

Cubriremos con una funda o bolsa para que no coja polvo y si lo vamos a dejar un tiempo continuado sin usar lo guardaremos en su caja

Elección de microscopio

A la hora de adquirir un microscopio debemos tener presente que este debe reunir las características necesarias para el uso que le vamos a dar

Como ocurre con todas nuestras aficiones, en un principio adquirimos herramientas más económicas para luego ir mejorándolas con el tiempo

Lo mismo nos ocurrirá con el microscopio, no debemos hacer un gran desembolso para luego dejarlo guardado en un rincón cogiendo polvo.

Es recomendable que el equipo que elijamos no este muy desfasado, para si es necesario, ir añadiéndole mejores elementos

Lo mínimo que le podemos pedir a un micro es lo siguiente:

Que la longitud del tubo sea estándar (160 mm.)

Que sea binocular (por comodidad, aunque se puede uno apañar con un monocular) y si se quiere comodidad para hacer fotografía, triocular (aunque con un binocular e incluso un monocular se pueden hacer).

Que tenga al menos 3 objetivos (mejor 4 e ideal 5) de 10X, 40X y 100X (con 4 añadir el de 4X y con 5 añadir uno de 60X o de 20X). La calidad y la cualidad de dichos objetivos marca la diferencia en los precios: normales (acromáticos), mejores (semiplanacromatico), ideales (planacromaticos) y de soñadores (planapocromaticos).

Que tengan una luz de al menos 20 w.

No le daremos menos importancia a la mecánica, como son los tornillos de enfoque y a la mesa de trabajo (stage) con ejes de coordenadas X e Y para poder mover el portaobjeto de forma milimétrica y cómoda.

Aparte debemos adquirir un objetivo micrométrico para poder realizar mediciones.

Errores a evitar

- ✓ Solamente utilizaremos el aceite de inmersión con el ocular de de 100x y evitaremos cambiar al resto de objetivos siempre que tengamos la gota de aceite sobre el cubreobjetos ya que estos objetivos no esta diseñados para resistir un baño de aceite y podremos dañarlos irreversiblemente
- ✓ Debemos aprender a reconocer las burbujas de aire y no confundirlas con esporas de paredes gruesas
- ✓ No confundir los basidiolos (basidios inmaduros) con cistidios
- ✓ A la hora de la recolección de hongos para su observación en el microscopio es importantísimo guardarlos independientemente a poder ser envolver en papel de aluminio para evitar la contaminación de las esporas de unos con otros, ya que nos llevaría a cometer grandes errores
- ✓ Nos aseguraremos ante una reacción negativa, del buen estado de los reactivos y que no sean demasiado viejos (se puede comprobar la validez de un reactivo probándolo sobre un hongo ya conocido y viendo su resultado)
- ✓ Si el microscopio no viniese montado (cosa que es frecuente) a la hora de montar los objetivos en el revolver, se deben de montar de menor a mayor y habituarse a la hora de usarlo en empezar por el de menor aumento e ir pasando progresivamente a mas aumento y acostumbrarse a hacerlo así para evitar golpear los objetivos de mayor aumento (a no ser que el micro tenga tope)
- ✓ No utilizaremos el portaobjetos micrométrico para realizar la elaboración de una preparación que luego vallamos a observar en el microscopio
- ✓ A la hora de sustituir la bombilla de la fuente de alimentación debemos tener presente las indicaciones del fabricante de nuestro microscopio y respetar el voltaje de dicha bombilla Colocar una bombilla, con distintas especificación en el microscopio va a reduciría notablemente su calidad del visionado

Basidiomycetes (teoría y ejercicios)

- ✓ Himenio
 - Observación de las esporas

El himenio es la parte fértil de hongo donde maduran las esporas.

Las basidiosporas son unidades de propagación de origen sexual que provienen de un basidio. Son capaces de germinar cuando las condiciones son favorables, originando un micelio. Van a ser una de las partes fundamentales en el estudio de los hongos al microscopio.

Mientras que macroscópicamente los hongos son muy variables, dependiendo de las condiciones climatológicas y del hábitat, las esporas maduras son bastante inalterables y guardan las mismas características dentro de la especie, como el tamaño, la forma .. ect.

Cada detalle de la espora nos va ayudar a acercarnos a la correcta determinación de la especie, cuantos más datos tengamos en cuenta, mas fiel será la determinación de la especie.

A la hora de la medición debemos tener presente que son células tridimensionales y no planas (bidimensionales) como nosotros vemos en el microscopio, por lo que debemos reconocer si tienen una vista frontal diferente de la vista lateral y en este caso debemos medir las dos vistas

La forma correcta de usar material para medición es obtener una esporada, ya sea creada por nosotros o de aquella encontrada en los sombreros de algunos ejemplares por las deposiciones de otros sombreros que se encuentran encima

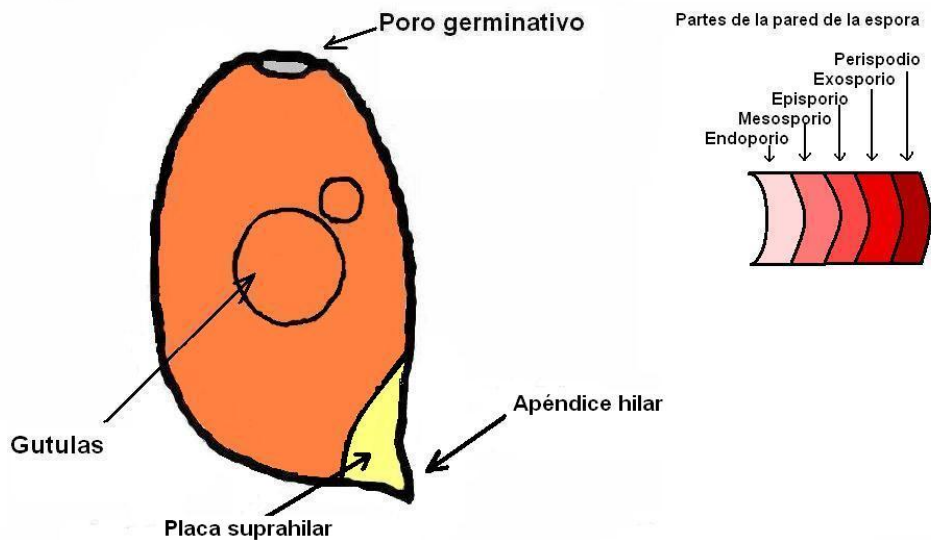
Aunque solemos recurrir a tomar una muestra de la parte alta del pie o (de las láminas), el resultado no será tan fiable como en los casos anteriores ya que muchos hongos tienen las láminas decurrentes y cogéramos una mezcla de esporas inmaduras y maduras

Esporada sobre el sombrero de
Entoloma sinuatum



Partes de la Espora

A parte de la forma, tamaño y ornamentación, que son las principales características, las esporas tienen otras características que nos van ayudar a la correcta identificación de la especie.



El apéndice hilar es el resto que queda en la espora de la fractura del esterigma del basidio.

Comprobaremos si tienen placa suprahilar que es una zona deprimida y generalmente desnuda contigua al apéndice hilar y bien delimitada habitualmente

El poro germinativo se encuentra en la parte opuesta al apéndice hilar y es una zona más débil de la pared de la espora, será el sitio por donde la espora germinará, de tenerlo, tendremos en cuenta tanto el tamaño como la posición que ocupa en la espora

Gutulas son las gotas de aceite que se encuentran en el interior de las esporas, a observar con agua. Algunas esporas tienen septos (tabiques, divisiones) tendremos en cuenta el número de ellos además

Por último observaremos las dimensiones de la pared de las esporas, si es gruesa o delgada y si poseen un perispodio diferenciado, levantado o plegado (caliptrada).

Las dimensiones de las esporas serán otro de los datos que trataremos con más cuidado, cuantas más esporas maduras midamos más fiable será nuestro resultado

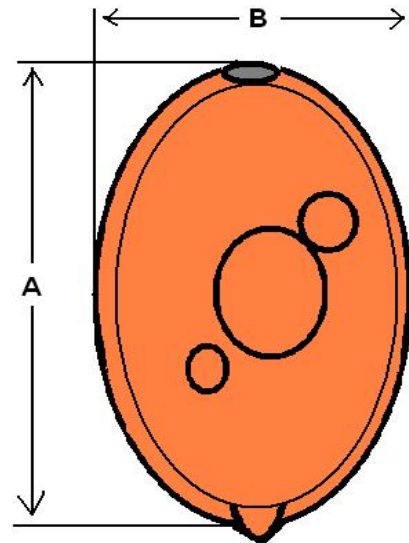
Medir esporas

La unidad de medida se representa en micras μm que es el equivalente a la milésima parte de un milímetro. La forma correcta de expresarlo es 10-12 X 6-8 donde las dos primeras cifras corresponden al mínimo y el máximo del largo de la spora (A) y las dos segundas (B) son el mínimo y el máximo del ancho. También, se suele añadir una cifra entre paréntesis que indica las medidas máximas no usuales que presentan algunas esporas.

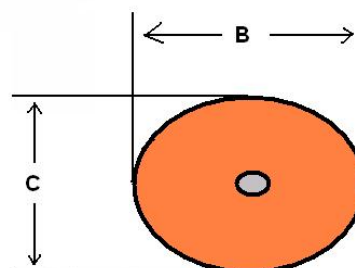
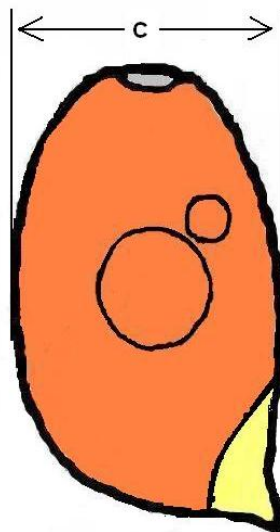
No introduciremos el apéndice hilar en la medida del largo por que como ya hemos explicado, corresponde a parte del esterigma del basidio y no a la spora; al igual que no introduciremos la ornamentación. Si actuamos así, debemos de tenerlo en cuenta a la hora de buscar información en la biblioteca que tengamos (u otro método que usemos) y qué han tenido en cuenta, al tomar esos valores, los autores de dicha información.

Normalmente las esporas tiene una sección transversal de elipsoide a redondeada donde (C) es igual a (B), pero existen casos donde la vista frontal no es igual a la vista lateral, como ciertas especies de algunos géneros (Coprinus, Psathyrella ect.) entonces indicaremos las medidas con este formato (A) x (B) x (C) siempre añadiendo el mínimo y el máximo.

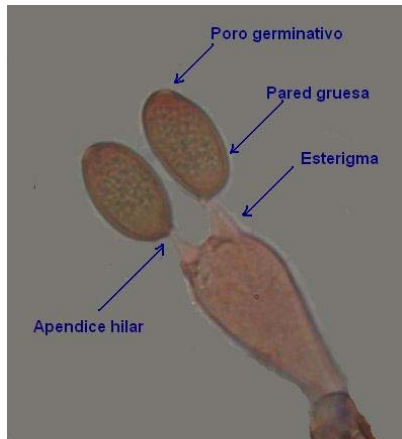
El Q es el resultado de dividir el largo por el ancho de la spora $Q = A/B$. tendremos en cuenta aquí también el mínimo y el máximo y la media



Debemos tener presente que ciertos colorantes y reactivos pueden aumentar sensiblemente la medición en material fresco por lo que lo ideal es medir con agua destilada o con colorantes que no lleven dilatadores (como el amoniaco).



Esporas de *Panaeolus semiovatus* unidas al esterigma basidial por el apéndice hilar.

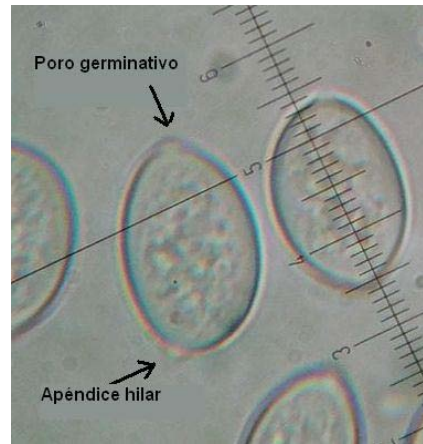


Vista frontal y lateral de las esporas

Psilocybe phyllogena

Poro germinativo y apéndice hilar de

Macrolepiota excoriata



Poro germinativo central

Stropharia semiglobata



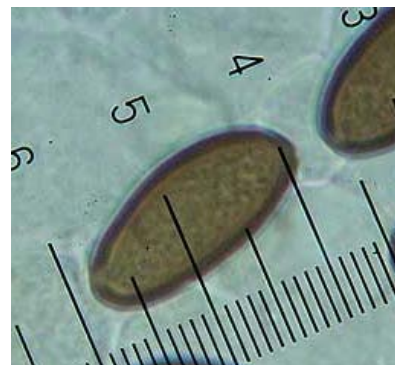
Placa suprahilar y perisporio

Galerina marginata



Poro germinativo dorsal

Stropharia dorsispora



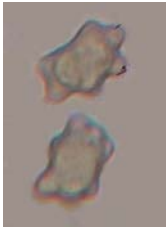

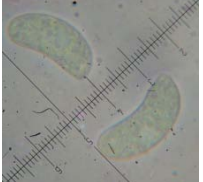
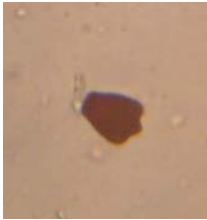


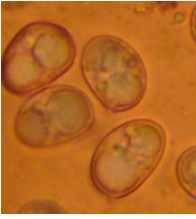



Forma

Bas (1969) estableció unos valores para las diferencias en la forma esporal dependiendo del Q. Esta escala nos sirve de orientación para empezar pues se les dan muchos más nombres a estas formas y sus formas intermedias.

- 1,0 - 1,05 globosa
- 1,05 - 1,15 subglobosa
- 1,15 - 1,30 anchamente elipsoidal
- 1,30 - 1,60 oblonga
- 2,00 - 3,00 cilíndrica
- Mayor de 3 baciliforme

Vamos a colocar algunos ficheros para que os sirvan de ayuda durante el curso, intentaremos completar el nuestro con nuestras propias imágenes. Ver el archivo [Esporas forma y ornamentacion.pdf](#) que hemos subido a la página web donde podéis ver las distintas formas

<p>Globosas</p>  <p>Laccaria</p>	<p>Fusiforme</p>  <p>Gomphidius</p>	<p>Gibosas</p>  <p>Inocybe</p>	<p>Elipticas</p>  <p>Conocybe</p>	<p>Cilíndricas alantoides</p>  <p>Auricularia auricula-judae</p>
<p>En forma de mitra</p>  <p>Coprinus</p>	<p>Amigdaliformes verrugosas</p>  <p>Galerina</p>	<p>Truncada</p>  <p>Xerocomus</p>	<p>Subglobosas</p>  <p>Xerula</p>	<p>Angulosas</p>  <p>Entoloma</p>

Ornamentación

Como explicábamos en el apartado de reactivos y colorantes solamente debemos utilizarlos cuando sean estrictamente necesarios.

