

De KUV spottest: work in progress...

Hans Toetenel



Foto 1: *Xanthoparmelia delisei* cf.
Eemsdijk Bierum

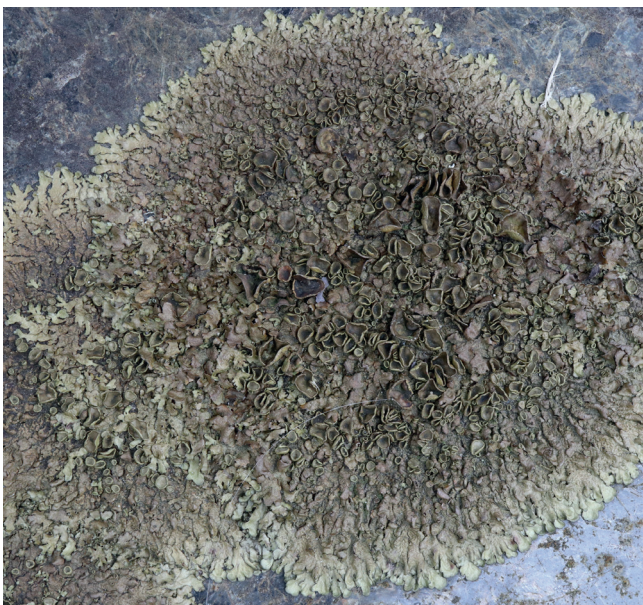


Foto 2: *Xanthoparmelia pulla* cf.
Kerk Mechelen, Zuid-Limburg



Foto 3: *Xanthoparmelia loxodes* cf.
Hunebed D14, Eexterhalte



Foto 4: *Xanthoparmelia verruculifera* cf.
Hunebed D15, Loon

Het probleem

Wat zijn ze lastig om op 't oog op naam te brengen, die bruine steenschildmossen! Op mijn excursies in Nederland kom ik ze regelmatig tegen, meestal op zure steensoorten zoals graniet. De twee bovenste soorten (Foto 1 en 2) maken geen isidiën maar wel vaak apotheciën, de onderste twee soorten (Foto 3 en 4) maken meestal isidiën en minder vaak apotheciën. Thalluskleur, kleur van de onderkant, wel of geen maculae of de vorm van de lobben en isidiën vormen geen betrouwbare veldeigenschappen voor determinatie. Vandaar de afkorting 'cf.' achter de (mogelijke) namen van de korstmossen bij de foto's. De afkorting 'cf.' is afkomstig van het Latijnse woord *conferatur* en betekent zoveel als 'het zou dit wel eens kunnen zijn'; de letterlijk betekenis is 'het worde vergeleken met' (aanvoegende wijs). Ik heb levendige discussies meegemaakt in het veld tussen experts bij het op naam brengen van deze soorten waarbij de ene expert ging voor soort A en de andere voor soort B. Uiteindelijk kan alleen chemisch onderzoek uitsluitsel brengen. En dat brengt ons bij het onderwerp van dit artikel: secundaire metabolieten van korstmossen.

