

Kleuren van veenmossen (*Sphagnum*), waarom en waarmee?

H. Rudi Zielman

Aanleiding

Bijna tien jaar geleden begon ik mij zorgen te maken over de lengte van het anilinepotlood waarmee ik mijn veenmospreparaatjes soms kleurde: het werd steeds korter. En hoe kleur je dan je veenmossen als het op is? Wat ik tot dan toe deed, was in een druppeltje water mijn potlood krachtig wat heen en weer duwen tot het water donker was en er dan het blaadje of takje in dopen. Een berichtje op Bryonet leverde verschillende antwoorden, maar eigenlijk steeds met als hoofdboodschap “ik gebruik X omdat ik die het mooiste/prettigst vind” zonder de verschillende mogelijkheden op een rijtje te zetten, soms ook nog met een verhandeling over hoe het mos eerst te prepareren voor het gekleurd kan worden. De meest attente reactie was wel een nieuw anilinepotlood dat mij toegezonden werd uit Zwitserland (?) door een bryologe die er eentje ongebruikt wist bij haar ouders. Het vervelende is dat ik, nu ik de tijd heb gevonden om alle methodes die toen langskwamen uit te proberen, haar naam niet meer weet en het potlood niet meer kan vinden. Het is niet weg, wel zoek. Nadat ik gestopt ben met werken ben ik aan het opruimen geslagen, dit artikel is er een weerslag van, maar nog niet alles is op orde.

Het potlood dat ik toen te goed heb opgeborgen bleek helaas ongeschikt toen ik het direct na ontvangst even ging proberen; er kwam geen kleurstof in het water. Ook het flesje aniline dat ik kocht staat hier werkloos, het blijkt de veenmossen niet te kleuren. Zodra er na onderdompelen in de aniline water gebruikt wordt om het preparaat te maken ontkleurt het hele preparaatje weer. Omdat aniline in ieder geval behoorlijk giftig is en mogelijk ook carcinogeen, is het prettig dat het afvalt in de vergelijking.

Het doel van dit verhaal is eigenlijk het inlossen van een toezegging die ik indertijd gedaan heb: het op een rijtje zetten van de beelden als je op verschillende veenmossen verschillende kleuringen toepast. Met andere woorden:

Welke manieren zijn er om eenvoudig thuis vage structuren van veenmossen zichtbaar te maken?

Daarbij is de praktische toepasbaarheid voor het determineren van belang. Ik ga niet in op het langer bewaren van gekleurde preparaten, daar komen vaak wat ingewikkelder fixatiemethodes bij kijken.

Met die potloden is iets bijzonders aan de hand; ze waren erg populair tot zo'n 50 jaar geleden, omdat je er onuitwisbaar mee kon schrijven, nadat je er even aan gelikt (!) had. Maar ja, toen werden ze hier verboden (Biersma 2012). Wat ik stom toevallig had, was een echte 'Oostbloktrofee', uit Joegoslavië! Een chemisch wat beter onderlegde kennis wist te melden dat die anilinepotloden vaak een andere kleurstof dan aniline bevatten, dat verklaart vermoedelijk het verschil tussen de werkende kleuring met dat oude potlood en de ontoereikende met de anilineoplossing en mogelijk ook het fiasco met het cadeau gekregen anilinepotlood.

Voor de gelegenheid heb ik er een preparaatje mee gemaakt van *Sphagnum obtusum*, de soort waarvoor de kleuring er het meest op aankomt. Je ziet (Fig. 1) dat het nogal vlekkerig is, het afschraapsel (al zichtbaar op de foto met het takje) verspreidt zich niet egaal in het blad. Maar de erg vage poriën waar het om gaat zijn wel zichtbaar, ongeveer iets onder het midden in en bij de donkerste cel (omcirkeld).

Materiaal en werkwijze

De gebruikte kleurstoffen (en de codering in Fig. 2, 3 en 4) zijn:

