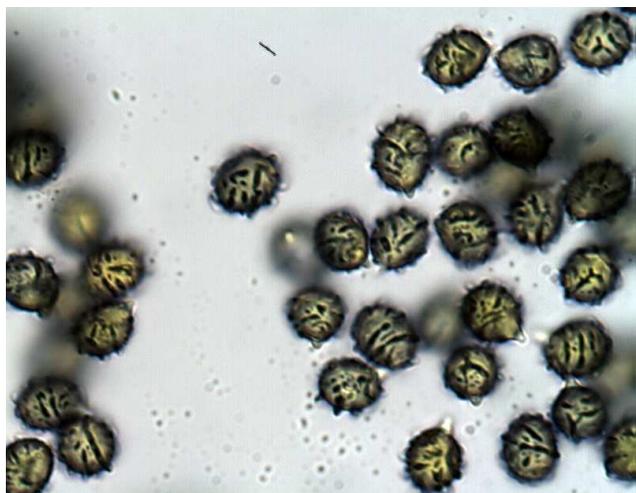


Réactif de Melzer

1. NATURE DU RÉACTIF :



Spores de *Lactarius pyrogalus* observées dans le Melzer (photo Marcel Lecomte)

Le réactif de Melzer est un liquide épais composé d'iode, d'iodure de potassium, d'hydrate de chloral et d'eau. Le constituant le plus important de ce réactif est l'iode, qui a la propriété de se fixer sur certains glucides notamment. L'iode (I₂) est un solide d'aspect métallique, volatil et à l'odeur particulière. Il est peu soluble dans l'eau, mais l'est plus dans les solutions d'iodure de potassium ; c'est pourquoi le réactif de Melzer en contient. L'iodure de potassium est un solide blanchâtre, soluble dans l'eau. L'hydrate de chloral, de son vrai nom 2,2,2-trichloro-1,1-éthanediol est une molécule d'éthane (C₂H₆) sur laquelle les trois hydrogènes d'un des deux atomes de carbone ont été remplacés par des chlores et deux des hydrogènes de l'autre carbone par des fonctions alcool (-OH). Sa formule est donc CCl₃-CH(OH)₂. C'est un solide blanc, très soluble dans l'eau et à l'odeur forte, caractéristique.

2. PRÉPARATION :

Réactif de Melzer :

Eau bidistillée :	100 ml
Iodure de potassium :	7,5 g
Iode :	2,5 g
Hydrate de chloral :	100 g

Réactif iododuré acétique de Kühner (ou acide acétique iodé) :

Eau bidistillée :	100 ml
Acide acétique glacial :	10 ml
Iodure de potassium :	5 g
Iode :	1,5 g

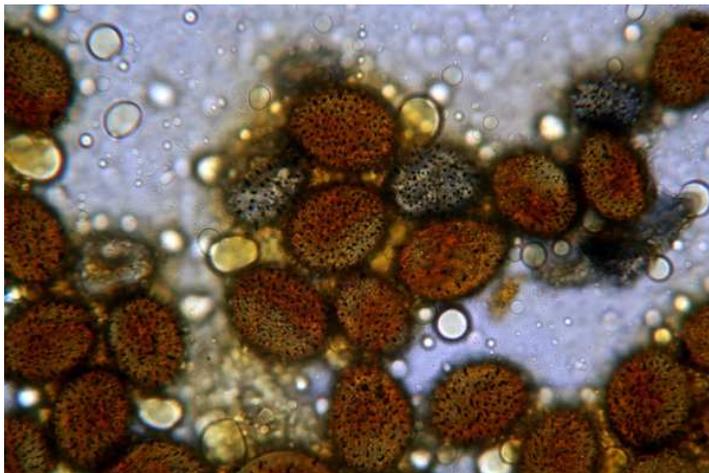
Bien mélanger et attendre la dissolution totale de chaque constituant avant d'ajouter le suivant. Ne pas amener l'iode au contact d'objets métalliques, qu'il attaque très aisément. La dissolution de l'iode peut être assez lente.