Metabolieten

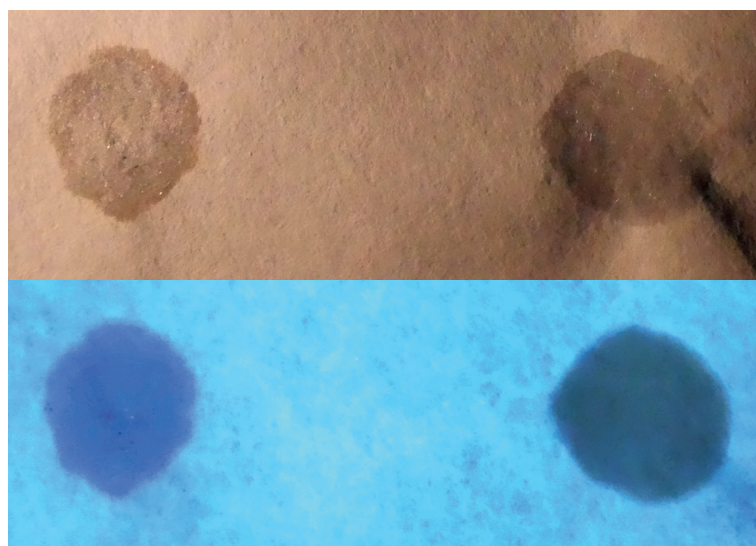
Metabolieten zijn chemische stoffen die ontstaan bij de stofwisseling van levende materie. Het zijn organische verbindingen, grotendeels opgebouwd uit koolstof, waterstof en zuurstof. Ze ontstaan tijdens een ingewikkeld chemisch proces, waarbij enzymen een belangrijke rol spelen. Korstmossen maken metabolieten door een samenwerking tussen de fotobiont (alg of blauwwier) en de mycobiont (de schimmelcomponent). Veel van deze stofwisselingsproducten zijn uniek voor korstmossen en komen niet in andere levensvormen voor, ook niet in niet-gelicheniseerde schimmels of vrij levende algen. De metabolieten worden in twee groepen verdeeld. Primaire metabolieten spelen een rol in de biochemische processen in de cel en de celwand gericht op de levenscyclus van de cel. Secundaire metabolieten worden wel in een cel gemaakt, maar hebben een functie buiten de cellen. Van veel van de secundaire metabolieten is die functie niet helemaal duidelijk. Sommige stoffen zorgen ervoor dat het korstmos ongeschikt wordt voor consumptie (vraat), andere dragen bij in de bescherming tegen UV straling, uitdroging etc. Weer andere stoffen hebben een antibacteriële

werking. Er wordt veel onderzoek gedaan aan deze secundaire metabolieten van korstmossen om te bepalen of ze ingezet kunnen worden bij de bestrijding van allerlei ziekten bij de mens.

Door hun specifieke opbouw hebben de secundaire metabolieten chemische eigenschappen die helpen met het op naam brengen van het metaboliet. De meeste van de technieken die worden toegepast om te bepalen welke stoffen er in een korstmos aanwezig zijn, kunnen alleen in gespecialiseerde laboratoria worden uitgevoerd zoals IS: Infrared Spectroscopy, MS: Mass Spectrometry en NMR: Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. Een proces dat makkelijker uitvoerbaar is, ook buiten gespecialiseerde laboratoria, is TLC: Thin Layer Chromatography. Met dit proces zijn specifieke soortgroepen en vaak ook specifieke stoffen op naam te brengen. TLC is een complex proces dat vraagt om veel kennis en ervaring en waarbij bijzondere hulpmiddelen gebruikt worden zoals chemische reagens, oplosmiddelen, testplaten waarop de opgeloste verpulverde korstmossen worden aangebracht, UV licht etc. Dit proces is dus niet voor iedere amateurlichenoloog inzetbaar. Een nog eenvoudiger chemisch onderzoek wordt gedaan met behulp van de welbekende spottesten op onderdelen van een korstmos, de K, KC, C, P en UV spottesten. Bepaalde groepen van metabolieten geven een specifieke kleurreactie op het aanbrengen van een kleine hoeveelheid testvloeistof op schors, merg of sorediën van een korstmos. Deze testen kunnen vaak in het veld al uitsluitend geven over de soort die onderzocht wordt. Soms is het beter om de test thuis uit te voeren met een stukje in aceton opgelost korstmos op filterpapier en een binoculair om het resultaat te beoordelen. Maar de kleurreacties van de spottesten geven niet altijd uitsluitsel over de soort in onderzoek. In het voorbeeld van de steenschildmossen hebben *Xanthoparmelia pulla* en *Xanthoparmelia delisei* min of meer dezelfde kleurreacties. Dit geldt ook voor de andere twee, *Xanthoparmelia loxodes* en *Xanthoparmelia verruculifera*. Echter, ze bevatten wel verschillende metabolieten, dus met TLC zou je de soorten op naam kunnen brengen...