Para este detalle no siempre vamos a poder usar agua destilada y es entonces cuando debemos emplear reactivos y colorantes. Los más recomendados para la observación de la ornamentación son, Azul de algodón al láctofenol para ver la reacción cianófila en las paredes de las esporas y para ver la ornamentación en ascomycetes, Azul de cresilo para ver la metacromasia en las paredes de las esporas y Melzer para ver la reacción amiloide y dextrinoide

Teoría y práctica II (Arista)

- Laminas
 - Observación de la arista
 - Fertilidad de la arista
 - Queilocistios

Elementos del Himenio

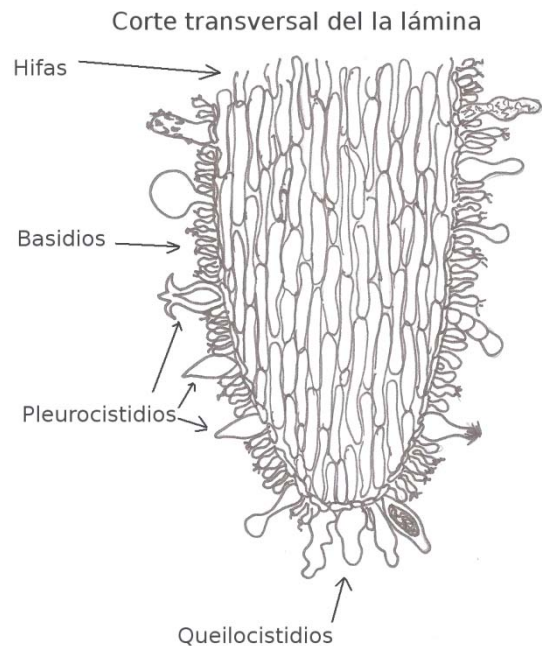
El himenio es la parte fértil del hongo.

En los basidiomycetes se encuentra en la parte inferior del sombrero, en los heterobasidiomycetes se encuentra en la superficie del basidiocarpio y en los Gasteromycetes en su interior.

Lamina

En la lamina distinguiremos dos partes, la externa donde se encuentran tanto células fértiles como estériles (Basidios, basidiolos y cistidios) y una interna en la que veremos la trama laminar

Existe una zona intermedia entre la trama y las células externas llamada subhimenio que en distintos géneros esta formada por hifas de distinta forma y tamaño con en el caso de los *Gymnopilus*



La arista de la lamina

La arista es otra de las zonas del carpóforo a la que debemos prestar su debido estudio, en ella vamos a encontrar células que nos aportaran mas datos para la confirmación de la especie que estemos estudiando.

Existen distintos tipo de aristas

Artista heterogénea: es aquella en la que encontraremos células de distinto tipo.

Arista homogénea: es aquella en la que solamente encontraremos células de un solo tipo.

Arista fértil: donde encontraremos los basidios capaces de producir esporas, basidiolos y cistidios, especialmente es este tipo de arista nos puede resultar imposible separar los basidiolos de los cistidios si estos tienen la misma forma y tamaño, a no ser que estos presenten algún tipo de reacción distinta a determinados reactivos.

Arista estéril: en este tipo de arista al no tener basidios, es más que razonable pensar que lo que observamos en ella son cistidios y no basidiolos. Este tipo de arista podremos identificarla con la simple ayuda de una lupa e incluso a simple vista, en los ejemplares adultos observaremos que mientras la cara de la lamina va adquiriendo el color de la esporada, la arista permanece de color blanco o del color que tiene la lamina de joven.

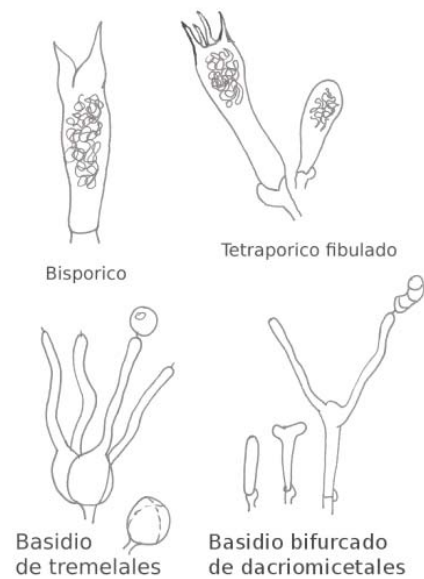
Células que podemos ver en la arista

Basidios

Son las células u órganos de los basidiomicetes donde se producen las basidioesporas, generalmente tienen forma claviforme mas o menos, con unas dimensiones que son importantes medirlas, con la prolongación de sus esterigmas y sin dicha prolongación (e incluso medir la longitud y el grosor de los esterigmas si estos son significativos).

Generalmente tienen cuatro esterigmas (tetrasporicos), con dos (Bisporicos) con uno (Monosporico) y pueden llegar a tener hasta seis u ocho como en el genero Chantarellus

Otro dato importante a observar es si en la base del basidio se encuentran fíbulas o no (dato algunas veces difícil de observar, sobre todo cuando las fíbulas son muy pequeñas). Es necesario disociar bien la muestra (con golpecitos sobre el cubre para poder observarlas)



En un mismo hongo se pueden encontrar basidios tetrasporicos, bisporicos y monosporicos aunque por lo general estos son casos excepcionales deberemos de tenerlo presente por si en el ejemplar a estudiar se diesen variaciones de este tipo.

El esterigma es la parte alargada que se forma en el extremo del basidio y en el extremo del propio esterigma se va a formar la espora, la cual, cuando este madura se desprenderá dejando sobre el basidio el esterigma propiamente dicho y llevándose en su extremo una pequeña parte del esterigma pero que ya recibe otro nombre: apícula o apéndice hilar.

Basidioslos

Son los basidios inmaduros que no han desarrollado aun los esterigmas, pero que se convertirán en basidios o bien son basidios abortados que nunca van a tener esterigmas ni esporas.

Cistidios

Los cistidios son las células terminales de las hifas, que no producen esporas

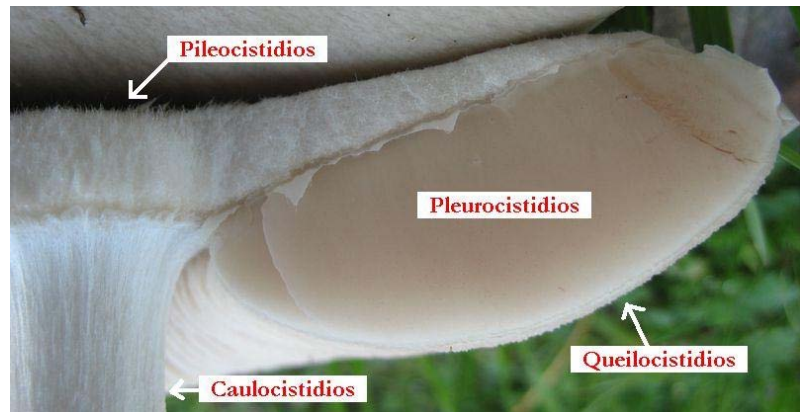
No se pone de acuerdo a todo el mundo sobre cual es el cometido de los cistidios, aunque la mayoría opta por que sirven para mantener separados los basidios entre sí y así ayudar a la maduración de las esporas.

Generalmente suelen ser de mayor tamaño que los basidios, por lo que también se piensa que ayudan a la separación de las láminas y con ello ayudarían a la dispersión de las esporas

Otra teoría es aquella en la que se piensa que pueden ayudar a la dispersión de sustancias volátiles (Olores)

También como órganos excretores de ciertas sustancias que suelen cristalizar (véase los cistios metuloides de los *Inocybes*)

Otra teoría es que consiguen mantener aire y humedad para el buen desarrollo de las esporas



Todas estas teorías son posiblemente validas todas ellas.

Algunos cistidios tienen partículas de Oxalato cálcico que pueden resultar solubles con productos alcalinos por lo que siempre debemos de actuar con precaución, cuanto mas si sabemos que el ejemplar que vamos a examinar puedan tenerlos

Dependiendo de su ubicación podemos separarlos en:

Dermatocistidios: que se encuentran en la superficie de la seta y que son de dos tipos, pileocistidios que están situados en la pellis del pelo y caulocistidios en la pellis del pie

Cistidios himeniales: son los que nos encontramos en el himenio, los tenemos de dos tipos Queilocistidios en la arista de la lámina y Pleurocistidios situados en la cara de la lámina

Endocistidios o cistidios de la trama: son los que encontramos en la trama pileicaestipital o bien en la trama himenoforal

Según su morfología, función y origen

Podemos separarlos:

Leptocistidios

Con paredes delgadas y contenido citoplasmático homogéneo, no tienen su origen en la trama y son fácilmente diferenciables de los basidios.

Lamprocistidios

De paredes gruesas en algunas partes o en su totalidad, con el contenido no diferenciable del resto de células del himenio y de distinta forma que los basidios.

1. **Setas** terminaciones agudas que se vuelven de color marrón a marrón negruzco con hidróxido potásico.
2. **Setulas** pequeños lamprocistidios con forma parecida a las setas que reaccionan con hidróxido potásico.
3. **Setiformes** largos, agudos que no reaccionan con hidróxido potásico.
4. **Metuloides** con el ápice redondeado o con formas variables que pueden estar o no estar incrustados o pigmentados y presentan reacción dextrinoide, amiloide o no amiloide.
5. **Microescleridos** son aquellos que están sumergidos en la trama y que pueden tener cualquiera de las formas de los enumerados anteriormente.

Gleocistidios

Son cistidios con contenido granular o amorfo que pueden reaccionar con ciertos reactivos.

1. **Pseudocistidios o macrocistidios** tiene su origen en la trama y se proyectan en el himenio, superficie del píleo o pie, suelen ser metacromáticos en azul de cresilo.
2. **Crisocistidios** son aquellos que su contenido se vuelve amarillo con soluciones alcalinas como amoniaco o potasa, están presentes en los géneros Stropharia e Hypholoma.
3. **Feocistidios** débilmente dextrinoide y con contenido de color marrón.
4. **Coscinocistidios** son los que tienen la superficie porosa.

Hyfidios

Cistidios vermiformes sin ningún contenido de paredes gruesas o finas a veces fuertemente ramificadas

1. **Asterofisis** cistidios con paredes finas, en forma de estrella ensanchados inferiormente.
2. **Dendrofisis** a modo de árbol con sus ramas que tiene formas asimétricas y de distinta longitud.
3. **Acantofisis** cuando de un eje central salen numerosas ramificaciones cortas y de longitud parecida.
4. **Dicofisis** dicotómicamente ramificados.

Cistidios en forma de hifas

Son estructuras pluricelulares que se proyectan en el himenio.

1. **Estructuras queilocatenuladas** son hifas pluricelulares formadas por células dispuestas en cadena que se desarticulan con facilidad y generalmente anchamente elípticas.
2. **Hifas cistidiformes** similares a queilocatenuladas pero los elementos no se diferencian ni se desarticulan.

Forma externa

Según su morfología general

1. **Filiformes** de paredes finas muy estrechas y paralelas.
2. **Cilíndricos** filiformes de contorno más ancho.
3. **Ventricosos** ensanchado en el centro y deprimido en los extremos.

Atendiendo al ápice

a) Cistidios de ápice obtuso

Ápice redondeado u obtuso no alargado.

1. **Claviformes** estrechos excepto en el ápice donde se ensancha en forma de maza.
2. **Cilíndricos-claviformes** claramente cilíndricos en el que se ensancha el ápice a modo de maza.
3. **Piriformes** se van ensanchando progresivamente hacia el ápice (en forma de pera).
4. **Esferopedunculados** ápice ensanchado de forma globosa a subglobosa, con zona deprimida hacia la base.
5. **Napiformes** cuando se deprimen bruscamente hacia la base y se ensanchan hacia el ápice.
6. **Turbinados** bruscamente ensanchados hacia el ápice y bruscamente estrechados hacia la base, en forma de cono.
7. **Vesiculados** inflados a modo de globo en la parte apical y todo el en forma de vesícula.

b) Cistidios de ápice agudo

Cuando el ápice termina en punta.

1. **Aciculares** filiformes con ápice agudo en forma de aguja.
2. **Aculeados** cistidios aciculares con la porción basal un poco ensanchada.
3. **Subulados** con el ápice bruscamente contraído y la zona media ensanchada
4. **Lanceolados** angostamente elípticos y acuminados en sus extremos

En función de la forma progresiva o no de acabar en punta podemos distinguir dos tipos:

- Acuminadas** si el ápice se va volviendo gradualmente más agudo.
- Mucronadas** si lo hace de manera abrupta.

c) apéndices apicales de los cistidios

1. **Ventricoso-rostrado** parte media y basal ventricosa y el ápice con apéndice de forma y longitud variable.
2. **Ampuliforme** similar a ventricoso-rostrado excepto en el rostro que es ancho en forma de amapola.
3. **Digitado** cuando termina en varios ápices y la parte inferior esta ensanchada como una mano.

4. **Diverticulado** con saliente variables y cortas ramificaciones que cubren todo el cistidio.
5. **En brocha** ampuloso con protuberancias diverticuladas y equinadas.
6. **Equinado** con numerosas terminaciones en forma de espinas que cubren todo o parte del cistidio.
7. **Estrangulado** cuando presentan constricciones y expansiones irregulares.
8. **Lageniforme** con la base ensanchada y la parte apical terminada en un cuello largo.
9. **Lecitiforme** con base ancha a vesicular que se estrecha bruscamente para diferenciar una parte apical subglobosa (recuerdan un bolo grueso de bowling).
10. **Moniliforme** construcciones regulares a modo de cadena.
11. **Tibiforme**. Subventricoso pero con un estrecho y largo cuello con el ápice subgloboso
12. **Utriforme**. Ápice anchamente obtuso y la zona media ensanchada
13. **Capitados** cilíndricos o filiformes con el ápice subgloboso

Llamaremos **Versiformes** cuando se presenten cistidios con formas variables.

Además, a todos los cistidios con algún tipo de saliente en forma de apéndice se les llama en general **Rostrado**

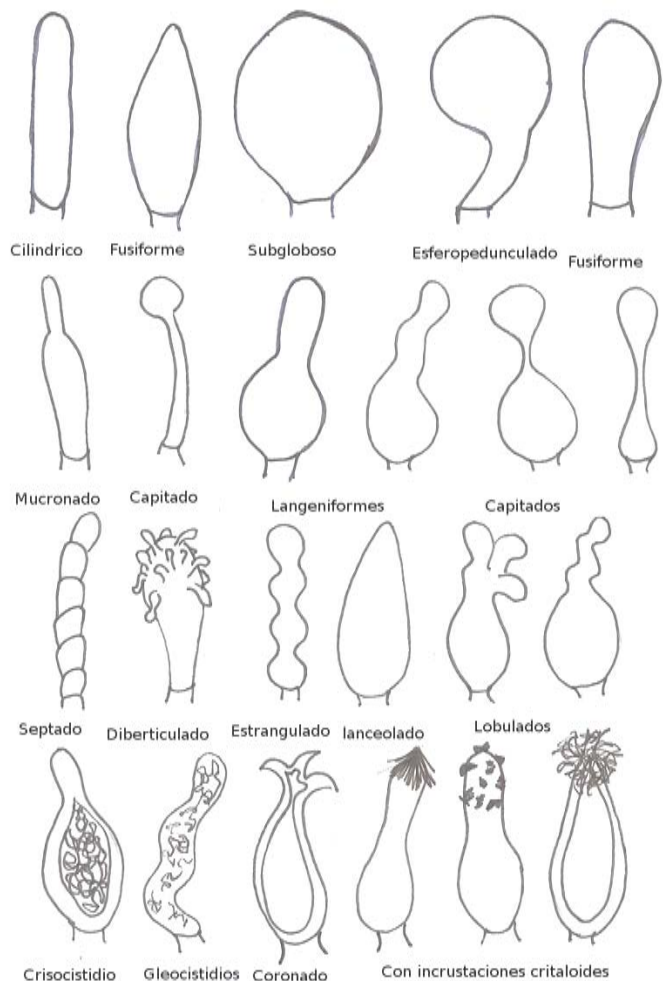
Todos estos son ejemplos de los tipos de cistidios que nos podemos encontrar y aunque no están todas las formas, si las principales. También se pueden encontrar formas intermedias y de difícil catalogación.