3. UTILISATION :

Le réactif de Melzer est un des milieux de montage les plus utiles pour la microscopie. En effet, c'est un réactif vis-à-vis duquel les éléments observés peuvent avoir trois comportements différents : ou bien ils sont iodo-négatifs, ou bien ils sont soit amyloïdes, soit dextrinoïdes. L'iodo-négativité correspond à l'absence apparente de réaction : les cellules se teintent de jaune brunâtre, qui est la couleur du réactif. Des éléments amyloïdes prendront une coloration gris bleu ardoise, voire noire, tandis que des cellules dextrinoïdes se teinteront de brun rouge foncé. La réaction amyloïde signale

généralement la présence d'amidon, tandis que la réaction dextrinoïde révèle le plus souvent les dextrines.

Spores de *Aleurodiscus wakefieldiae* observées dans le Melzer (photo Marcel Lecomte)



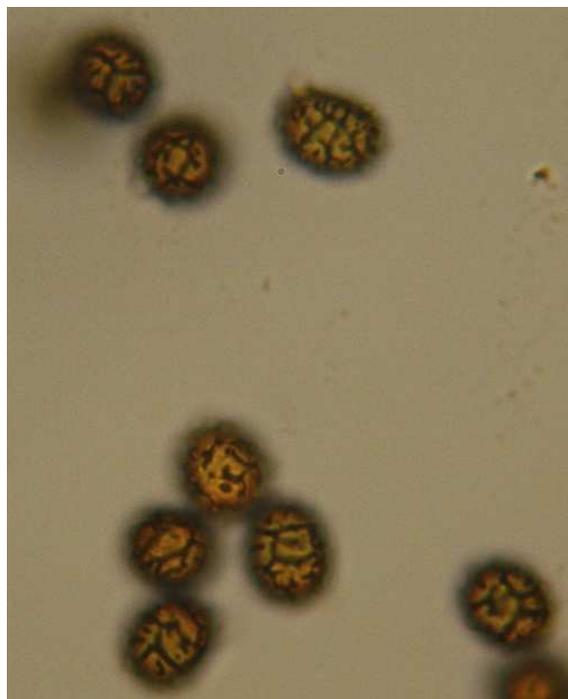
Ainsi, le réactif de Melzer est utilisé dans de nombreux genres, aussi bien chez les Basidiomycètes que chez les Ascomycètes. Il permet de savoir si les spores, notamment chez *Amanita*, *Melanoleuca* et *Mycena*, ainsi que chez de nombreux Aphyllophorales, sont amyloïdes ou non, et si, chez les lépiotes *lato sensu*, elles sont dextrinoïdes ou pas. Il facilite l'observation et la description de l'ornementation des spores chez *Lactarius* et *Russula* ainsi que certains *Cystoderma* (notamment *carcharias* et *amianthinum...*) et *Galerina*.

Enfin, il intervient lors de la détermination des Ascomycètes, dont le sommet des asques (que ce soit un opercule ou un pore) peut être amyloïde ou non, et lors de l'identification des mycènes, dont la chair est souvent dextrinoïde, mais pas toujours.

Le réactif de Melzer est aussi quelque peu utilisé en macrochimie, mais, dans ce domaine, le liquide de Lugol lui est préférable. Le Lugol est un Melzer sans hydrate de chloral, et avec des proportions en iode et iodure de potassium un peu différentes (voir fiche technique).

Chez les bolets (cf SINGER), le Melzer colore le contenu protoplasmique des hyphes en gris bleu, et non la paroi cellulaire.

Il colore en vert les paraphyses (hyphes stériles disposées entre les asques) des Ascomycètes.



Spores de *Lactarius ichoratus* observées dans le Melzer (photo Marcel Lecomte)

Chez les Agaricales chromosporées (à spores colorées), il est impératif de rechercher le caractère dextrinoïde sur des spores décolorées à la lessive potassique (KOH en solution aqueuse à 3%, chauffé à 55-60° C, durant 15 à 30 minutes → nécessité d'utiliser une étuve ou un bain marie à thermostat électrique). Le problème qui se pose est le suivant : il s'impose dès lors de faire disparaître toute réaction alcaline avant d'appliquer le réactif de Melzer, car la potasse a induit un milieu basique qui gêne la fixation de l'iode. Il faut donc laver la préparation dans une solution diluée d'acide acétique afin de neutraliser ce milieu alcalin.