NC - No colour, geen kleuring

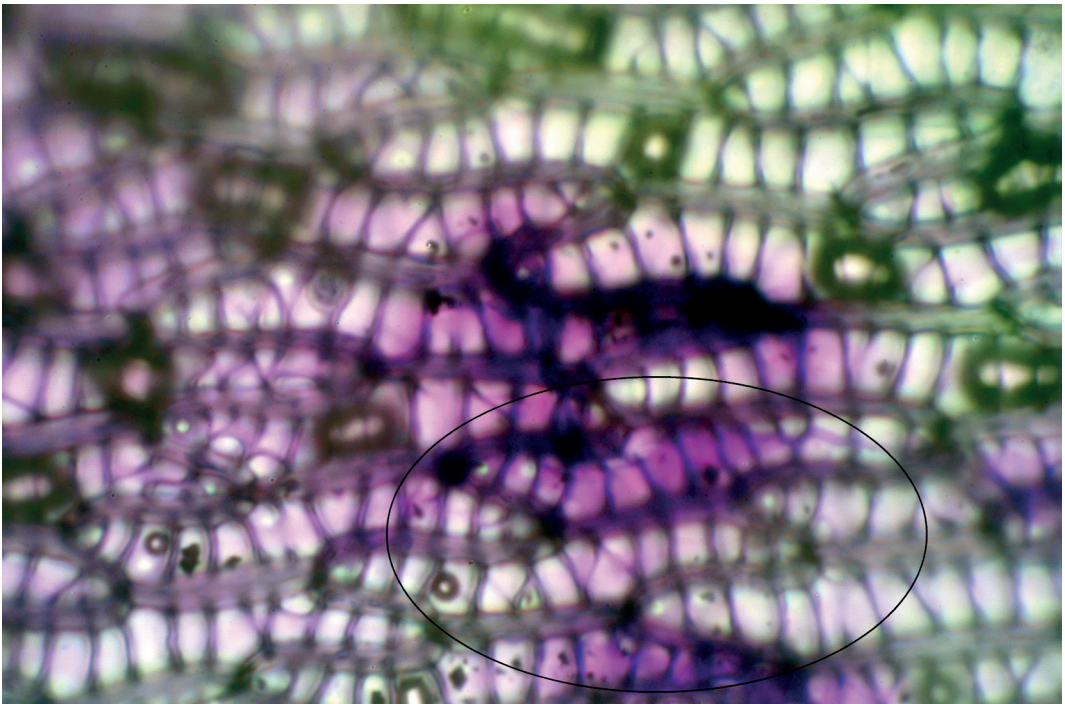
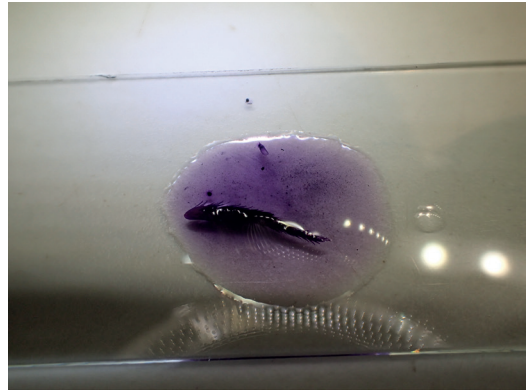
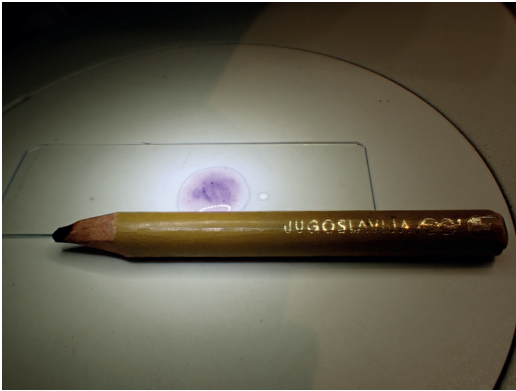
MB - Methyleenblauw

SF - Safranine

TO - Toluidineblauw (eigenlijk: toloniumchloride)

GV - Gentiaanviolet, ook wel kristalviolet genoemd (methylosaniline)

Het gaat hierbij steeds om een 1% ETOH oplossing, kort door de bocht een verzadigde oplossing in water, met wat ethanol erbij. Sommige zijn erg makkelijk verkrijgbaar, andere lastiger.



Figuur 1. *Sphagnum obtusum* gekleurd met een oud anilinepotlood. *Sphagnum obtusum* stained with an old aniline pencil.

De gebruikte kleurstoffen zijn alle kleurstoffen met een ringstructuur, met name bij toluidineblauw wordt er de nadruk op gelegd dat het toluidineblauw-O moet zijn, d.w.z. de methyl- en aminegroepen in ortho-positie, ook bij safranine wordt dit gemeld. Voor zover ik weet is dit bij de kleurstoffen die momenteel verkrijgbaar zijn ook steeds het geval, zodat je hier niet specifiek op hoeft te letten. Methyleenblauw en safranine worden verkocht bij (web-)winkels die ook spullen voor microscopie verkopen. Tol-