Tipos de Cistidios

Queilocistidios:

Son los cistidios que se encuentran en la arista de la lámina

Os dejamos un fichero en el apartado archivo llamado [TIPOLOGIA DE LOS BASIDIOS Y CISTIDIOS.pdf](#) para que os sirva orientación a la hora de describir los vuestros

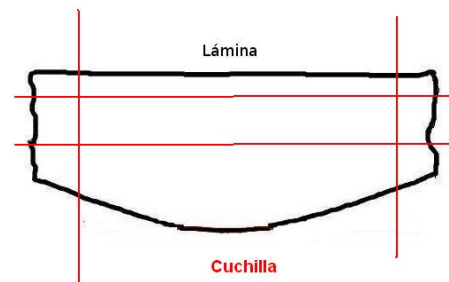


Teoría y práctica III (Trama laminar)

- Observación de la cara de la lamina
 - Basidios y basidiolos
 - Pleurocistidios
- Trama de la lamina
 - Tipo de trama
 - Hifas
 - Fíbulas

Pleurocistidios

Si en la observación de la arista debíamos tener precaución para no confundir queilocistios con pleurocistidios para localizar estos últimos nos resultara más fácil, realizando cuatro cortes a la lámina uno por cada lado, y los cistidios que nos quedan serán Pleurocistidios



En algunos casos tienen la misma forma que los Queilocistidios pero a diferencia de estos suelen ser más escasos y de mayor tamaño.

La Carne

Las hifas que componen la carne son otro dato que nos ayudara a identificar especies. Por sus características estas pueden ser.

Celulosa cuando esta compuesta de células globosas y piriformes

Himeniformes cuando están compuestas de células que el largo de estas no supera el doble del diámetro de las mismas.

Filamentosas cuando la longitud de las hifas supera el doble del diámetro

Debemos observar si las hifas cuentan con ramificaciones sin tabicar pues en este caso además son diverticuladas

Estas diverticulaciones pueden optar por una gran variedad de formas desde simples verrugas en brocha o en ramificaciones llamadas coraloides o de diverticulaciones amplias y cortas que se suelen denominar “en forma de puzle” o simplemente en ramificaciones banales

La Trama

La porción interna de un basidiocarpo se denomina trama o contexto, la dividiremos en tres zonas según su localización, trama himenoforo, trama pileica y trama estíptil

Trama del himenoforo

Costa de dos capas, la trama del himenoforo propiamente dicha y la del subhimenio

Trama del himenoforo propiamente dicha

Es la zona del carpóforo que soporta el himenio. Con respecto a la estructura macroscópica puede presentarse de distintos tipos de himenoforos, como son el himenoforo lamelal e irregularmente lamelado, himenoforo tubular formado por poros dedaliformes, angulares isodiamétricos etc. e himenoforo irregular hidnoides, irpicoide, liso, etc. (que corresponden a hongos con laminas, tubos y púas)

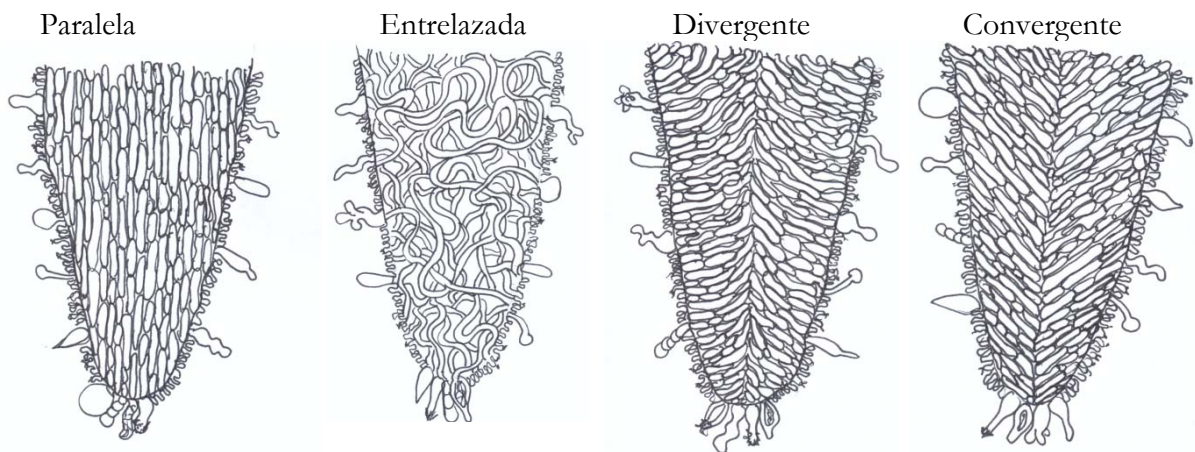
Trama laminar

La trama laminar es el conjunto de células llamadas hifas mas o menos ordenadas, que forman la carne de la lamina.

Tiene un importante papel en la identificación de los géneros. Con relación a su estructura microscópica podemos distinguir los siguientes tipos.

Por la manera que están ordenadas:

1. **Paralela** formada por hifas paralelas entre ellas.
2. **Entrelazada** hifas entrelazadas entre ellas.
3. **Bilateral o divergente** formada a partir de una agrupación de hifas de disposición paralela o subparalela denominada mediostrato del cual se proyectan hifas que emergen oblicuamente hacia el himenio de manera divergente con respecto a la zona central de la lamina y constituyendo el estrato lateral.
4. **Convergente o inversa:** se originan al confluir las hifas hacia el centro de la trama, donde se forma en principio un incipiente mediostrato que desaparece en la maduración



El estudio de la trama se debe realizar en diversos estados de maduración de la seta.

Además del tipo de trama, debemos prestar atención si las hifas son lisas o con incrustaciones, etc. Prestando atención a la reacción que pueden producir con distintos reactivos.

Subhimenio

Es zona comprendida entre las células fértiles y la trama laminar.

Puede variar según los tipos:

Ramificado formado por hifas pequeñas, cortas y estrechas

Esfero-ramificado cuando las células que lo componen son mezcla de células globosas y ramificadas

Coraloide constituido por células de forma irregular con proyecciones características que nos recuerdan un coral.

Celular compuesto por células subglobosas a isodiamétricas.

Teoría y práctica IV (Cutícula y pie)

- ✓ Revestimiento
 - Pileipellis
 - Tipos de estructuras
 - Pileocistidios
 - Hifas
 - Pigmentación de las hifas
 - Estipitipellis o caulopellis
 - Caulotrama
 - Caulocistidios

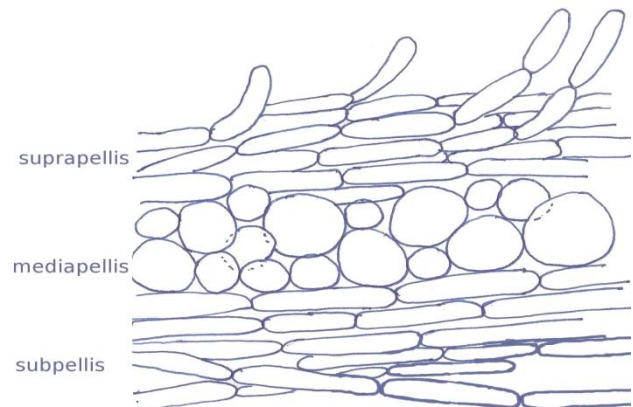
La Pellis

La pellis o cutícula es la capa superficial que cubre los basidiomicetes, la pellis del sombrero se llama pileipellis, mientras que la que cubre el pie es la estipitipellis.

Capas de la pellis

La pellis está compuesta de una o varias capas que son un carácter taxonómico muy importante en el orden Agaricales.

Cuando esta formada por una capa se llama suprapellis, si está formada por dos capas, la situada entre la parte inferior y la trama se llama subpellis, y si tiene tres capas, a la capa situada entre las dos anteriores la llamaremos mediapellis



Suprapellis

Tres grupos:

Indiferenciada:

Cuando las células son de la misma forma y están en la misma posición que las hifas de la trama y, evidentemente no se diferencian de la trama.

Cutis:

Cuando las células están más o menos paralelas con la trama pero son diferenciables de dicha trama.

Dermis:

Cuando las células están en posición perpendicular con relación a las hifas de la trama.

Tipos de Dermis

Dependiendo de su forma la podemos dividir en:

Los dos primeros tipos se podrían englobar en uno solo pero aquí los separamos siguiendo a algunos autores ya que creemos ayuda a su estudio dicha separación.

-Celular: formadas por una sola capa de células subglobosas a isodiamétricas, (ejemplos: algunas especies de *Coprinus*, *Cistoderma*, *Cystolepiota*, *Psathyrella*).

-Epitelio: formada por células subglobosas a isodiamétricas encadenadas (ejemplos: algunas especies de *Cistoderma*, *Echinoderma*=*Lepiota* secc. *Echinatae*)

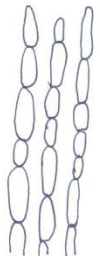
-Himenodermis: formada por células claviformes, con forma similar a los basidios (ejemplos: algunas especies de *Agrocybe*).

-En empalizada: formada por hifas que alcanzan todas el mismo nivel e integradas por células claviformes a anchamente elipsoidales o alargadas.

-Tricodermis: formada por hifas filiformes con diferentes longitudes. Si terminan todas al mismo nivel lo llamaríamos tricodermis en empalizada.

Todos estos tipos de dermis pueden estar compuestos por células gelificadas para las que utilizaremos el prefijo ixo(viscoso) delante del término (ejemplo: *Ixotricodermis*).

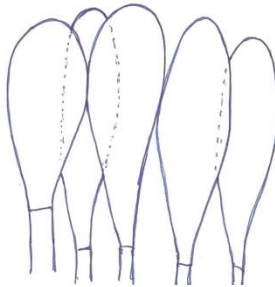
Equinodermis
Células isodiamétricas
encadenadas



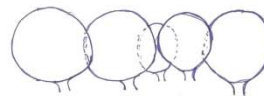
Epitelio



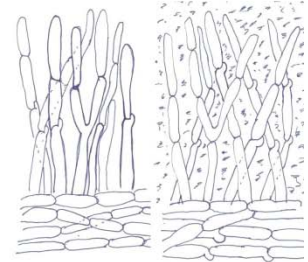
Himeniforme



Celular



Tricodermis Ixotricodermis



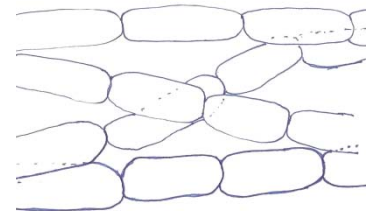
Tipos de Cutis

-Paralelocutis: formado por hifas paralelas entre ellas, parten desde el disco y finalizan en el margen pileico (ejemplos: algunas especies de *Entoloma*).

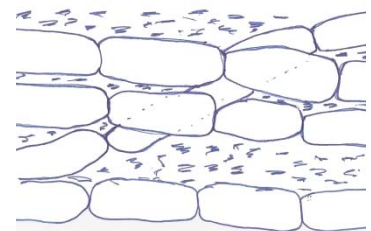
-Mixtocutis: formado por hifas sin orden, enmarañadas y que no son radiales con respecto a la superficie pileica (*Collybia dryophila*).

-Enterocutis: cuando la suprapellis está formada por hifas con elementos inflados (ejemplos: en algunos *Entolomas*).

Cutis



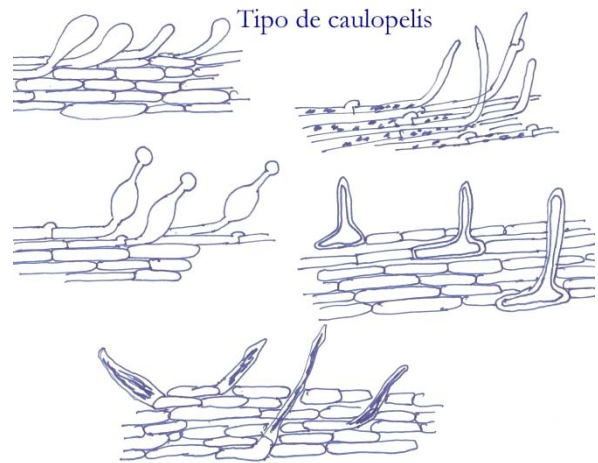
Ixocutis



Celulas diferenciables de la pellis

Dermatocistidios

Elementos que pueden estar presentes en la pileipellis (pileocistidios) o estipitepellis (caulocistidios) diferenciándose por su forma de las células circundantes de la suprapellis, de la mediopellis o de la subpellis donde pueden localizarse (si están presentes).



Aglutinaciones hifales

Surgen al agruparse en grupos las hifas de la pellis (ejemplo: en especies de Crinipellis).

A tener en cuenta que no están todas los posibles tipos de formaciones hifales de la suprapellis ni de los elementos diferenciables que nos podemos encontrar en esta.



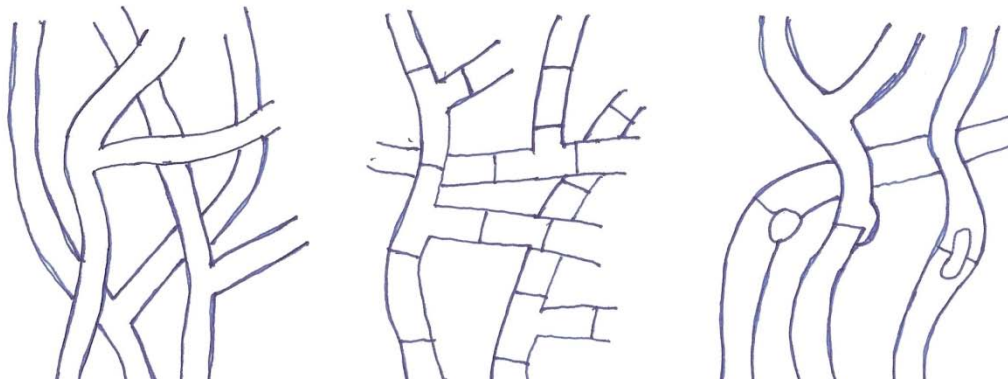
Hifas

Son las unidades que forman las estructuras de los hongos, aparecen generalmente divididas por tabiques transversales llamados septos, a las cuales llamaremos hifas septadas, aquellas que no tienen tabiques las llamaremos aseptadas.

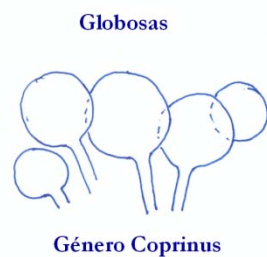
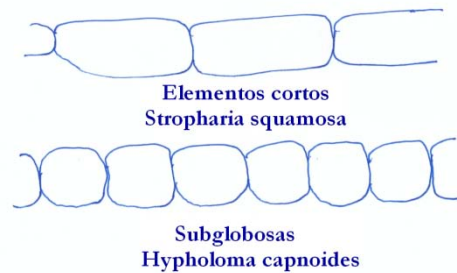
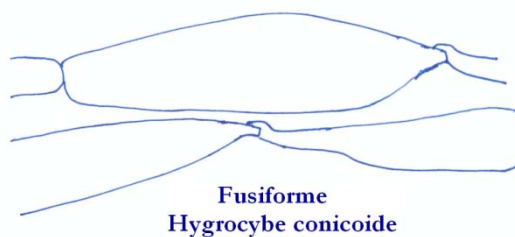
Otras hifas se independizan transformándose en células con forma subglobosa a isodiamétrica, libres e hinchadas llamadas esferocistos que podemos encontrar con facilidad en el velo universal de géneros como Coprinus, Amanita, Cistoderma y en la trama pileica de Russula o Lactarius.

Llamaremos trama heterómera a aquella en la que aparezcan esferocistos y si no aparecen estos la llamaremos trama homómera.

Hifas sin tabicar, tabicada e hifas con fibulas



Tipología

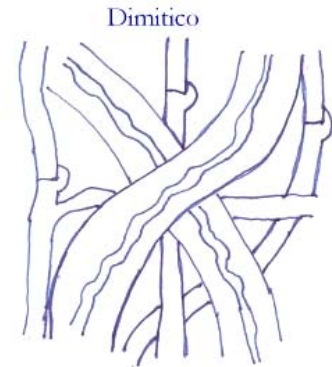


Sistemas de hifas

Monomitico: compuesto por un solo tipo de hifas llamadas generativas las cuales son de pared delgada, son ramificadas, delgadas y septadas. Pueden tener o no fibulas. Son capaces de dar origen a las células fértiles (himenio). Se tiñen significativamente con Azul de algodón.