Materialen en methode

Voor de UV belichting in de laboratoriumopstelling thuis en in het veld is gebruik gemaakt van een Trova UV zaklamp, met golfengete van



Filtreerpapier met in aceton opgeloste extracten.

Links *Xanthoparmelia loxodes* met een druppel KOH toegevoegd.

Rechts *Xanthoparmelia verruculifera* met een druppel KOH toegevoegd.

Gefotografeerd met het licht van een 4000° K LED lamp.

Reactie van de twee oplossingen in UV licht.

Links het extract van *Xanthoparmelia loxodes* met een blauwe UV reactie.

Rechts van *Xanthoparmelia verruculifera*, zonder een UV reactie, de vlek wordt donker.

Figuur 1. KUV test op de steenschildmossen.

365 nm en 8000° K. De lamp voor de belichting van de objecten onder de binoculaire is een led-lamp met een kleurtemperatuur van 4000° K. De foto's van de korstmossen in 't veld zijn gemaakt met een systeemcamera (met of zonder focusstacking), de overige foto's zijn gemaakt met een microscopcamera op een binoculaire (CMEX-18 pro). Het gebruikte oplosmiddel voor de korstmosfragmenten is aceton, het witte papier is een UV-negatief filtreerpapier. De KUV test werkt als volgt: pas eerst een K spottest toe en belicht de plek met K vervolgens met UV licht. De toepassing kan soms direct buiten in het veld. Maar door het daglicht is de interpretatie van de belichting met UV lastig. Beter is om een klein stukje van het specimen mee te nemen en thuis te onderzoeken. Na het onderdeel met naar verwachting de te onderzoeken secundaire metabolieten zoals de cortex, merg, sorediën etc. verpulverd te hebben los je het op in aceton. Rustig een uurtje wachten, vervolgens de oplossing aanbrengen met een pipet op een stukje filtreerpapier, daarna voeg je een klein druppeltje K toe op de aangebrachte oplossing. UV lamp erop en klaar.

Experimenten

Ik ben lid van een aantal buitenlandse korstmosverenigingen waaronder de Franse AFL, l'Association française de Lichénologie. Zij geven een mooi clubblad uit, net zoiets als *Buxbaumiella*, maar dan wat groter en dikker. In het in 2023

verschenen Volume-48, fascicule 1, stond een interessant artikel over een andere spottest, de KUV test (Uriac 2023). In de literatuurverwijzingen in het artikel werden een aantal publicaties genoemd die gewijd waren aan onderzoek van de KUV test toegepast op de steenschildmossen (Hellou 2019). Wat bleek: er is een verschil in de KUV reactie van *Xanthoparmelia loxodes* en *Xanthoparmelia verruculifera*, evenals tussen *Xanthoparmelia pulla* en *Xanthoparmelia delisei*. Dus, gewapend met deze test is het mogelijk om deze soorten goed te determineren.

In Figuur 1 is het resultaat weergegeven van de KUV test op twee verschillende steenschildmossen.

De soort heet KUV+ als er een duidelijke kleurreactie optreedt. Wat blijkt: *Xanthoparmelia delisei* en *Xanthoparmelia loxodes* zijn KUV+, beide soorten hebben een blauwe KUV reactie. Daarentegen zijn *Xanthoparmelia pulla* en *Xanthoparmelia verruculifera* KUV-, ze hebben geen kleurreactie, behalve dat de behandelde plek soms donker kleurt.