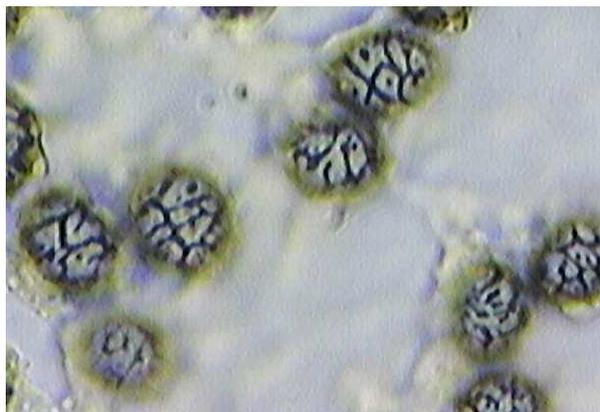
Il existe un moyen simple de contourner ce problème : c'est l'acide acétique iodé, qui va remplacer avantageusement, dans ce cas précis, le réactif de Melzer.

ATTENTION ! La recherche du caractère amyloïde doit se faire sur du matériel frais ou desséché ; sur du matériel conservé dans l'alcool ou le formol, ce caractère disparaît et ne peut plus être mis en évidence.

Lors de ses recherches, R. KUHNER a démontré que des spores immatures d'*Agaricus* (lessive potassique puis acide acétique iodé) sont dextrinoïdes, mais ce caractère disparaît très souvent chez

des spores matures (surtout celles qui présentent une grosse goutte huileuse en inclusion). Il semble que ce soit également le cas des *Cortinariaceae* (Cortinaires, Hébelomes, Inocybes).

Spores de *Lactarius seriffuus* observées dans le Melzer (photo Marcel Lecomte)



Pour les *Gymnopilus*, 3/4 des espèces ont des spores dextrinoïdes (Hesler L. 1969, *North American Species of Gymnopilus*, *Mycologia Memoir* 3 p. 10). En Europe seuls *Gymnopilus corsicus* et peut-être *G. decipiens* ne sont pas dextrinoïdes.

Pour les *Hebeloma*, la dextrinoïdie est évoquée par Smith A.H., Evenson V.S. et Mitchell D. 1983 (*The veiled species of Hebeloma in the Western United States*. *Ann Arbor*, p. 15), sans être détaillée ; elle est considérée comme un caractère fondamental dans la systématique des *Hebeloma* par Vesterholt depuis ses premières études (cf Vesterholt J. 2005 - *The genus Hebeloma*. *Fungi of Northern Europe* 3, p. 18). Je pense que c'est Bruchet (1973) qui l'a observée en premier, mais il n'en a pas tiré parti pour l'identification.

Les spores des "Hebelomina" (*H. domardiana*, *H. neerlandica*) sont dextrinoïdes. C'est aussi un caractère utile pour détecter des récoltes apigmentées de *Cortinariales* dont l'exospore n'est pas développée (par exemple *Tricholoma cookeanum* Malençon & Bertault, à spores nettement dextrinoïdes).

Je ne me souviens pas d'avoir observé de dextrinoïdie chez les *Galerina* ; en revanche, chez les espèces à exospore développée, celle-ci rougit dans KOH (*vittaeformis* etc.).

Pour *Leucocortinarius bulbiger*, spores non amyloïdes ni dextrinoïdes à ma connaissance. Le classement de cette espèce dans les *Cortinariales* me paraît être une erreur due à une convergence morphologique remarquable, mais non justifiée par la microscopie ni par le mode de vie probablement saprophyte)

Pour la cyanophilie : SINGER, R., 1972 - *Cyanophilous spore walls in the Agaricales and agaricoid Basidiomycetes*. *Mycologia*/ 64 (4): 822-829 (toutes les *Cortinariales* ont les spores cyanophiles).

Kühner (1980, *Hyménomycètes Agaricoïdes*) consacre un chapitre (p. 174-175) au sujet : "dextrinoïdie et cyanophilie de la paroi sporique" chez les *Cortinariaceae* (*Cortinarius*, *Hebeloma*, *Inocybe*). Il estime que chez presque toutes les espèces les spores sont dextrinoïdes au début de leur formation, et que cette dextrinoïdie persiste ou disparaît avec la maturation selon les espèces. Kühner discute aussi longuement de la position et des caractères sporaux de *Leucocortinarius* (p. 224-225). Il précise que les spores sont cyanophiles, non dextrinoïdes, binucléées, et constate chez une récolte une trame à tendance bilatérale inversée. Il note aussi l'absence d'endospore sur les spores de *L. bulbiger* (microscopie électronique), alors que toutes les *Cortinariales* ont une endospore nette. Enfin, il exprime ses doutes sur la position systématique de *Leucocortinarius*, et note (p. 651) : "il est possible que *L. bulbiger* soit une forme de *Tricholome* ayant réalisé un développement analogue à celui de *Cortinaires* de la section *Scauri*, et non, comme on l'a souvent prétendu, une forme ayant subi une évolution régressive". Il le maintient néanmoins dans les *Cortinariaceae-Cortinarieae* dans son tableau de classification générale p. 898. Je n'ai pas de données biblio sur la métachromasie dans le bleu de crésyl ; les spores des *Galerina*, *Inocybe*, *Alnicola* et *Cortinarius* que j'ai testées moi-même se sont toujours montrées orthochromatiques. (Pierre-Arthur Moreau – 17/05/2007).