Dimitico = esqueletodimitico: compuesto por dos tipos de hifas, las generativas (definidas en monomitico) y esqueléticas: de pared gruesa, no ramificadas, no tabicadas y son rectas o algo flexuosas. O también generativas y conectivas (también llamadas envolventes): de paredes frecuentemente gruesas, son ramificadas y tortuosas y sin tabiques.

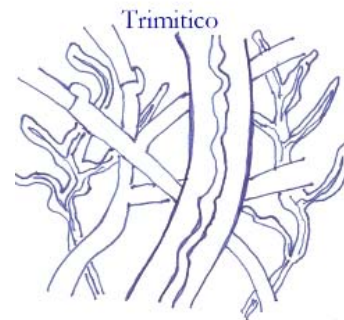


Trimitico: compuesto por los tres tipos de hifas generativas, esqueléticas e hifas conectivas.

Algunos autores optan por dividir más:

Anfimitico: es una variante del tipo dimitico, en el cual las hifas generativas se asocian a las hifas conectivas, frecuente en los Agaricales.

Fisalomitico: aplicable a cualquier sistema de hifas en el que tenga estas hifas hinchadas propias en los agaricales



Sarcomitico: sistema compuesto de dos (Sarcodimitico) o tres (Sarcotrimítico) tipos de hifas: generativas y esqueléticas o generativas, envolventes y esqueléticas, pero en todos estos casos las hifas esqueléticas tienen una particularidad: son de pared delgada.

Existe otro sistema de división menos clásico de Fayod y ampliado por Singer que admite tres sistemas de tejidos fundamental, conectivo y conductor

El tejido fundamental está compuesto por hifas esqueléticas, envolventes, esferocitos de pared delgada o gruesa y por hifas infladas.

Para su observación se utiliza el reactivo Melzer que verifica la reacción amiloide o dextrinoide de las hifas cuticulares (por lo general son dextrinoides), con el azul de cresilo (para Crinipellis y Hemimycena).

El tejido conectivo formado por hifas de paredes delgadas y en el que abundan las hifas generativas principalmente.

El tejido conductor formado por hifas que transportan sustancias metabólicas que pueden ser secretadas o excretadas (ejemplo: hifas oleíferas, hifas laticíferas).

En las hifas generativas (encargadas de originar las células fértiles) para colorear las paredes utilizaremos el rojo congo, mientras que en las Poliporaceas utilizaremos el Gimsa Lento. que no afecta a las paredes pero que colorea el contenido de las hifas en violeta, en los casos que la reacción es positiva permite diferenciarlas de las hifas conectivas que quedan hialinas y las esqueléticas que se colorean de rosa.

Hifas especializadas

Smith(1966) divide las hifas especializadas en laticíferas cuando tienen látex y oleífera que no lo tienen látex.

Para Singer hay 5 tipos:

Hifas laticíferas: contienen latex, no son septadas y si lo son es raramente, son típicas en los generos Lactarius, Russula, Mycenas (secc. Lactipes) tienen un componente refrigerante y esto hace que en la observación al microscopio se distingan de las hifas **excretoras**.

Hifas Oleíferas son aquellas que no contiene látex pero tienen una materia resinosa que reaccionan con sulfovainillina o que no tienen ninguna reacción con la sulfovainillina(Russula).

Gleohifidios de la trama del himenoforo tienen reacciones iguales a los Gleocistidios.

Coscinoides estructuras pigmentadas de color café destinadas a la conducción (son hifas conductivas) con la superficie de la pared con muchos poros y con interior esponjoso.

Crisohifidios parecidas a las oleíferas o gleohifidios de la trama del himenoforo pero que contiene granulos o sustancias resinosa que se vuelven amarillas con soluciones alcalinas.

Tipo de pigmentación

Para la observación de la pigmentación se puede hacer sobre material fresco o seco

Pigmento citoplasmico

Se encuentra en el citoplasma, originando coloraciones uniformes

Pigmento vacuolar

Limitado al interior celular de las vacuolas, las cuales generalmente se agrupan hacia el centro

Pigmento intraparietal

Se sitúan en la cara interna de la membrana a modo de anillos, bandas concéntricas espirales o de forma irregular

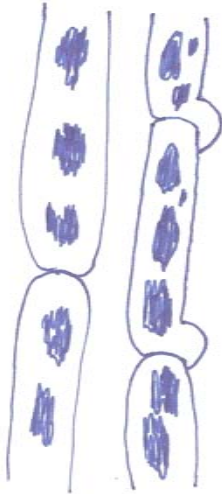
Pigmento intercelular

Situados alrededor de las hifas y entre las hifas de los cordones miceliares

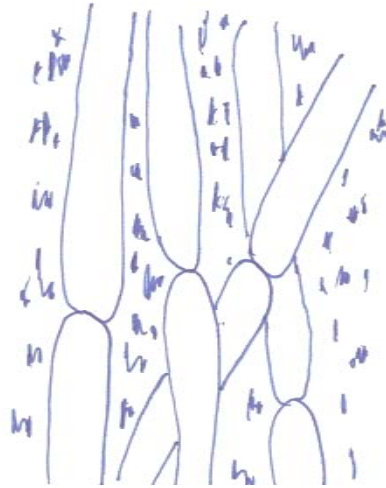
Necropigmento

Aparecen en las hifas del genero *Callistosporium* con la desecación a modo de oscuras inclustaciones

Intracelular
o vacular



Extraparietal
o intercelular



Parietal
o membranal



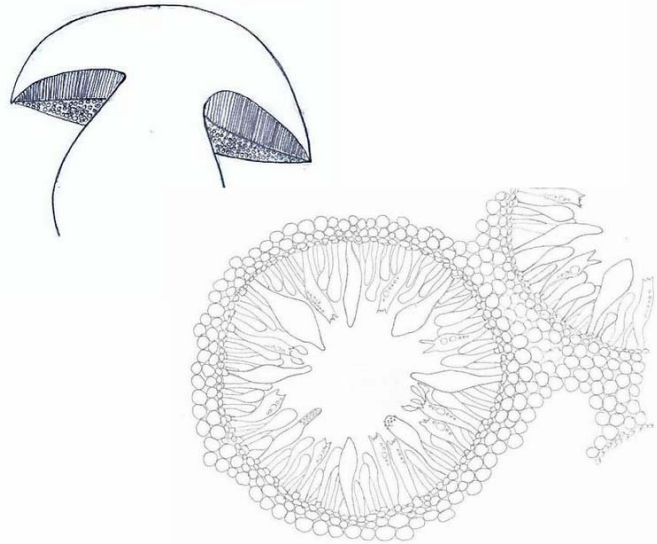
- Tubos
 - Basidios y basidiolos
 - Cistidios

Orden Boletales

Pocas son las diferencias microscópicas en el [Orden Boletales](#) y mucho menos entre los géneros que los componen.

El carácter más importante para diferenciar las especies es la pared esporal y para ello es necesario un microscopio de los llamados de alta gama, o los de barrido electrónico.

Aunque sean pocas las diferencias microscópicas, y la determinación de las especies este más bien basado en los caracteres macroscópicos y reactivos químicos, aquí también nos va a ser de utilidad el microscopio.



Si intentamos separar macroscópicamente *Xerocomus rubellus* de *Xerocomus ripariellus* nos va a resultar en la mayoría de los casos prácticamente imposible por el gran parecido existente entre ellos, por lo que no conseguiremos una determinación correcta sin observarlos con el microscopio, con el comprobaremos que *Xerocomus rubellus* tiene la pared esporal lisa, en cambio en *Xerocomus ripariellus* la pared esporal es finamente estriada longitudinalmente.

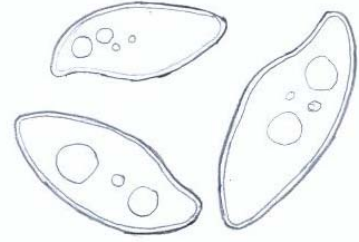
Otra especie que nos puede servir de ejemplo es *Xerocomus porosporus* un simple vistazo con el microscopio y comprobaremos que las esporas tienen el extremo apical truncado con poro germinativo, esto nos hará separarlo de las muchas especies próximas del género como *Xerocomus pruinosus*.



Caracteres microscópicos

Esporas:

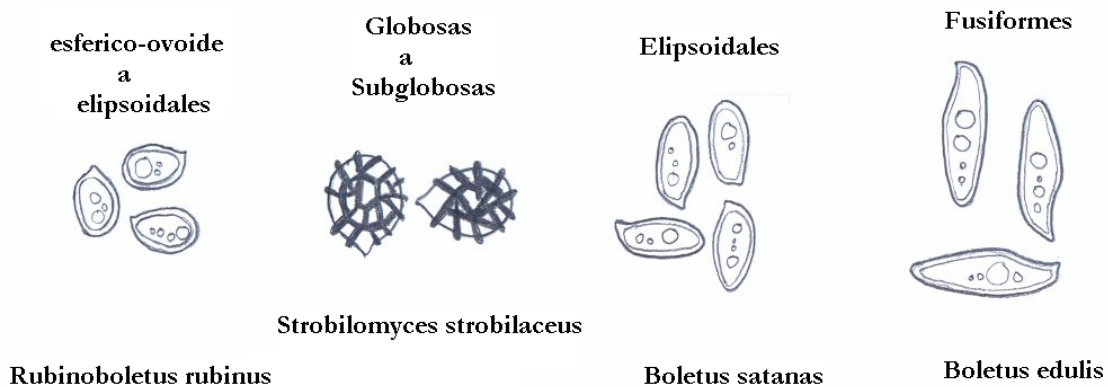
Por lo general suelen presentar una forma de elíptica alargada a fusiforme, con paredes gruesas y lisas, aunque existen casos como el de *Strombilomyces strobilaceus* que las tiene de globosas a subglobosas con la superficie crestada reticulada, en *Xerocomus pipariellus*, *X. pruinatus* y *X. cisalpinus* las esporas son rayadas.



Esferico-ovoide a elipsoidales en *Rubinoboletus rubinus*.
Globosas a subglobosas, reticuladas en *Strombilomyces strobilaceus*.
Elipsoidales como en algunos *Boletus* (*B. satanas*, *B. lupinus*, etc.).
Fusiformes a largamente elípticas como la mayoría de *Leccinum*.

El tamaño de las esporas en el orden Boletales oscila de las más pequeñas 5 a 8 micras de *Gyrodon lividus* hasta las 20-22 micras de algunos *Leccinum*.

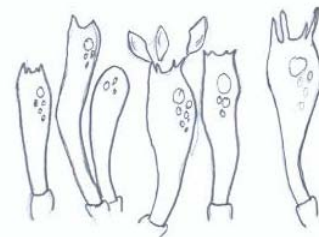
Debemos tener presente que las medidas esporales probablemente pueden variar sensiblemente en función de las condiciones ambientales y lugar de fructificación (Snell y Dick 1941).



Para medir las esporas es recomendable realizar esta medición a partir de esporada, de esta manera evitaremos medir esporas demasiado pequeñas o de tamaños aberrantes, se deben observar sobre KOH al 3% y en un tiempo no superior a 5 minutos ya que las esporas se pueden hinchar (Singer 1.965).

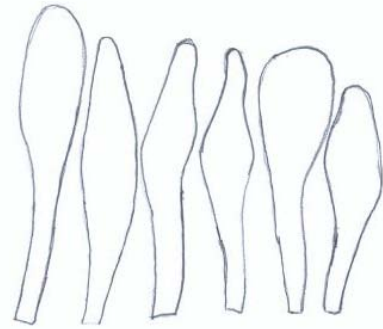
Basidios:

Se encuentran como los cistidios en la pared tubular del himenoforo y generalmente presentan cuatro esporas, aunque en casos excepcionales podemos encontrarlos con 1 o 2 esporas (*Boletus edulis*), son de forma claviformes a ligeramente cilíndricos, igual que los basidiolos. Con escasa importancia para la identificación de especies.



Cistidios:

Son las células estériles, que se encuentra en el himenoforo, son muy abundantes y se encuentran bien diferenciados de los basidios y basidiolos (distinguibiles porque son más grandes que estos). Son hialinos en la mayoría de las especies, no tiene incrustaciones salvo en *Chalciporus piperatus* que posee pequeños cristales en el ápice.



Los cistidios de los *Suillus* son inicialmente hialinos pero en la madurez toman un color marrón ocre (vistos con potasa al 3%) y están cubiertos de una gruesa capa que se fragmenta.

Tienen generalmente la pared delgada (aunque los cistidios de *B. calopus* tienen las paredes gruesas).

Son de forma muy variable como en los *Suillus* y algunas especies de *Xerocomus* en los cuales tienen forma cilíndrico claviforme y como en los *Boletus* y *Leccinum* en los cuales tienen forma fusiforme, ventricosa, lageniforme, mucronados o en tetina e incluso con el ápice muy alargado.

Hasta nos los encontraremos con forma piriforme como las especies de la Sección *Appendiculati*.

Según su posición si se encuentra en las paredes del tubo los llamaremos pleurocistidios y si están en el borde del tubo (poro) los llamaremos queilocistidios. En los *Boletus* prácticamente no se encuentran diferencias entre los pleuros y los queilos.

Trama del himenoforo

Existen dos tipos de tramas principales.

- ✓ Trama divergente o bilateral con el mediostrato poco marcado y con las hifas de la trama lateral incurvadas, típicas de los géneros *Leccinum*, *Boletus*, *Chalciporus*, *Porphyrellus*, *Buchwaldoboletus*, *Suillus* y *Tylophilus*.
- ✓ Trama paralela o regular (Tipo *Phylloporoide*) con el mediostrato bien marcado y con las hifas de la trama paralela o muy poco divergentes típicas en los géneros *Xerocomus* y *Phylloporus*.

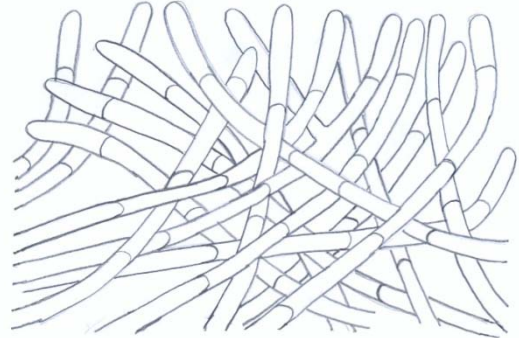
Mediostrato = (porción central de una trama en los boletales)

Pileipellis:

El medio de observación más recomendado es KOH al 3% con que podremos observar la ornamentación de las hifas si existe en ellas.

Es recomendable mirar la pileipellis de ejemplares jóvenes (Singer, 1965) y obtener la muestra de la parte central de píleo entre el disco y el margen (Ladurner et Simonini, 2003).

La cutícula suele presentar varias capas pero la que nos servirá para el estudio es la suprapellis que generalmente tiene hifas entremezcladas en tricodermis terminando en células cilíndricas alargadas, también aquí existen casos distintos como el de *Xerocomus depilatus* que presenta estructuras himenodermicas con células globosas o en *Xerocomus rubellus* con hifas con incrustaciones.



Existen dos tipos de estructuras pileicas.

Cutis hifas tumbada y paralelas a la superficie pileica, en muchos caso puede presentarse este tipo de estructuras en ejemplares adultos, han podido estar inicialmente erecta en los ejemplares jóvenes, suelen estar acompañadas de una película gelatinosa o viscosa denominándose ixocutis típica del género *Suillus*.