uidineblauw is momenteel het lastigst, toen ik de spullen zo'n 8 jaar geleden verzamelde heb ik het uit een webshop en een universiteitslab gekregen, nu kan ik het niet vinden. Toen was gentiaanviolet een probleem, nu in mindere mate: het kan op doktersvoorschrift (dank aan mijn huisarts) door de apotheker geleverd worden. Het wordt gebruikt bij de behandeling van spruw (een schimmelinfectie) bij zuigelingen, en kan blijkbaar ook bij shops die zich toeleggen op spullen voor borstvoeding besteld worden. Voor

alle deze kleurstoffen geldt dat ze in tegenstelling tot aniline niet giftig zijn, en dat ze per 10 ml ongeveer 15 – 20 euro kosten, je krijgt dan de gebruiksklare oplossing. Methyleenblauw, toluidineblauw en gentiaanviolet zijn ook als poeder verkrijgbaar (vrij lastig) waar je dan een pincettipje van op een glaasje doet en dat oplost in water of ethanol. Met het poeder kun je ook een 'stockplossing' bereiden (recepten op internet), maar dan heb je wat roer- en filtreerfaciliteiten nodig. Voor de kleureffecten maakt het niet uit of je de oplossing of het poeder gebruikt, de oplossing werkt veel prettiger. Omdat het in dit verhaal om het kleureffect gaat – wat wordt wel en niet zichtbaar – beperk ik me hier tot het gebruik van de oplossingen.

Een woordje over veiligheid (disclaimer: dit vervangt niet de veiligheidsbladen): methyleenblauw is de vervelendste van de gebruikte kleurstoffen, niet giftig, maar kan wel oog- en huidirritaties geven. Alle oplossingen zitten in alcohol en zijn dus een tikje irriterend. Gemorste kleurstoffen kun je gemakkelijk met een tissue met wat spiritus verwijderen.

Uit het eigen herbarium zijn een aantal collecties gelicht van soorten waar op enigerlei wijze de positie of vorm van poriën van belang is. Van elke soort is een aantal takjes (of stengelstukjes) van dezelfde stengel genomen, dicht bij elkaar iets onder het hoofdje van de plant. Elk droog takje of stengelstukje is even ondergedompeld in een paar druppeltjes van de kleurvloeistof en wat heen en weer geschud en aangedrukt om de vloeistof overal goed terecht te laten komen. Als je even vluchtig kleurt blijkt vaak dat bladdelen (vaak de basale helft) niet goed gekleurd zijn omdat de vloeistof er niet bij kon. Na het dompelbadje zijn de takjes of stengelstukjes even gespoeld in gedemineraliseerd water. Doe dit voorzichtig, veenmossen verliezen erg makkelijk blaadjes of raken beschadigd. Even dompelen, druppels vervangen, opnieuw dompelen, tot het water niet meer kleurt. Daarna is het preparaat gemaakt.

Van alle collecties zijn semipermanente preparaten bewaard (druppel nagellak). Microscopische opnamen zijn gemaakt met een Leica DM E microscoop met 40 X achro-objectief en trinoculaire kop met Leica 1 X foto-objectief waarop een Nikon D5300 camerabody bevestigd is. De diafragmaopening van de microscoop is voor

alle foto's gelijk, de belichtingsintensiteit niet, tussen verschillend fotoseries is de microscoop uit- en aangezet. Omdat een microscopische opname geen scherptediepte heeft is eerst boven het blad of de doorsnede scherp gesteld en daarna met de fijnstelknop handmatig in heel kleine stapjes het focusvlak door de celwand heen steeds dieper gelegd. De opnames zijn vervolgens gestackt met CombineZM en nabewerkt (kleurniveaus automatisch gebalanceerd, stackranden wegnippen) met GIMP 2.10. De resultaatfoto's zijn samengesteld uit een wisselend aantal afzonderlijke foto's, afhankelijk van mijn visuele beoordeling.

Voor ik de resultaten weergeef, nog even een opmerking die we makkelijk vergeten: het menselijk oog ervaart kijkend door de microscoop een ander beeld dan een camera vastlegt. De gestackte foto's laten veel minder licht zien dan wij ervaren, door het automatisch balanceren wordt het beeld wel weer veel helderder, maar dat is dan weer veel contrastrijker dan wat wij zien. De getoonde foto's geven wel een goed beeld van het effect van kleuren en van details waarvan ze de zichtbaarheid verbeteren. Alle foto's (ook die van de stacks) en preparaten, bewaar ik een poos.