Het Franse artikel in Volume-48, fascicule 1, ging over een andere groep korstmossen met of zonder de KUV reactie: het geslacht *Porpidia*. Hun resultaten geven aan dat er een deelgroep is van het geslacht *Porpidia* met een KUV reactie en een andere groep zonder (Uriac 2023). Ook dit was voor mij een interessante groep voor een experiment. Ik heb recent een inventarisatieproject

Foto 5:
Porpidia
cinereoatra
van Hune-
bed D41.



gedaan op de hunebedden in Drenthe. Van alle hunebedden zijn de soorten benoemd en geïnventariseerd. Dan kom je soms lastige exemplaren tegen, zoals het korstmos op Foto 5. Mijn eerste idee was dat het een *Lecidea* zou kunnen zijn, bijvoorbeeld *Lecidea plana*. Na microscopisch onderzoek bleek het een *Porpidia*, maar welke? Daarna de KUV test meerdere malen toegepast, steeds met hetzelfde resultaat, zie Figuur 2.

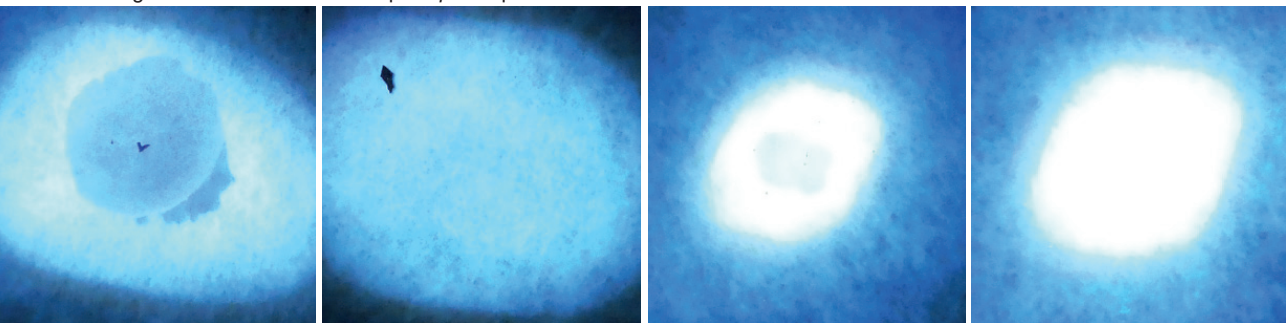
Het testspecimen heeft een duidelijke blauwe KUV spottest reactie, het geteste *Porpidia macrocarpa* specimen uit mijn herbarium geeft geen kleurverschil en is dus KUV-. Volgens het Franse artikel hebben drie soorten uit het geslacht *Porpidia* die in Nederland voorkomen een positieve KUV test: *Porpidia tuberculosa*, *Porpidia*

cinereoatra en *Porpidia contraponenda*. De overige soorten uit het geslacht *Porpidia* zijn KUV negatief, dus ook *Porpidia macrocarpa*. De soort in onderzoek bleek dus *Porpidia cinereoatra*. De meetresultaten uit het microscopisch onderzoek van het specimen komen overeen met de gegevens in de literatuur. Deze soort was tijdens de recente inventarisaties van de hunebedden nog niet eerder vastgesteld.

De chemie

Om de vraag te kunnen beantwoorden hoe deze spottest werkt in de bovengenoemde gevallen moeten we gaan kijken welke secundaire metabolieten in de genoemde soorten voorkomen. Er zijn veel verschillende metabolieten. In 1996