Tricodermis constituida por hifas paralelas a subparalelas incluso verticales, mucho o poco entrelazadas, también puede estar acompañado de una película gelatinosa o viscosa que denominaremos ixotrichodermis:

Estas estructuras están formadas por hifas de distinto tipo:

- ✓ Hifas filamentosas: hifas alargadas y poco septadas en general cilíndricas con artículos cuyo cociente entre longitud y anchuras es mayor de 4 micras, (ejemplos: *Leccinum scabrum*, *Boletus luteocupreus*).
- ✓ Cilindrocistos: hifas más cortas y cilíndricas cuya anchura es inferior a 4 micras (ejemplos: *Leccinum brunneo-griseolum*, *Leccinum variicolor*).
- ✓ Esferocitos: hifas muy cortas esféricas cuya anchura es inferior a 1,5 micras (ejemplos: *Leccinum carpini*, *Leccinum crocipodium*).
- ✓ Elementos himeniformes: hifas con aspecto himeniformes cilindráceos como en *Xerocomus depilatus*.

Las hifas de la pileipellis son delgadas en casi todas las especies de los género *Suillus* y *Boletus* y es más gruesa en casi todas las especies del género *Leccinum* (*Suillus variegatus* también tiene paredes gruesas). En las paredes se observaran si tienen incrustaciones o pigmentos, en los *Boletus* existen hifas fuertemente incrustadas y en muchos *Xerocomus* formando placas más o menos gruesas sobre todo del grupo *X. chrysentheron* y con incrustaciones finas en *Boletus* y *Suillus*.

Existen hifas con fíbulas (dato significativo que nos ayudara a separar géneros) en *Boletinus*, *Gyrodon* y *Gyroporus*.

Estipipellis:

A tener en cuenta en su estudio si es fértil o no y a matizar y no olvidar que es la parte alta del pie (la más cercana al himenio) la que se observa (algunas veces dicha parte llega hasta la mitad del pie).

En algunos *Boletus* y *Leccinum* la superficie del pie es fértil, el retículo no es otra cosa que la prolongación de los poros del himenio, se llama caulohimenio y está formada por caulobasidios, caulobasidiolos y caulocistidios (idénticos a los que encontramos en el himenio tubular). En otros esta superficie es estéril y esta diferenciación es considerada como un importante valor taxonómico (Sutara 1987 1989).

Existen tres tipos de estipipellis en función de la parte exterior.

- ✓ Estructuras con elementos himeniales (caulohimennio) formada por caulobasidios fértiles, caulobasidiolos y cistidios (géneros *Boletus* y *Leccinum*).
- ✓ Estructuras con elementos himeniales poco desarrollados y en general cilíndricos y claviformes (parte del género *Xeroconomus* y también en *Suillus*).
- ✓ Estructuras sin elementos himeniales, de hifas poco diferenciadas (género *Gyroporus*).

Caulocistidios:

En *Suillus* son claviformes, dispuestos en racimos, pigmentados de marrón a marrón oscuro y en muchos casos con incrustaciones.

Boletus flavosanguineus tiene la superficie del estipe estéril y esta formada por elementos típicamente piliformes.

Tomando como referencia los estudios de esterilidad de la superficie del pie, Sutara (1987 – 1991) separa *Boletinus* (superficie estéril) de *Suillus* (superficie fértil). Además divide las estructuras de la cutícula del pie en varios tramos, el caulohimenio, el caulosubhimenio el estrato lateral y la trama del estipe (datos que no utilizaremos pero que se deben de conocer).

Para determinar el género *Leccinum* se basa en el estudio de la estructura y disposición de superficie de la estipipellis así para los *Boletus* en general las hifas del caulosubhimenio están claramente entremezcladas y dispuestas en una capa gelatinosa y la trama del estipe es además claramente paralela.

Por contrario en el género *Leccinum* las hifas del caulosubhimenio están dispuestas de forma paralela al eje longitudinal del estipe, de este modo propone que *Boletus depilatus* y *Boletus fragans* se incluyan en el género *Leccinum*.

QUIMICA:

A observar con el reactivo de Melzer las hifas internas del pie. Ayuda a separar algunas especies próximas entre sí de *Boletus* ss.str. (*B. luridus* con hifas amiloides y *B. erythropus* con hifas sin reacción al reactivo).

Solo añadir que para la observación microscópica se usa principalmente: agua, amoniaco o KOH al 3% y Rojo Congo amoniacal.

Técnicas microscopias

- ✓ [Preparación de un herbario](#)
- ✓ [Técnicas de lavado de una preparación](#)
- ✓ [Rehidratar](#)
- ✓ [Aceite de Inmersión](#)

Preparación de un herbario

Ya que las setas se estropean como mucha rapidez, y muchas veces no tendremos tiempo para ver todas sus características microscópicas lo mejor será que vallamos construyendo nuestro propio herbario, donde guardaremos nuestros ejemplares.

De este modo tendremos nuestras excatas para comprobar los datos microscópicos que necesitemos en cualquier momento y así conseguir una correcta identificación.

Si realizamos el proceso correctamente nos servirá también para enviar nuestra excata en perfecto estado, a algún experto en el género para que nos ayude a su identificación.

Para ello simplemente debemos tener presentes unas pocas normas básicas.

Debemos anotar todos los datos posible sobre su aspecto macroscópico, medidas ya que con el secado perderá prácticamente todas estas características, anotaremos fecha hábitat y lugar de recogida e incluiremos en la medida de lo posible fotografía macroscópicas.

No será de mucha dificultad el secado, tendremos la precaución que los ejemplares no estén parasitados de gusanos que pueden estropearlos, intentaremos en este proceso que no se contamine con elementos de otra seta distinta, para abreviar el proceso si la seta es de un tamaño considerable podremos proceder a su laminado (la convertiremos en filetes finos).

Existen en el mercado hornos diseñados específicamente para el secado de hongos que nos facilitaran este proceso.

Comprobaremos la completa deshidratación de los ejemplares que vamos a guardar y debido a su fragilidad, nos aseguraremos de colocarlos en un lugar de ambiente seco, aislando cada especie de las demás y convenientemente protegidas de posibles golpes que puedan deteriorarlos y que dificultaría saber a que parte corresponde cada pedazo.

Técnicas de lavado de una preparación

Existen técnicas de lavado con las que mejoraremos el contraste de nuestra muestra para una mejor observación.

Una vez que tengamos la preparación realizada, inclinaremos el portaobjeto ligeramente y echaremos una gota de agua en la parte mas elevada del cubreobjeto dejando penetrar la gota de agua entre ambos para que arrastre el exceso de colorante o reactivo empleado.

Colocaremos un poco de papel higienico situado en la parte baja del cubre para que absorba el exceso que va saliendo y a la vez conseguir que no se desplace el cubreobjetos.

Podríamos lavar también la preparación después de añadir el colorante y antes de cubrir con el cubreobjetos, pero esta opción es menos recomendada ya que arrastraríamos el material a estudiar.

Aceite de Inmersión

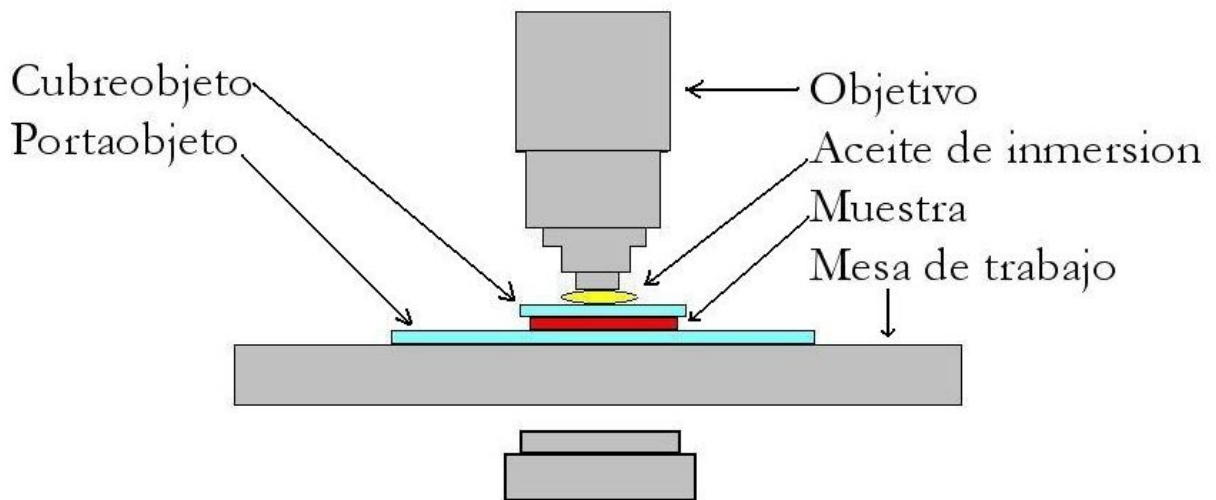
La inmersión es una técnica de microscopía óptica que permite aumentar el poder resolutivo de los objetos que vamos a mirar con el microscopio.

Los objetivos de mayor aumento (X100), tienen una distancia focal muy pequeña y además la primera lente del objetivo es de un diámetro muy pequeño.

Los rayos de luz que se dirigen hacia al objetivo después de atravesar el vidrio del cubreobjetos y el aire se separan mas de lo normal, produciendo una distorsión de los elementos,

Esto hace que solamente una parte de luz de la muestra llegue al objetivo, con el problema que con lleva para la visión

Para corregirlo, colocando entre el objetivo X100 o de inmersión y el cubreobjetos, una gota de aceite de inmersión, con ello los rayos emergentes ya no se dispersaran y continuaran su trayectoria, consiguiendo así que la mayor cantidad de luz llegue al objetivo y una mejor visión.



El objetivo de x100 o de inmersión solamente lo usaremos en los casos que realmente sean necesario, tales como aquellos que necesitamos ver alguna célula tan pequeña que el objetivo de X40 no lo permita o algún detalle como la ornamentación que tampoco podamos observar con el de x40

¿Para que vamos a gastar aceite y tiempo en limpiar el objetivo de x100X si lo necesitamos observa se ve perfectamente con el de objetivo de x40?

Debemos tener la precaución siempre que utilicemos el aceite de inmersión o de cedro de limpiar nuestro objetivo de los restos de aceite para evitar que estos restos se sequen, con lo que puede

conllevar mayor limpieza una posibilidad de deterioro o de nuestro objetivo de x100 que además es costoso

Si lo limpiamos una vez hayamos terminado con las observaciones no será mas que necesario con un paño para ópticas y como mucho lo humedecemos con agua esto debe ser suficiente para que el objetivo quede en perfecto estado, si con este método no conseguimos sacar la mancha es cuando debemos utilizar productos diseñados expresamente para este cometido

El xilol es uno de estos productos diseñados especialmente para el limpiado de lentes, así como toallitas húmedas que podremos encontrar en nuestra óptica. Este producto solamente lo utilizaremos si la mancha de aceite es tan persistente que no hemos sido capaz de sacarla con una simple bayeta humedecida

Actualmente existen en el mercado aceites sintéticos que no se endurecen y que no es necesario limpiar con tanta minucia después de cada observación.

No utilizaremos alcohol pues tiene un poder corrosivo, capaz de deshacer el cemento que sujetan las lentes de los objetivos

Rehidratar

Para rehidratar nuestra excicata cogemos el fragmento de la seta que necesitemos y lo pondremos en el medio que vamos a emplear para rehidratarlo

Para ello nos ayudaremos de un recipiente a modo de tapón pequeño o algún objeto similar.

Existen en el mercado unos portaobjetos que en su zona central tiene una depresión a modo de cuenco, ideal para la rehidratación.

Tendremos la precaución mientras dure el proceso de rehidratación que no se seque la muestra

Para que el fragmento sea manejable lo mantendremos en amoniaco de una concentración entre el 5% y el 10 % durante un tiempo mínimo de 5-10 mim. y un tiempo máximo de 20-25 mim. Tendremos presente que si usamos amoniaco con mayor concentración podremos agrandar en exceso las células a observar.

Si la rehidratación se realiza con KOH el tiempo viene a ser muy similar. Una vez rehidratado trataremos el fragmento como si fuese material fresco

También podremos rehidratar y colorearla a la vez empleando los colorante y reactivos diseñados para ello

ej. Rojo Congo amoniacal. Si el fragmento es muy pequeño (como el que vamos a colocar en el portaobjetos para observar) con uno o dos minutos seria suficiente

No debemos rehidratar con agua solamente porque después del proceso de rehidratación, las medidas y las formas no se mostraran correctamente.

Como precaución debemos tener presente que aunque nosotros usamos el amoniaco muy rebajado (5-10%). El amoniaco puro en contacto el hidrato de cloral (componente del Melzer) y



el yodo, produce reacciones de carácter explosiones, Ya se que es un poco exagerado pero mejor prevenir que curar.

Si necesitaramos comprobar la reacción amiloide despues de rehidratar un hongo con amoniaco, se debe de lavar con agua destilada, escurrir y luego manejar para poner el pequeño fragmento a utilizar sobre el portaobjeto.

Procedimiento amonio-acetico de Locquin.

Consiste en coger un pequeño trozo de lámina o una preparación de esporada y ponerla en un portaobjetos, añadir una o dos gotas de amoniaco y calentarla lentamente hasta la evaporación de dichas gotas, así un par de veces más. A continuación se añade una gota de acido acético y se observa al micro. Si la reacción es positiva, el exosporio (la pared externa de las esporas) debe de doblar su tamaño o más. Mientras que si es nula el exosporio queda inalterable.

Reacciones microquímicas básicas

- ✓ Amoniaco
- ✓ Azul de Cresilo
- ✓ KOH (potasa)
- ✓ Reactivo Melzer
- ✓ Rojo Congo

No debemos realizar ninguna preparación sin antes conocer con exactitud todos los elementos que vamos a emplear en ella y su incompatibilidad entre ambos, es recomendable comprarlos ya elaborados o acudir algún experto que nos realice la preparación.

Recordad que muchos de ellos son tóxicos además de peligrosos, pudiendo producirnos daños graves

Si después de estas advertencias decidimos utilizarlos, **pondremos especial atención en no dejarlos nunca al alcance de los pequeños de la casa**

Amoniaco

Líquido incoloro con olor irritante

El producto comercial es una solución acuosa bastante inestable de gas amónico (NH₃) que origina en solución de hidróxido amónico (NH₄OH) que tiene carácter químico básico, alcalino

Se encuentra en comercio en concentración 32-38% y para uso doméstico al 6%

Se utiliza en concentración baja para rehidratar material de herbario y para evidenciar el contenido de algunos tipos de cistidios llamado crisocistidios en los géneros *Hypophysaria* y *Stropharia*,

Con Rojo Congo combina muy bien por lo que al mismo tiempo rehidratamos, coloreamos las paredes de las células

Precauciones:

En bajas concentraciones no es un producto peligroso, no obstante al ser un producto caústico debemos manipular con precaución para evitar el contacto con la piel y los ojos, además de prestar atención a la inhalación de los vapores

Es en general un muy buen medio de montaje, pero es necesario saber que disuelve algunos elementos como las incrustaciones a prueba de ácidos de la cutícula en los *Russulas*, y que altera a veces el color de los pigmentos.

Conservación:

Se conserva por cerca de un año en tarro bien cerrado con un tapon que no permita la evaporación

Atención a los tapones de gomas o plásticos que no sean resistentes

Azul de Cresilo

La solución alcohólica es de un azul puro mientras que en la solución acuosa tiene reflejos violetas, como consecuencia de la disociación, el color azul de la sal y el color rojo de la base.

Es un reactivo con el que ciertas esporas y paredes de las hifas se vuelven de color rojizo o violeta rojizo al contacto con este reactivo, a esta reacción se le llama metacromática y es utilizada frecuentemente en la familia de los Agaricales.

Es muy utilizado en la Familia Lepiotaceae, los géneros Macrolepiota, Leucoagaricus, Leucocoprinus, Chlorophyllum y Sericeomyces tienen esporas con reacción metacromáticas, mientras que en los géneros Cystolepiota, Lepiota y Chamaemyces la reacción no es metacromática.