Resultaten

In onderstaande overzichtjes laat ik een paar soorten zien waarvan het belangrijk is poriën te bekijken. De volgorde is steeds NC – geen kleuring, MB – methyleenblauw, TO – toluidineblauw, GV – gentiaanviolet, SF – safranine. Deze volgorde laat een vrij gelijkmatig verloop in de kleuren zien, van blauw via purpertinten naar oranje-rood.

Alle beelden en nog wat meer zijn te downloaden van: www.zimvo.nl/sphagnum/stains (volledige link intypen).

Sphagnum divinum

Allereerst *Sphagnum divinum*, waar de breedte van poriën in het proximale deel van takblaadjes en de dikte van de wand tussen chlorocyten en hyalocyten van belang zijn. Zie mijn verhaal in de vorige *Buxbaumiella* voor wat meer uitleg (Zielman 2020), ook over de bouw van veenmosblaadjes.

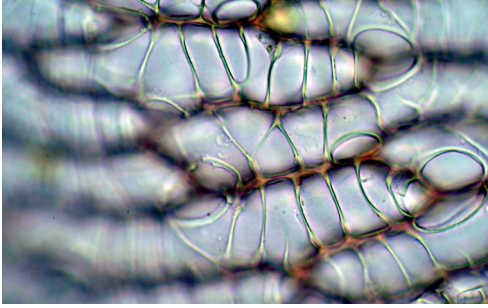
Figuur 2. *Sphagnum divinum* coll. 19368

Kleur

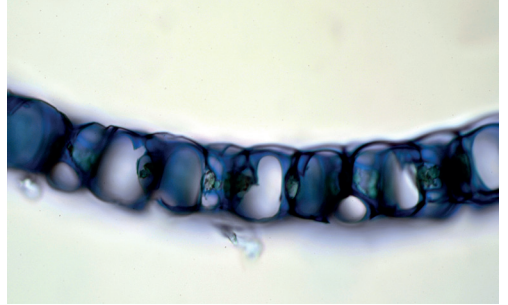
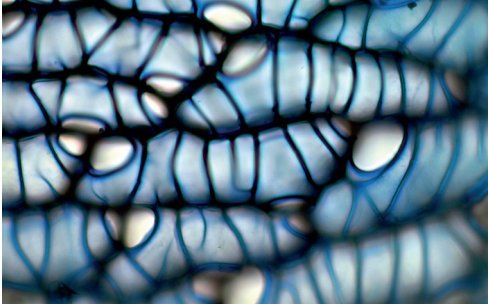
Proximale cellen takblad, dorsaal

Doorsnede takblad

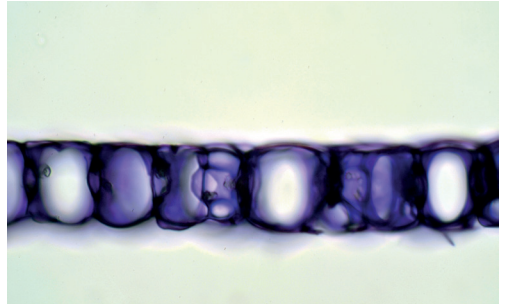
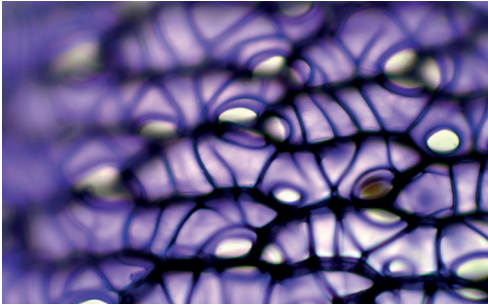
NC



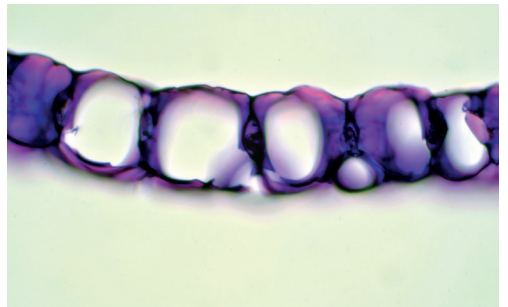
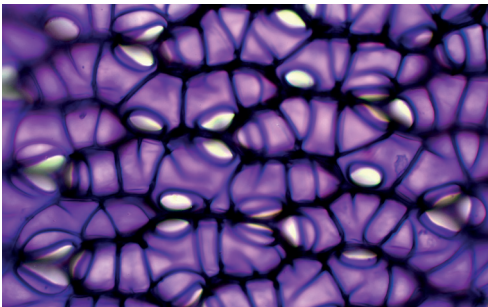
MB