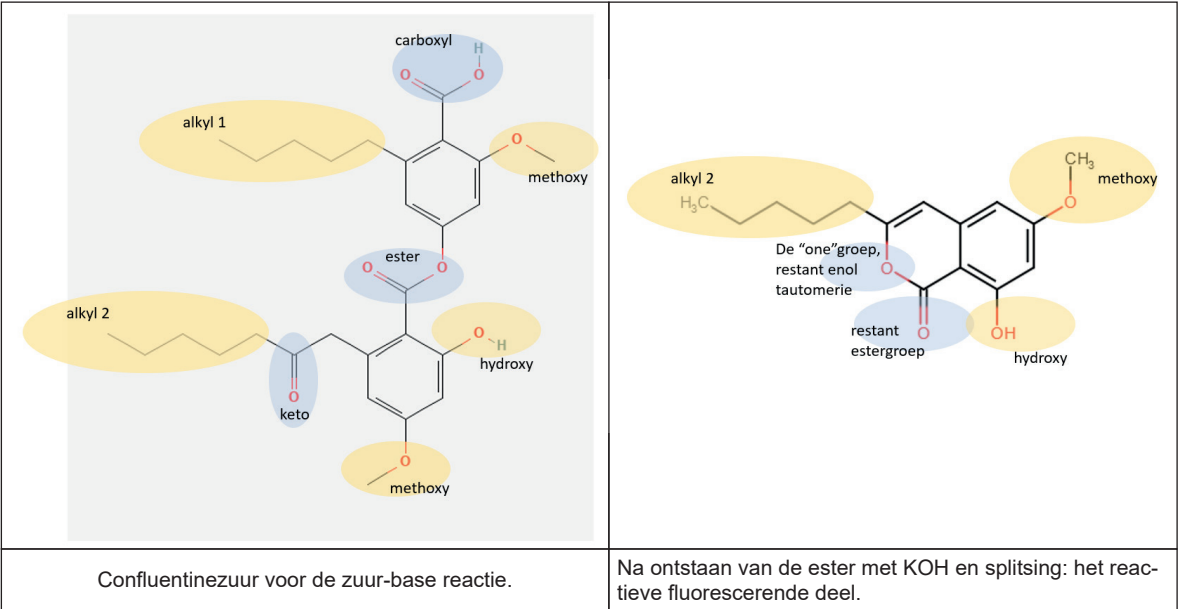
Figuur 2. KUV testresultaat op *Porpidia* spec.



Soort in onderzoek: links met K, rechts zonder.

Porpidia macrocarpa, links met K, rechts zonder.

Figuur 3. Confluentinezuur en het actieve fluorescerende reactieresultaat.



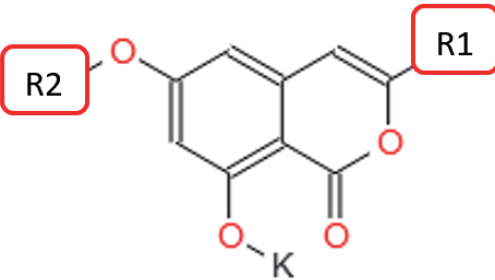
publiceerden Siegfried Huneck en Isao Yoshimura hun standaardwerk *Identification of Lichen Substances* (Huneck & Yoshimura 1996) waarin 700 verschillende secundaire metabolieten worden beschreven. Sindsdien zijn er nog veel meer metabolieten ontdekt. De metabolieten worden verdeeld in groepen aan de hand van hun specifieke onderdelen. Zo zijn er bijvoorbeeld suikers, alcoholen, aromatische verbindingen, zuren, basen etc.

Ik zal aan de hand van een voorbeeld van een metaboliet dat betrokken is bij de KUV reactie van de *Porpidia*'s schematisch uitleggen wat er gebeurt bij de KUV reactie. Het betreft confluentinezuur (Engels: confluentic acid), met de chemische formule $C_{28}H_{36}O_8$. De structuur is weergegeven in Figuur 3. Het metaboliet is opgebouwd uit twee benzeenringen verbonden via een estergroep, een ketogroep, twee alkylgroepen, twee methoxygroepen, een hydroxygroep en een carboxylgroep. De gelig gekleurde groepen maken geen deel uit van de reactie met KOH, de blauwe wel. De stof behoort tot de zuren en is een voorbeeld van een depside. De weergave in Figuur 3 maakt gebruik van een zogenaamde lijnstructuur, zie bijvoorbeeld Soderberg (2019). Een uitgebreide behandeling van het hieronder beschreven proces is beschreven in Ferron (2022).

Een zuur en een base samen vormen esters. Bij de estervorming tussen confluentinezuur en kaliumhydroxide (de K in de KUV test) gebeurt er van alles. De ketogroep gaat over in de enol-equivalent, verliest een H-ion aan de base onder vorming van water; het overgebleven O-atoom wordt verbonden met een C-atoom uit de estergroep waardoor een ringstructuur ontstaat, een zogenaamde 'one'-groep. Vervolgens breekt de estergroep zodat er twee delen overblijven, waarvan er één fluoresceert.