En el Género Russulas se utiliza con las hifas laticíferas.

El Género Crinipellis la cutícula es metacromática lo cual sirve para separarlos de los Marasmius que no tienen hifas cuticulares metacromáticas. También se emplea con Hemimycena.

Preparaciones:

Solución acuosa (la más usada):

Agua destilada: 100 ml

Azul de cresilo: 1 g

Sodium Dodécyl Sulfate: 0,5 g Este componente es optativo.

Solución alcohólica:

Alcohol etílico a 90°: 100 ml

Azul de cresilo: 2 g

Sodium Dodécyl Sulfate: 0,5 g

Agua destilada: 100 ml

Según Cléménçon (1972):

Etanol a 96°: 27 ml

Azul de cresilo: 0,5 g

Agua destilada: 55,5 ml.

Sodio Dodécyl Sulfato: 0,5 g

Glicerina pura: 17 ml Mezclarse detenidamente (agitador magnético durante 6 horas) y filtrar en caso necesario.

Precauciones:

Bajo su forma pura, es tóxico (irritante para los ojos, el sistema respiratorio y la piel).

Por inhalación del polvo: irritaciones leves.

Por contacto ocular: irritaciones leves.

En contacto con la piel: irritaciones leves.

Por ingestión de grandes cantidades: Nocivo para la salud.

Conservación:

Se conserva 1 a 2 años en frasco bien cerrado.

KOH (potasa)

Líquido limpio incoloro fluido

Se utiliza en concentraciones: 10%, 5% y 2%. Pero lo más habitual es al 5%. Tiene efectos similares al amoníaco concentrado, pero presenta la ventaja sobre este último de ser sensiblemente menos volátil y de ser inodora. Se puede pues, en vez de amoníaco concentrado, emplear potasa al 5%

Se usa para rehidratar el material de herbario, es bueno para tejidos leñosos y coráceo en concentraciones mayores se usa para evidenciar la ornamentación de esporas marrones (ej. Género Cortinarius) colorea en amarillo el contenido de ciertos cistidios llamados crisocistidios y el contenido de algunos elementos como la parafisis de algunas especies de género Mollisia y las incrustaciones de algunas hifas. Las hifas de pileipelli de algunos Cystodermas se vuelven de color rojo-marrón

En concentraciones del 30-40% se utiliza para ver reacciones macroquímicas

Preparación

Potasio sólido
Agua destilada

En cantidades variables según la concentración que deseemos. Solución al 5%
95 ml. Agua destilada 5 gr. de potasio

Precauciones

Producto peligroso caustico que debe manipularse con cuidado

Debe conservarse en frasco muy hermético pues reacciona con el anhídrido carbónico del aire y se empobrece como base fuerte. Evitaremos el contacto con la piel y las mucosas

Consejación

Duración aproximada de un año, algo más si lo conservamos bien apartado de la luz y el calor

Reactivo Melzer

El Reactivo Melzer es uno de los más empleados en la microscopía de hongos, con el que podremos observar las reacciones amiloides y dextrinoides de muchas esporas y células microscópicas.

Lo utilizaremos tanto en Basidiomycetes como en Ascomycetes

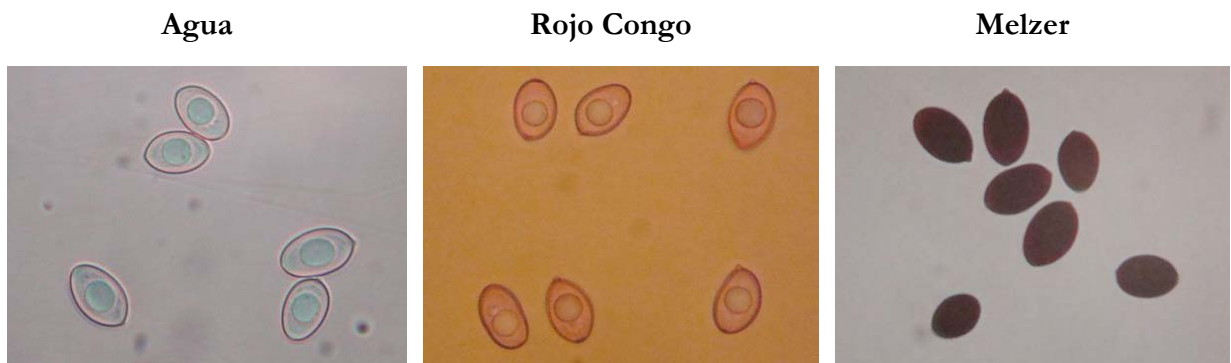
Nos permitirá saber si las esporas, de *Amanita*, *Melanoleuca* y *Mycena*, así como en numerosos *Aphyllophorales*, son amiloides o no.

En las *Lepiotas*, *Hebelomas* nos permitirá ver si son dextrinoïdes o no.

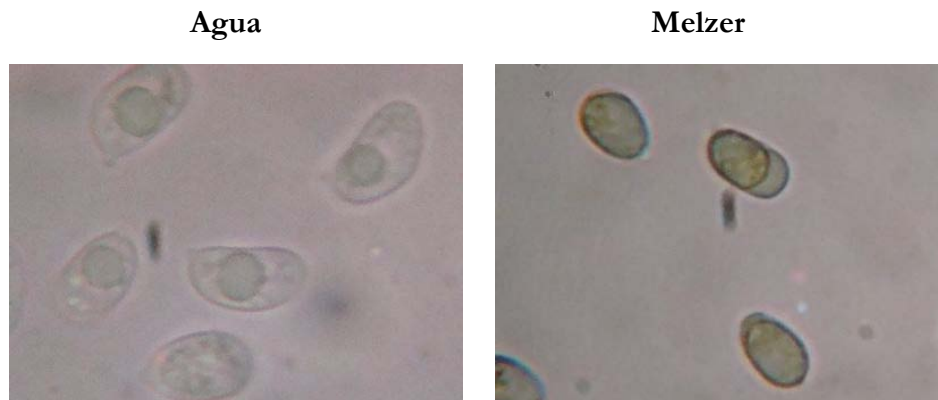
Además nos permitirá ver la ornamentación de las esporas en *Lactarius* y *Russula* así como algunos *Cystoderma* (en particular, *carcharias* y *amianthinum*...) y *Galerina*.

En los *Ascomycetes* nos permitirá ver si la terminación de las ascas, si son amiloides o no

Esporas de *Macrolepiota* sp con reacción dextrinoides positiva.



Esporas de *Leucoinocybe lenta* con reacción amiloide positiva



Preparación:

Solución madre

Poner 1 gr. de Yodo y 3 gr. de Yoduro potásico juntos.

Añadir 30 ml. de agua destilada y remover hasta que se disuelva.

Poner en un vaso graduado y añadir agua destilada hasta la medida de 40 ml y agitar.

Haciendo el reactivo:

Tomar 5 ml. de solución madre y añadir 5 gr. de hidrato de cloral cristalizado.

Agitar y ya está preparada para su uso.

Reacciones:

Reaccion amiloide

Esta reacción nos indica que el hongo contiene almidón, si la reacción es positiva las células cambiarán de color de gris azulado a azul negruzco.

Reaccion dextrinoide

En este caso la coloración será de marrón a rojizo a rojo oscuro y revela habitualmente las dextrinas.

Reaccion nula

Ocurre cuando no se produce ninguna reacción y las células se tiñen del color del reactivo que es de un color marrón amarillento.

Precauciones:

El reactivo de Melzer es bastante peligroso, el hidrato de cloral es tóxico e irritante y el yodo es nocivo, por lo tanto debemos evitar todo contacto con la piel y con los ojos, además de evitar respirar sus vapores.

Por otra parte, conviene saber que el yodo, al contacto con el amoníaco, causa reacciones de carácter explosivo.

Conservacion:

Debido que es bastante corrosivo debemos guardarlo en un bote de cristal hermético, no guardar en plástico ya que el yodo es volátil y capaz de salirse de algunos frascos de plástico. Es preferible guardar el frasco en la oscuridad ya que la luz podría alterar el hidrato de cloral. En condiciones normales de utilización, puede conservarse durante 1 a 2 años.

Una forma simple de comprobar que esta en buen estado es añadir unas gotas a una hoja de papel blanco y ver como cambia de color al negruzco azulado, si la mancha permanece del color del reactivo marrón claro habrá perdido sus propiedades.

Rojo Congo

Polvo de color rojo-pardo, inodoro con pH X6,7 y una solubilidad: 25 g/l en agua a 20°C

Es uno de los colorantes mas empleado en microscopia y esta especialmente recomendado para microfotografía obteniendo unos resultados de alta calidad.

Como característica principal tiene la capacidad de colorear la pared de la mayoría de hifas dejando el citoplasma completamente incoloro consiguiendo un gran contraste en nuestras preparaciones.

Con el lavado de la preparación con amoniaco diluido, conseguiremos que el fondo se aclare, dejando coloreadas las paredes de la hifas y consiguiendo un mayor contraste en nuestra preparación. Permite también colorear el endosporo de algunas esporas (en particular, en Volvaria y Pluteus).



Preparaciones:

Rojo Congo con agua

Rojo Congo: 1 g
Agua destilada 100 ml

Esta solución es la más estable y el poder colorante no disminuye al ser diluido en agua destilada, a la vez que será la preparación que entrañe menor riesgo en su manipulación.

Rojo Congo con amoniaco

Rojo Congo : 1 g
Amoniaco (solution commercial concentrada)100 ml

Con esta preparación podremos ala vez rehidratar y colorear nuestras muestras

Rojo Congo SDS

Rojo Congo: 1 g
Agua destilada: 100 ml
Sodio Dodécyl Sulfato: 1 g

El sds es un detergente que ayuda a disminuir la presencia de burbujas de aire y mejora la visión de la preparación. De las tres preparaciones es la más recomendada para microfotografía , con ella conseguiremos el meyor contraste en las preparaciones.

Precauciones:

Puede resultar cancerígeno.

Posible riesgo durante el embarazo de efectos adversos para el feto.

Si lo utilizamos con SDS (en el estado puro) es toxico en contacto con la piel y por ingestión llegando a mortal en elevadas dosis 1,29 g/kg de peso humano del producto puro, en preparación a escasas dosis, es solamente irritante en contacto con la piel y los ojos, en este caso con labar con abundante agua será suficiente.

El rojo congo no combina bien con ácido láctico, se vuelve azul negro al instante.

Conservacion:

Una vez que tengamos la preparación realizada si la mantenemos en recipientes bien cerrados, ambiente seco y temperatura ambiente es eficaz de uno a dos años (incluso más tiempo).

Si se nos enturbiara la preparación, podríamos colarla con un papel o servilleta de cocina para eliminar impurezas, y seguir utilizándola

Material a utilizar

El material necesario para una buena práctica se compone

1. Rollo de papel higiénico
2. Bote cuentagotas con agua destilada (si queremos que los elementos de la preparación estén mas quietos y que la preparación nos dure mas tiempo sin que aparezcan gotas de aire y podemos añadir unas gotitas de glicerina al agua)
3. Portaobjetos y cubreobjetos.
4. Cuchillas de afeitar para realizar los cortes.
5. Pinzas y una aguja o lanceta.
6. Aceite de inmersión para cuando usemos el objetivo de 100 aumentos.
7. Lupa o cuentahílos para realizar los cortes más finos



Colorantes y reactivos

Utilizaremos solamente en los casos que sean imprescindibles, debemos tener presente que además de peligrosos (atención con los pequeños de la casa).

En un principio para este curso usaremos Amoniaco, KOH (potasa)Rojo Congo, Azul de algodón (al lactofenol), Azul de Cresilo y Merzel

Técnica de elaboración de preparaciones

- ✓ Realización de una esporada
- ✓ Preparación de la Arista para su observación
- ✓ Corte transversal de la lámina para su observación
- ✓ Corte de la cuticula y del pie para su observación

Sobre un portaobjeto colocaremos un trozo de lamina y procederemos hacerle un corte paralelo lo mas fino posible, siempre inferior a un milímetro, si fuese necesario nos ayudaríamos de una lupa.

Sobre el trozo echaremos una gota de (colorante, reactivo o agua)

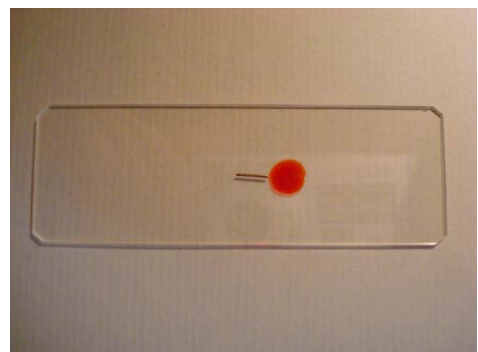
Colocaremos encima el cubreobjetos de forma inclinada para evitar la formación de burbujas de aire

Presionaremos ligeramente sobre el y absorberemos el liquido restante que expulse al presionar con un trozo de papel higiénico

Colocaremos en la mesa de trabajo y enfocaremos la preparación con los oculares de menor aumento 4X o 10X

Una vez enfocada y centrada la preparación pasaremos al objetivo de 40X para observar con mayor detalle

Por ultimo echaremos una gota de aceite de inmersión sobre el cubreobjetos para poder usar el objetivo de mayor aumento 100X u objetivo de inmersión



Realización de una esporada

Para la realización de la esporada, simplemente colocaremos en un lugar sin corrientes de aire o cubriremos con un vaso, un portaobjeto donde colocaremos el sombrero de un hongo fresco con las láminas hacia abajo y esperaremos de cuatro a cinco horas (aproximadamente).

Una vez transcurrido el tiempo procederemos a retirar el sombrero.

Lo primero que debemos observar es el color de la esporada, apuntaremos este dato ya que nos será de mucha utilidad como dato de macroscopia.



A la esporada añadiremos una gota de agua destilada o agua glicerinada con la que conseguiremos que se nos muevan menos las esporas, incluso nos durara mas la preparación sin que aparezcan las molestas burbujas de aire, colocaremos el cubreobjetos de forma inclinada para evitar la aparición de burbujas de aire, daremos unos ligeros golpecitos con la pinza sobre el cubreobjetos y procederemos a colocarlo sobre la mesa de observación (platina) del microscopio para su

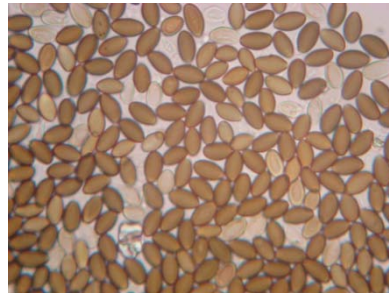
observación.

Recordar que siempre debemos empezar por el objetivo de menor aumento y cuando terminemos la observación volveremos a colocarlo en este punto

10X



40X



100X



Preparación de la Arista para su observación

Aunque al principio nos parezca un poco complicado y solo veamos una masa donde no sabemos distinguir unas células de otras, con la practica iremos realizando cada vez mejores cortes que no permitirá distinguir cada uno de los elementos que aparezcan en la arista.

Con la práctica llegaremos a realizar preparaciones tan buenas que ayudaran a suplir en algo lo modesto que pueda ser nuestro equipo

Es recomendable que para estas primeras prácticas, empecéis, a ser posible con ejemplares frescos y sobre todo con aquellos que no presenten unos cistidios de forma claviforme parecido a los basidios, con ello evitaremos confundirlos con basidiolos (Ejem. Pluteus)



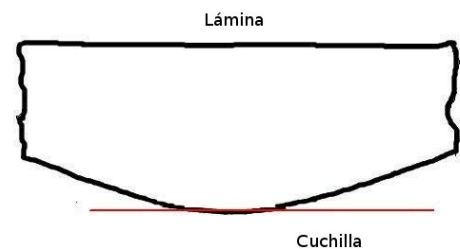
Siempre nos resultara de gran ayuda disponer de los datos bibliográficos que nos orientaran a especies que reúnan estas condiciones, además sabremos lo que vamos a ver al mirar por el microscopio.