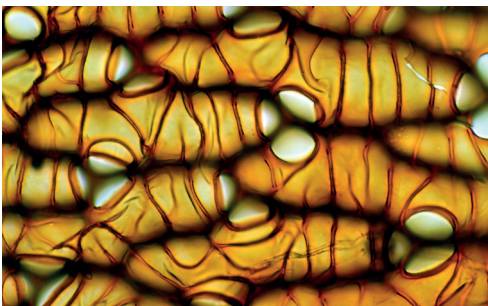
TO



GV



SF

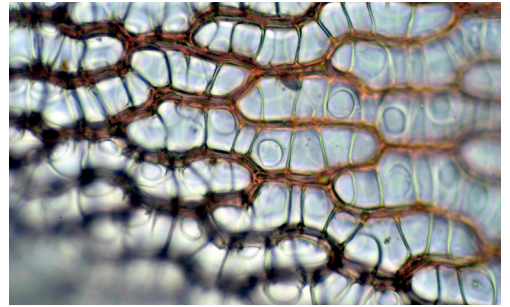
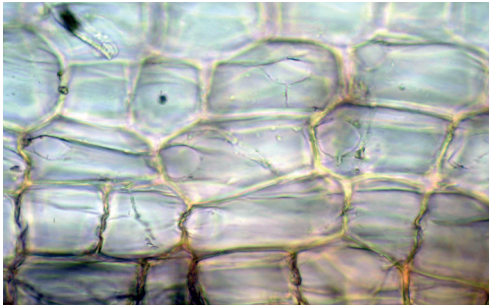


Figuur 3. *Sphagnum russowii* coll. 12969

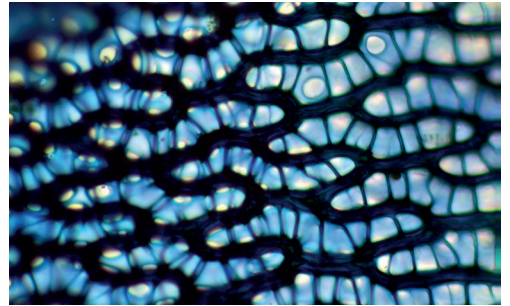
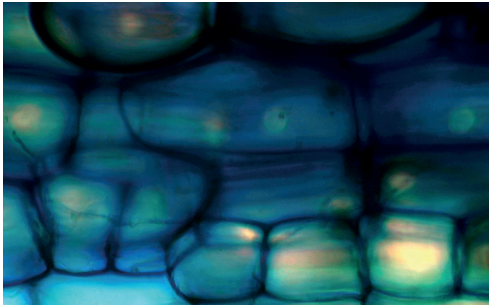
Kleur Stengelepidermis / Stem epidermis

Takblad / Branch leaf, ventral view

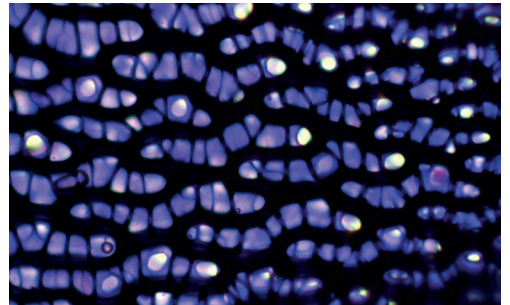
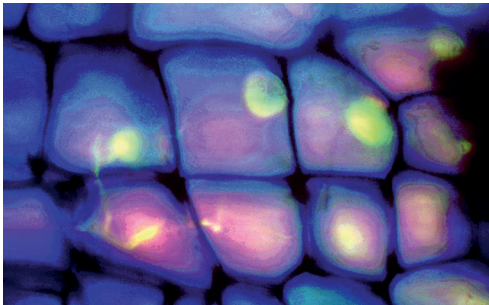
NC



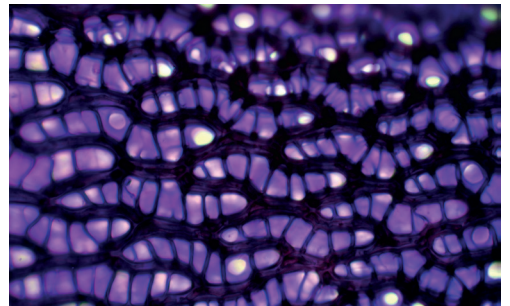
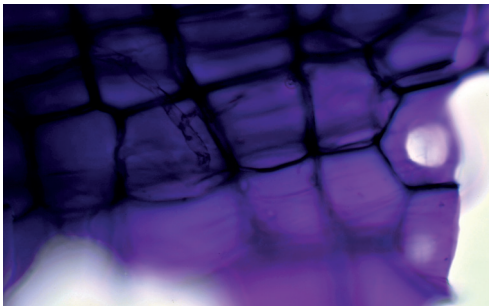
MB