Chez les *Amanites* : (Serge Poumarat)

Kotilová-Kubickova (1982) (noté réaction de K-K ou, simplement K-K) a montré que la chair, particulièrement dans des parties du basidiome à la confluence du stipe et du chapeau, peut contenir des hyphes dont les zones protoplasmiques entourant certains cloisons sur quelques micromètres (μm), sont plus ou moins fortement amyloïdes. La réaction de K-K se réalise sur de fines coupes effectuées seulement dans cette zone privilégiée du haut du stipe. Le matériel est déposé dans une goutte de liquide de Melzer (récent ! N'est-ce pas Marcel...) avec chloral et dissocié par percussion. Il faut observer la préparation avec un objectif x100 à immersion. Pour se familiariser avec cette réaction, commencer par *muscaria* ou ressemblants où elle est manifeste, immanquable. Chez les *Vaginatinae*, il faut soigneusement balayer la préparation et essayer de repérer les cloisons amyloïdes. Il faut souvent de la patience et un réactif de Melzer "en pleine forme". Sinon, elle est remarquablement corrélée avec les caractères qui définissent les divers taxons.

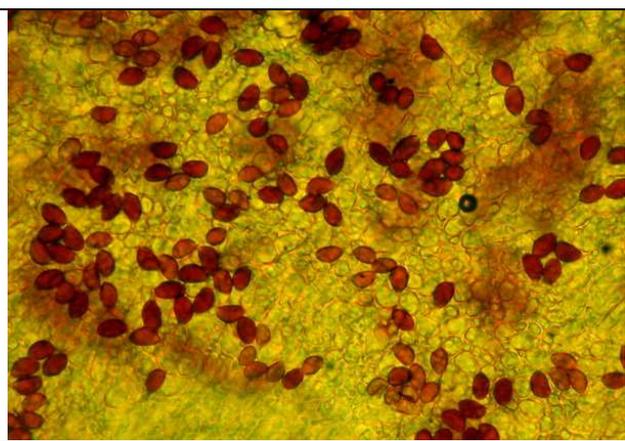
Par exemple : *vaginata* est K-K-, et *simulans* est K-K+

4. DANGERS :

Le réactif de Melzer est assez dangereux : l'hydrate de chloral est toxique et irritant et l'iode est nocif ; aussi, éviter tout contact avec la peau ou les yeux, et éviter de respirer les vapeurs. D'autre part, il est bon de savoir que l'iode, au contact de l'ammoniaque, provoque des réactions à caractère explosif. Enfin, l'iode se fixant très bien sur la cellulose, à laquelle il donne une coloration noirâtre, il faut éviter d'en tacher les vêtements en coton (les taches peuvent être enlevées à l'aide d'une solution diluée de thiosulfate de sodium : $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)



Spores hyalines d'*Hebeloma sinapizans* observées dans l'eau (photo Françoise Draye)



Spores d'*Hebeloma sinapizans* observées dans le réactif de Melzer → réaction dextrinoïde en brun rougeâtre (photo Françoise Draye)

5. CONSERVATION :

Le réactif de Melzer doit être conservé dans un flacon en verre hermétiquement fermé parce que ce liquide est assez corrosif et que l'iode, volatil, est capable de s'échapper de certains flacons, à travers le plastique. D'autre part, il est préférable de garder le flacon à l'obscurité car la lumière pourrait altérer l'hydrate de chloral. Dans des conditions normales d'utilisation, il peut se conserver durant 1 à 2 années ; un moyen simple de le tester : passer la palette sur du papier ou du sopalin et la tache doit devenir brun foncé au minimum ; si la tache reste brun clair ou rangée, le Melzer n'est plus efficace.