Si vamos a emplear material seco, deberemos comprobar que la arista esta completa y no se haya roto en el secado o al manipularla, con lo que no estaríamos observando la arista si no la cara de la lámina, para comprobar que esta intacta podemos ayudarnos con el microscopio observándola con el ocular de menos aumento.

Practica

Este será el corte más sencillo que tendremos que realizar. Comenzaremos desprendiendo una lámina del sombrero y la colocaremos sobre el portaobjetos, cortamos los dos extremos y los desechamos.

Del trozo central nos quedamos con la arista de la lámina. Realizaremos el corte mas fino que podamos lograr, si fuese necesario nos ayudaríamos de una lupa o cuenta hilos.



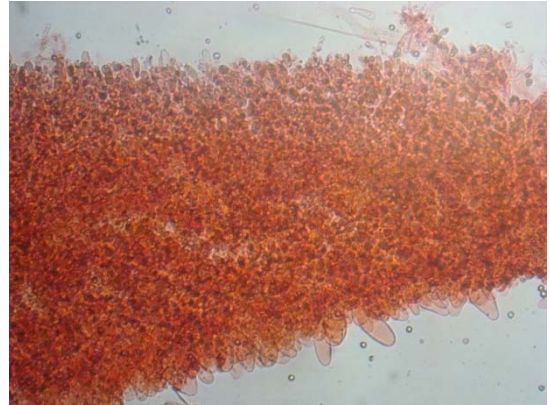
Evitaremos en la medida de lo posible mover el trozo de arista que hemos cortado, debemos tener presente que son células tan pequeñas que a la menor manipulación se pueden desprender, romperse, superponerse unas sobre otras, con lo que conllevaría la dificultad de localizarlas en nuestra preparación.

Si el trozo es de material fresco, al ser tan pequeño evitaremos que se nos seque añadiendo rápidamente una gota de agua destilada (mejor glicerinada o el colorante que deseemos emplear) con ello ayudaremos a que cada elemento se mantenga en su sitio

Colocaremos el cubreobjetos de forma inclinada para evitar burbujas de aire y con la parte roma de un lápiz presionaremos ligeramente, el agua o colorante sobrante lo recogeremos colocando un trozo de papel higiénico doblado y sobre el borde del cubreobjetos, con esto evitaremos a la vez que se nos mueva

Va a depender de la presión que realicemos, la dispersión de las células que tenemos que observar. Por lo que es recomendable que hagáis varias preparaciones y comencéis dando una presión muy ligera para ver la formación de la arista y evitar que los cistidios se separen demasiado de ella. El objetivo en un principio es mantener las células lo mas juntas posibles, para identificar perfectamente a que zona corresponde

En las siguientes preparaciones tendremos que realizar una mayor presión para observar al completo los queilocistidios, prestando atención a la base para comprobar si en ella existen fíbulas en la unión con las hifas



Corte transversal de la lámina para su observación

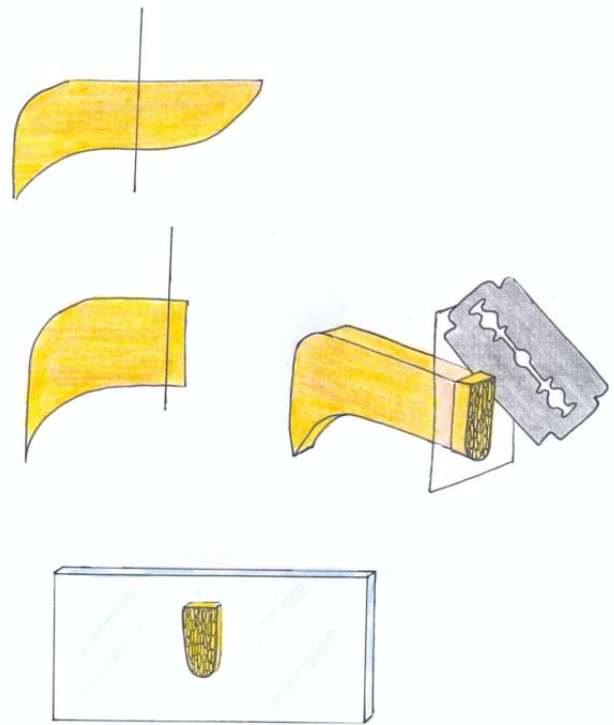
Este corte resulta un poco más complicado

Se necesita un corte de la sección transversal de la lámina para poder observar la parte interior de la lámina.

Es recomendable que comencéis con material fresco que tenga láminas que sean anchas (ejem. Pluteus).

El corte es más que recomendable que sea lo más fino posible, añadiremos el colorante, colocaremos el cubreobjetos y presionaremos muy ligeramente para poder observarla.

A la dificultad del corte debemos añadir la colocación del fragmento para la debida observación. No nos servirá si queda en la posición en la que vemos la cara de la lámina.



Si el corte que observamos en el dibujo de arriba nos resulta complicado, podemos realizarlo también tomando no menos de dos, tres láminas acompañadas con carne e incluso cutícula de la seta, de esta manera conseguiremos colocar la muestra de la forma adecuada para su observación.

Recordar que el corte que realicemos deben ser lo mas fino posible.



Corte de la cutícula y del pie para su observación

Peliepellis

Para la correcta observación de la peliepellis, debemos tener presente

- Numero de capas y espesor de cada una
- Disposición de las hifas en el mismo
- Forma y dimensiones de sus elementos (hifas, pileocistidios, hifas primordiales, pelos, ect.)
- Presencia o no de gelificaciones

Cuando observemos géneros que tengan cierto tipo de velo universal persistente (Amanita) debemos tener precaución no confundir estos elementos con las capas de la peliepellis

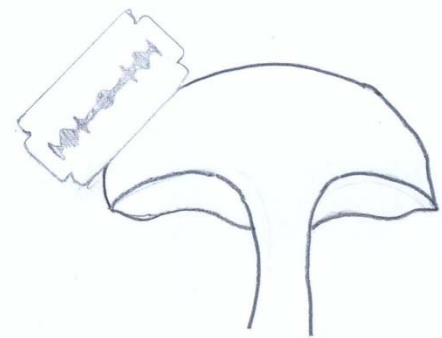
Si la cutícula es separable, retiraremos un trozo de ella, lo colocaremos sobre el portaobjetos y juntado dos cuchillas realizaremos un corte, retiraremos el trozo que nos ha quedado entre las dos cuchillas y esta parte es la que nos servirá para la preparación.

Lo colocaremos en el centro del portaobjetos y añadiremos una gota de agua destilada, colocaremos el cubreobjetos de forma inclinada y golpearemos ligeramente sobre la

preparación con la pinza

Si la cutícula no es separable procederemos a dar un corte paralelo sobre ella lo mas fino posible, procurando coger la mínima cantidad de trama o carne, de este modo nos quedara una especie de casquete al que le haremos un corte transversal para ver la disposición de las hifas

La primera preparación debemos observarla con agua, ya que es de suma importancia además de la estructura de las hifas, la tipología de los pigmentos y la ornamentación ya que son frecuentemente soluble a los alcalinos y a los ácidos

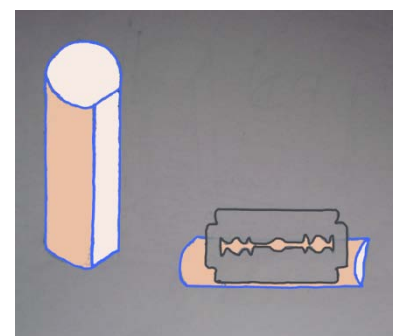


Caulopellis

Este corte es más sencillo de realizar, consiste en hacer un corte vertical del pie

Casi siempre que se mira el pie para su estudio microscópico se debe de contrastar observaciones de la parte más cercana al ápice, de la zona media y de la zona basal

Aunque hay géneros en los que es obligatorio como en el caso de los Inocybes



El estudio del pie para identificación de especies es relativamente moderno y hay poca bibliografía que haga referencia a dichos datos

Corte de los tubos para su observación

Podremos realizar dos tipos de cortes para la observación de los elementos que contiene los tubos, uno longitudinal o paralelo al tubo y otro transversal o paralelo a los poros

El corte que mas nos interesa es el transversal ya que como hemos visto los elementos que nos interesan ver suelen encontrarse en la parte interna del tubo y a la hora de colocarlos sobre el portaobjetos nos resultara más fácil.

Si realizamos el corte paralelo a los tubos debemos tener la precaución que al colocar la muestra nos quede en la posición correcta para que las hifas de la trama no se superpongan y nos tape los elementos que queremos ver.



El corte transversal también no permitirá ver la trama de los tubos.

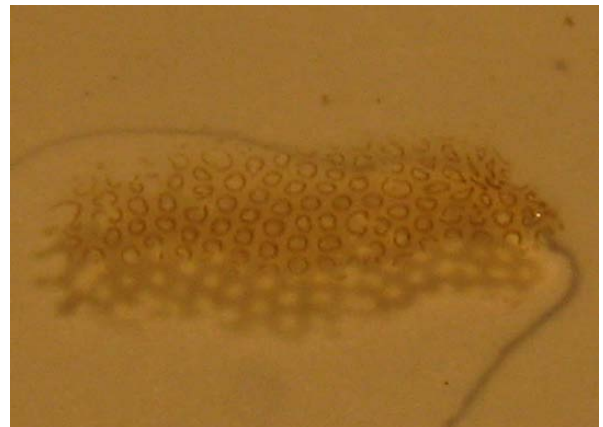
Si obtenemos la muestra de exicatas realizaremos el corte transversal en seco, intentando hacerlo lo mas fino posible, para ello utilizaremos una cuchilla nueva o bien afilada Colocaremos la muestra sobre el cubre objetos y rehidrataremos.

Cuando son tubos tan pequeños y estar secos nos resultara mucho más cómodo hacerlo en este orden, ya que si rehidratamos antes pueden convertirse en una masa de la que nos resultara complicado obtener la zona concreta que queremos observar.



En este punto cada autor tiene su propia técnica.

Para el resto del hongo tanto cutícula como pie realizaremos el corte como hemos venido realizando con los hongos de láminas.



Ejercicios

Ejercicio 1

Realizar una esporada

Describir las esporas y el color de la esporada.

Fotografiarlas (o bien pintarlas) y medirlas (si se dispone de los medios)

Probar la reacción microquímica Melzer (en este caso es mejor realizarla en esporas claras, la observación de la amiloididad o dextrinoididad en esporas oscuras es poco visible, para ello es mejor un leucosporo (Hongos con esporas de color blanco en masa).

Para esta primera práctica utilizar cualquier hongo que podáis encontrar, a ser posible que no tenga las esporas demasiado pequeñas y que la esporada sea oscura (Ejemplo *Stropharia semiglobata*) siempre os resultara mas fácil encontrar las espore a la hora de enfocar.

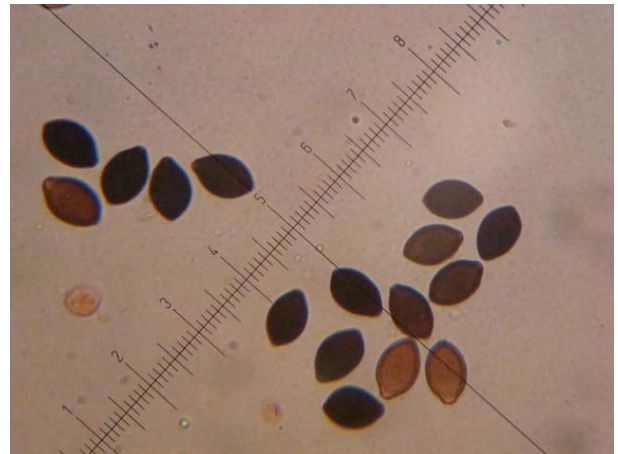
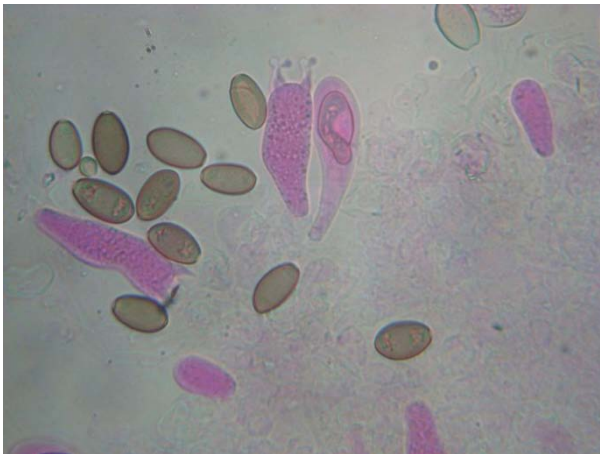
Luego nos servirá a todos para intentar acercarnos al género.

Si no conseguimos un hongo fresco con el que realizar la esporada siempre podréis recurrir a los cultivados que encontramos en el supermercado, como el *Agaricus bisporus*



Stropharia semiglobata

Panaeolus subfirmus



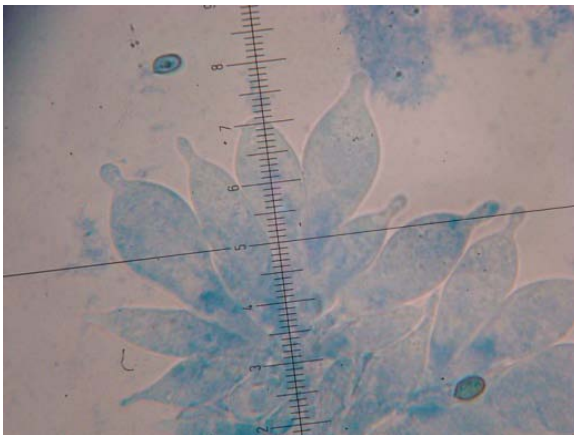
Ejercicio II

- Hacer un corte fino de la arista y visualizar la muestra.
- Describir lo que veis e intentar identificar cada elemento. Adjuntar foto de la arista.
- Comentar si es fértil o estéril y si es homogénea o heterogénea.
- Medir las esporas, basidios (maduros; con esterigmas, o que se empiecen a ver) y cistidios. Describir la forma que tienen; si las esporas son verrugosas, si los basidios son bispóricos, si los cistidios tienen incrustaciones, si en la base de basidios y cistidios veis fíbulas, etc... Y mostrar los valores. Adjuntar fotos en las que se vean bien cada elemento. Es decir; foto de las esporas y descripción. Foto del basidio/s y descripción. Foto del cistidio/s y descripción. A no ser que se vea bien todo en una foto.
- Ni que decir que para poder medir los basidios y cistidios, tenemos que verlos enteros, o bien el elemento desprendido.
- Adjuntar foto macro e intentar identificar el género y si se puede la especie.