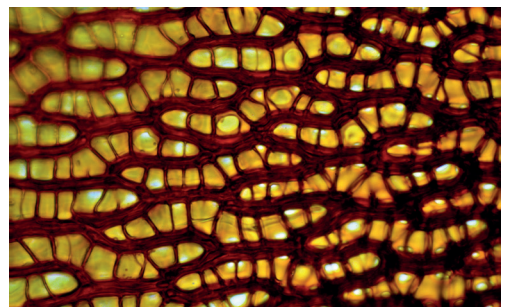
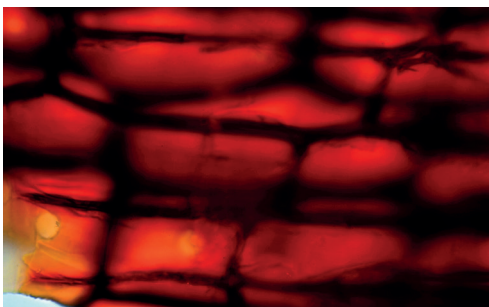
TO



GV



SF

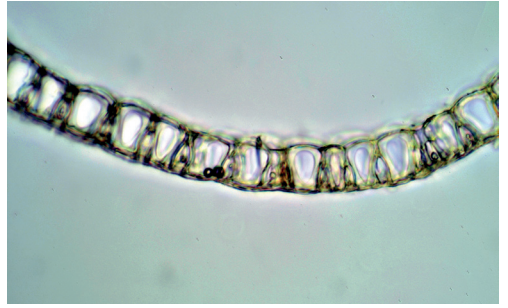
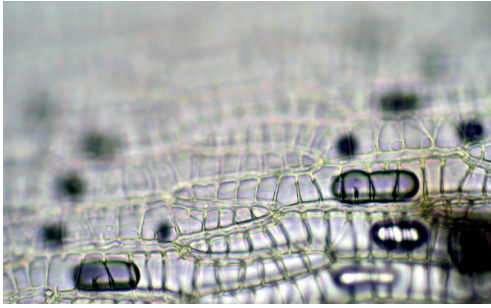


Figuur 4. *Sphagnum obtusum* coll. 18541

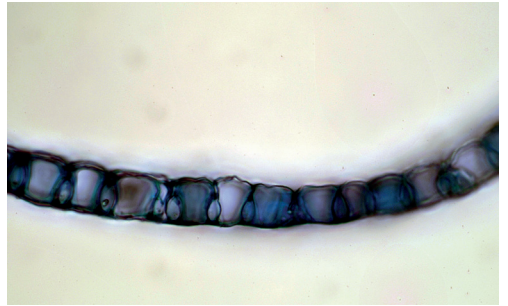
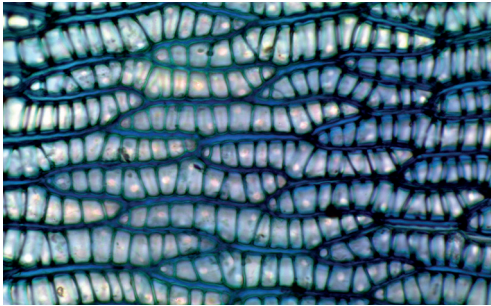
Kleur Proximale cellen takblad, dorsaal