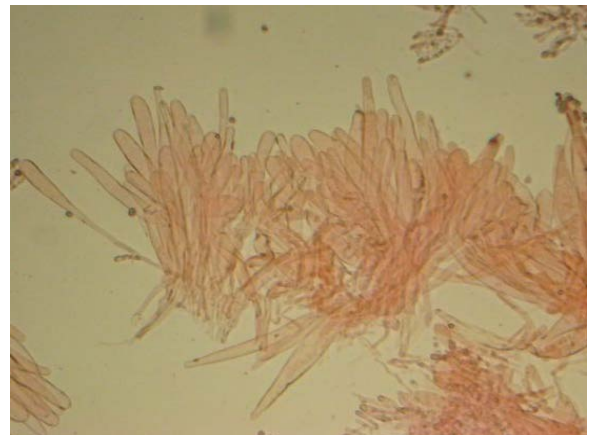
No os cortéis

Os dejo aquí una muestra de varias aristas de diferentes setas para que os sirvan de orientación

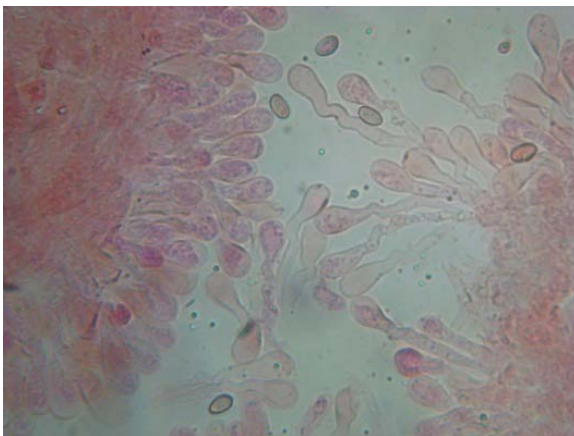
Volvariella bombinata



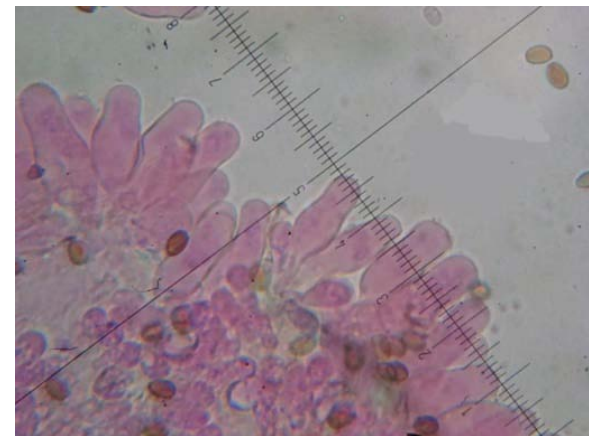
Tricholomopsis rutilans



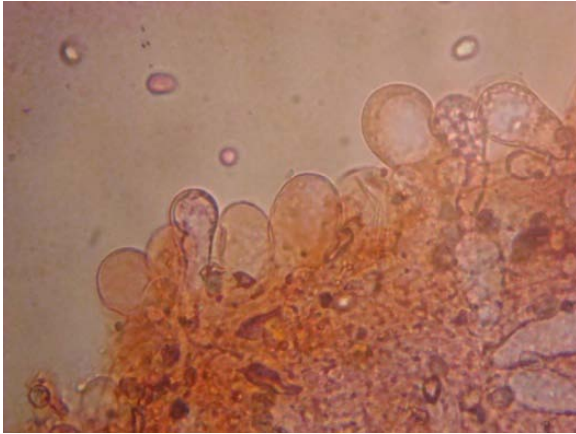
Stropharia aeruginosa



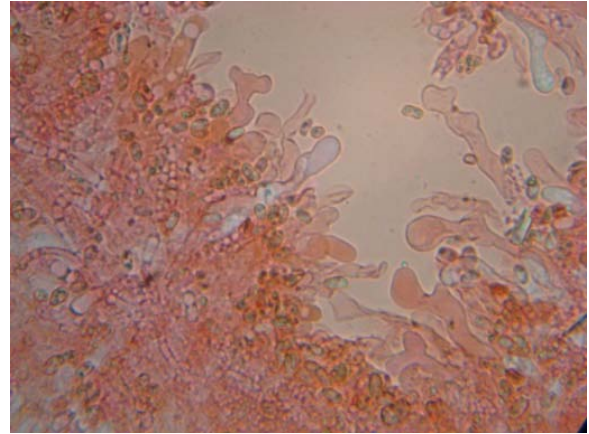
Psathyrella candolleana



Pluteus cervinus



Crepidotus variabilis



Ejercicio III

No es que sea un dato muy relevante (al menos en el nivel que se supone es para este curso), pero si es necesario que conozcamos como esta formada interiormente de una lamina. Macroscópicamente no es complicado separar los géneros para el aficionado experimentado pero la visualización de la trama también puede ayudarnos a separar algunos géneros de otros si tenemos alguna duda, Amanitaceae (trama bilateral), familia Pluteaceae (trama inversa bilateral) etc.

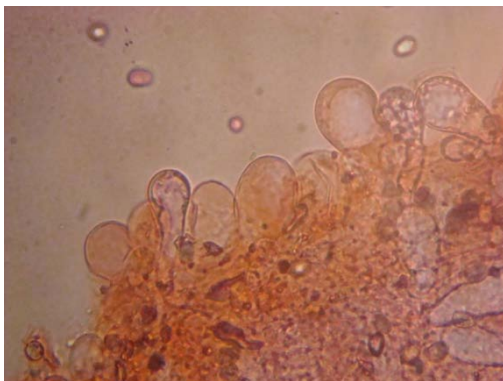
Aunque no es fácil vamos a intentar realizar un corte transversal de la lámina, fotografiarlo y describirlo, como tan solo tengo fotografías de las hifas de la trama y no tengo ninguna de la trama al completo, este ejercicio me toca realizarlo con vosotros.

Para los que no logren realizar el corte y ver la trama con claridad, intentar al menos mostrarnos las hifas que la forman. Para la trama usar pocos aumentos a la hora de fotografiarla pues debe de aparecer una buena parte de ella.

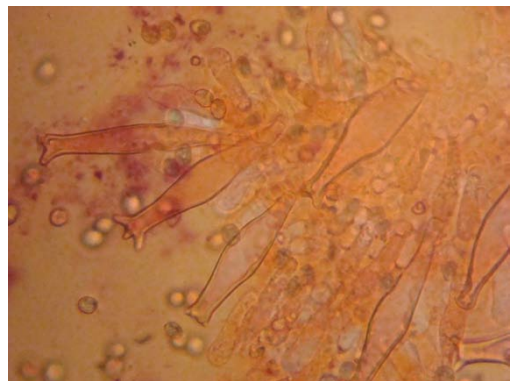
Localizar y fotografiar los pleurocistidios que encontréis en la lámina, como nos va ser imposible separarlos de los queilocistios por una simple fotografía cuando tienen la misma morfología, describir las diferencias que observáis entre ambos. Si es posible intentarlo con especies que tenga distintos los queilocistidios de los pleurocistidios. No os olvidéis de las medidas.

Pluteus cervinus

Queilocistidios

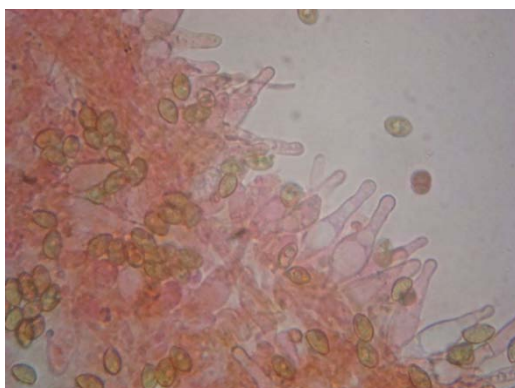


Pleurocistidios



Galerina marginata

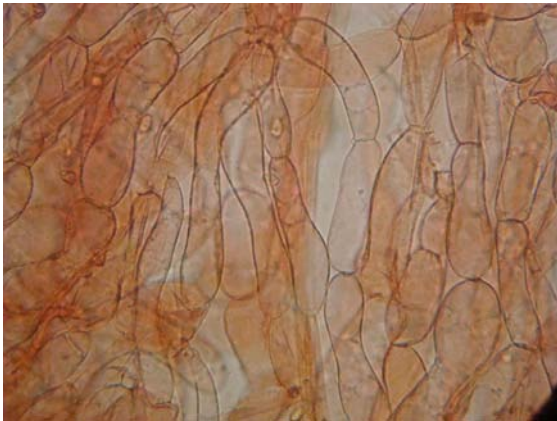
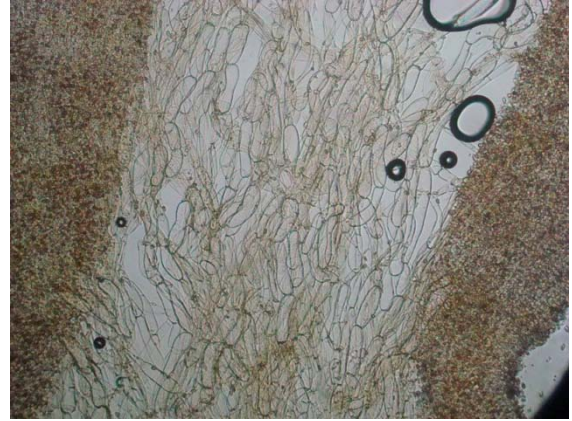
Queilocistidios



Pleurocistidios



Tubaria furfurácea (Trama laminar)



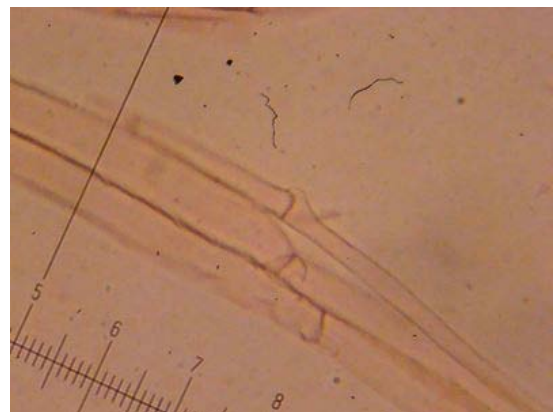
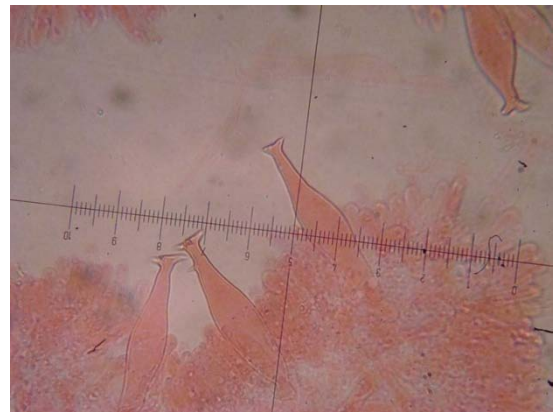
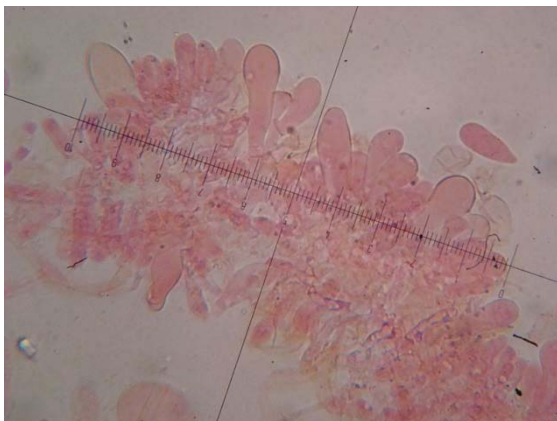
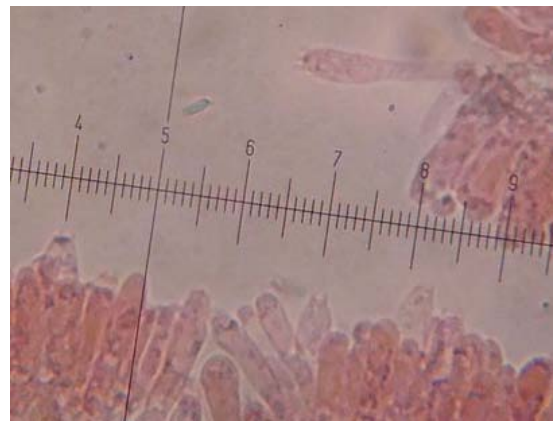
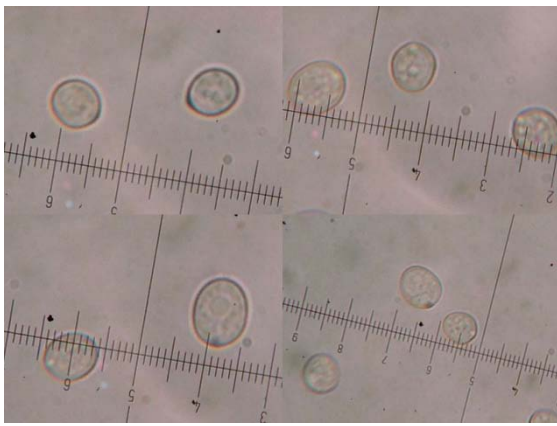
Ejercicio IV

Con este ejercicio terminamos la teoría y práctica de los basidiomycetes con láminas, debemos saber realizar un estudio completo de este tipo de hongos, los resultados nos los ira dando la practica de estos ejercicios

Para que este estudio sea completo debemos incluir:

Esporada, Basidios y basidiolos, Queilocistidios, Pleurocistidios, Pileipellis ,Estipitipellis

Pluteus petasatus

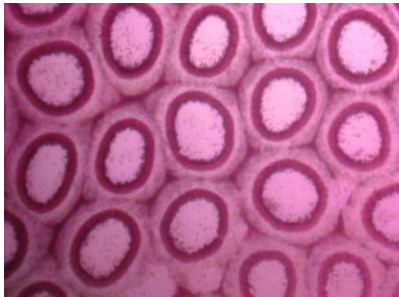


Ejercicio V

En este ejercicio realizaremos las mismas preparaciones que hemos realizado en los hongos con láminas, tanto con la cutícula como con el pie, si los ejemplares presentan retículo en el pie, tener presente que este retículo no son otra cosa que restos de los poros (el final de los tubos del himenio) por lo que debéis encontrar, además de sus células habituales, los elementos fértiles del himenio

Boletus edulis

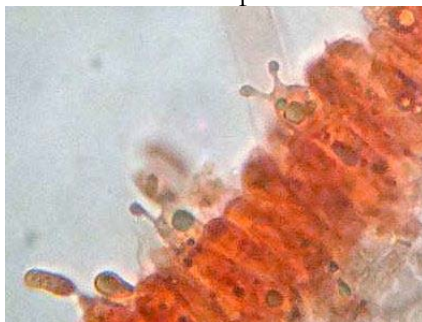
Vista interior de los tubos



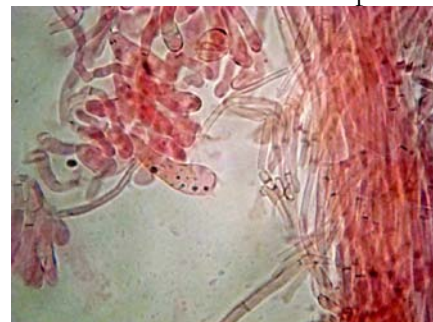
Basidios bispóricos



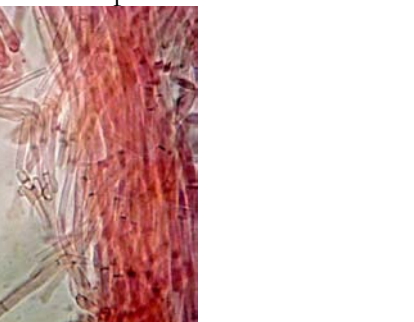
Basidios en el retículo del pie



Pleurocistidios
en los tubos



Trama de la cutícula
en trichodermis



Caulocistidios



Bibliografía

- Setas y Hongos de la Rioja II (Agustín Caballero Moreno)
- Curso básico de Microscopia y Micología (Armando Guerra)
- Guía de los Boletus de España y Portugal (Augusto Calzada Dominguez)
- Curso de Micología (Daniel Palacios)
- How to identify mushrooms to genus III: Microscopic Features de David Largent, David Johnson y Roy Watling
- Hongos de España y Europa (Ewald Gerhardt, Jordi Vila y Xavier Llimona)
- BOLETUS s.l. José Antonio Muñoz - Fungi Europaei
- Manuale di Microscopia dei Funghi (Maria Teresa Basso)

Internet

<http://www.champignons-passion.be/>