Doorsnede takblad

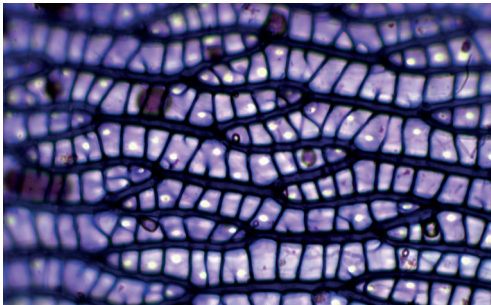
NC



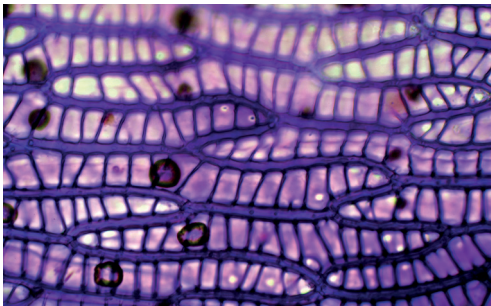
MB



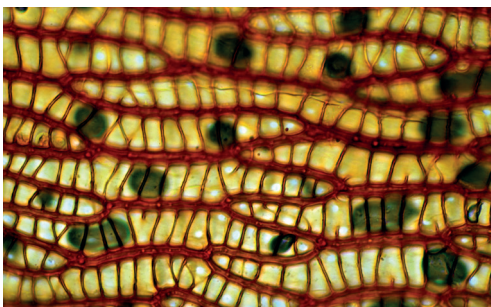
TO



GV



SF

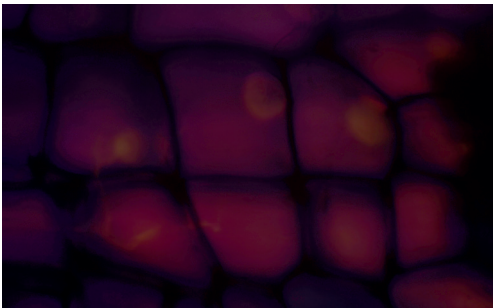


Wat je in de linkerrij foto's van Fig. 2 ziet is dat de poriën in de hyalocyten duidelijk zichtbaar zijn en minder dan de halve celbreedte breed zijn; dit is in de ongekleurde cellen al het geval, maar kleuring maakt het iets overzichtelijker. De bladdoorsnede aan de rechterzijde is minder duidelijk; door het sigmoïde verloop van de hyalocyten zijn de celwanden tussen de hyalocyten en chlorocyten soms over grote breedte in de doorsnede zichtbaar en is die tussenwand lang niet overal goed te interpreteren in de gekleurde preparaten, en wél in het ongekleurde preparaat.

Sphagnum russowii

Bij deze soort zijn de pseudoporiën (dunne plekken in de celwand) van de stengelepidermis van belang. Die prepareer je het gemakkelijkst door een stukje stengel met een pincet vast te houden en dan met het scheermesje de stengel heel schuin aan te snijden, soms lukt het dan zelfs om die opperhuid helemaal los te krijgen (bijv. in het gentiaanvioletpreparaat). Hölzer (2010) noemt ook de grote poriën aan de ventrale zijde als kenmerk (rechterkolom).

Het beeld van de epidermis gekleurd met toluidineblauw in Fig. 3 is door de automatische kleurniveauregeling wat bont geworden. Onderstaande foto is de niet aangepaste versie, die ook dicht komt bij wat wij door de microscoop zien.



Op alle foto's van de epidermis, behalve de ongekleurde, zijn de schaduwporiën duidelijk zichtbaar. Ook zijn de grote poriën aan de ventrale zijde in de takbladeren goed herkenbaar. Realiseer je wel, dat de witte gaten een doorkijkje zijn waar een porie aan de ventrale en dorsale zijde recht achter elkaar liggen!

Sphagnum obtusum

De ware uitdaging bij kleuringen ligt in het zichtbaar maken van de heel kleine en erg onduidelijke poriën van *Sphagnum obtusum*, weliswaar geen inheemse soort in Nederland, maar wel bijna, hij is opgenomen in onze veenmosflora (Bouman 2002) en komt in België voor. De celwandverduunningen waar het om gaat zijn vooral proximaal aan de zijkanten van het blad te vinden, deze zone is dan ook steeds in beeld gebracht.

Het moge duidelijk zijn dat alle kleuringen de zichtbaarheid van de structuren in de takbladcellen van *Sphagnum obtusum* verduidelijken, terwijl zonder kleuring de schaduwporiën onzichtbaar blijven. Maar ook hier laten de dwarsdoorsnedes van het takblad die gekleurd zijn zich weer lastiger overzien dan de ongekleurde doorsnedes.

Discussie, geen conclusie 😊

Het kleuren van veenmossen helpt bij het zichtbaar maken van poriën, maar is niet altijd nodig. Hoewel *Sphagnum divinum* zonder kleuring goed te beoordelen is, heeft het maken van een doorsnede door een gekleurd blad mij er op attent gemaakt dat het onderscheid met *Sphagnum centrale*, dat met behulp van ongekleurde doorsnedes moeilijk te maken is, met zo'n kleuring een stuk eenvoudiger is. De wand wordt namelijk gekleurd en daardoor is makkelijker te beoordelen of er daadwerkelijk sprake is van de voor *Sphagnum centrale* kenmerkende verdikte celwanden van de chlorocyten. In het algemeen is het echter raadzaam de ligging van chlorocyten aan ongekleurde doorsnedes te beoordelen.

Als er een afweging gemaakt moet worden of er sprake is van schaduwporiën of vage poriën moet er gekleurd worden. Daarbij is de kleurstof die gebruikt wordt minder van belang, zolang het een kationische kleurstof is zoals Daniel & Eddy (1990) reeds opmerkten. Had ik dat in 2012 maar goed gelezen... Verder is het toch wel een kwestie van smaak, Adam Hölzer (2010) zweert bij gentiaanviolet, Lisa op den Kamp (2012) heeft een sterke voorkeur voor safranine, dit is ook de kleuring die gebruikt werd door Laine c.s. (2009) en in Australië worden alle botanische preparaten standaard met toluidine-

blauw gekleurd (Rod Seppelt, pers. comm.). In het algemeen wordt methyleenblauw, dat vroeger veel gebruikt werd, beschouwd als een kleuring die onaangenaam hard, donker, is. Vanwege het gebruiksgemak en verkrijgbaarheid ben ik zelf meer en meer safranine gaan gebruiken, nadat mijn eerste flesje gentiaanviolet leeg was. Maar na het werk voor dit verhaal neig ik naar het gebruik van toluidineblauw, hoewel lastig verkrijgbaar, of naar gentiaanviolet. Al met al blijft het een tikje een kwestie van persoonlijke smaak, dus geen keiharde conclusie. Maar ik ga wel weer wat vaker kleuren, voor een makkelijker beoordeling.

Dank

In de acht jaar van mijn onderzoek heb ik met veel mensen contact gehad die ik dank verschuldigd ben voor adviezen, opmerkingen, materiaal etc. Ik noem er een paar. Een grote groep deelnemers aan de discussie op Bryonet, hierbij vooral Adam Hölzer (Dld) en Lisa op den Kamp voor het uitzetten van de redenen voor hun verknochtheid aan 'hun' kleur. Verder Jan Maas voor het klaarmaken van de eerste porties kleurstoffen op het Botanisch Laboratorium van de Universiteit Utrecht in 2012. Dank ook aan de nu even naamloze Duitstalige bryologe voor het opzenden van het anilinepotlood dat ze bij haar ouders werkloos aantrof, aan mijn huisarts en assistente voor een receptje naar de apotheker, en aan Erik Roolevink (natuurwerkgroep ENHOe) voor een aantal opmerkingen van chemische aard en een stapel veiligheidsbladen.

Referenties

- Biersma, R. (2012) Onuitwisbaar, maar giftig: Verdwenen. NRC Handelsblad 29-3-2012:24
- Bouman, A.C. (2002) De Nederlandse Veenmossen. BLWG.
- Daniels, R.E. & A. Eddy. (1990) Handbook of European Sphagna. HMSO, London.

- Hölzer, A. (2010) Die Torfmoose Südwestdeutschlands und der Nachbargebiete. Weisdorn, Jena.
- Laine, J., P. Harju, T. Timonen, A. Laine, E-S. Tuittila, K. Minkkinen & H. Vasander (2009). The Intricate Beauty of Sphagnum Mosses. Univ. of Helsinki. Dept. Forest Ecology Publ. 39.
- O'Brien, T.P., N. Feder, M.E. McCully (1964) Polychromatic Staining of Plant Cell Walls by Toluidine Blue O. *Protoplasma* 59(2):368-373 DOI: 10.1007/BFO1248568.
- Zielman, H.R. (2020) Hoogveenveenmos in Nederland is *Sphagnum divinum* Hassel & Flatberg. *Buxbaumia* 119: 27-34.

Auteursgegevens

H.R. Zielman, rudi-zielman@wxs.nl

Abstract

Staining Sphagnum, why and how?

After feeling the need in 2012 to switch from staining *Sphagnum* for identification with an aniline pencil to some other dye, I posted a question on Bryonet: which stains would be suitable? Several answers were obtained, none comparing all possibilities.

In this paper an attempt is made to compare four non-toxic, commercially available, and affordable stains and illustrate the effects. For the illustrations branches or stem pieces were used, which were put in a few drops of solution and shortly thereafter washed with demi water.

Compared to no colouring (NC), all stains used [MB - methylene blue; TO - toluidine blue O; SF - safranin; GV - gentian violet (- crystal violet)] highly enhance the visibility of faint pore structures. Coloured leaf transections, however, are often blurred, which is caused by the sigmoid cell pattern, so it is recommended to inspect these in uncoloured condition.

No explicit winner is chosen, it is merely a matter of taste. Staining with methylene blue seems less favourable, gentian violet and toluidine blue make nice images but are a bit harder to obtain. Safranin, being obtainable and usable, might be a good choice.