Het overblijvende fluorescerende deel kan in een algemenere vorm worden weergegeven (Figuur 4) waarbij R1 en R2 twee alkylgroepen zijn of een enkel H-atoom. In Tabel 1 worden reactieresultaten van andere metabolieten gepresenteerd

Figuur 4. Algemene vorm fluorescerend deel na reactie met KOH.



Tabel 1. Metabolieten met een KUV reactie.

metaboliet	R1	R2
<i>confluent acid</i>	C ₅ H ₁₁	CH ₃
<i>olivetoric acid</i>	C ₅ H ₁₁	H
<i>glomelliferic acid</i>	C ₃ H ₇	CH ₃
<i>glomellic acid</i>	C ₃ H ₇	CH ₃

(met Engelse benaming) met waarden voor R1 en R2. De vier genoemde metabolieten zijn allemaal depsides met een gekoppelde keto-alkyl groep. Glomellic acid heeft twee gekoppelde keto-alkyl groepen, glomelliferic acid heeft er één.

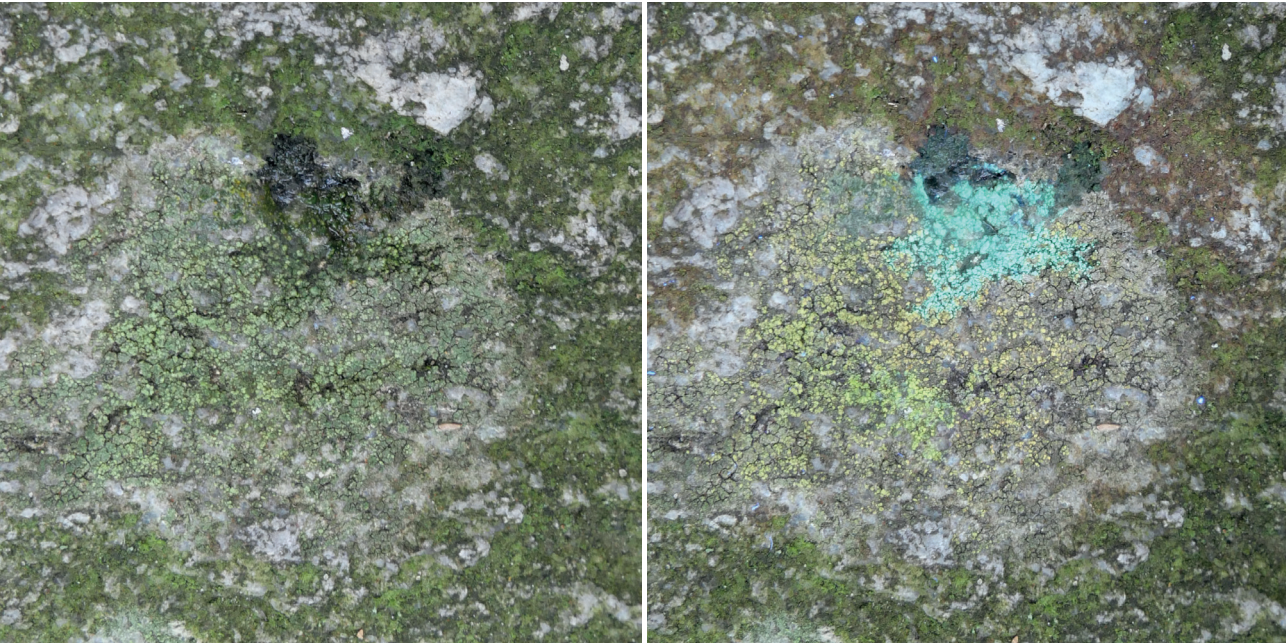
Work in progress

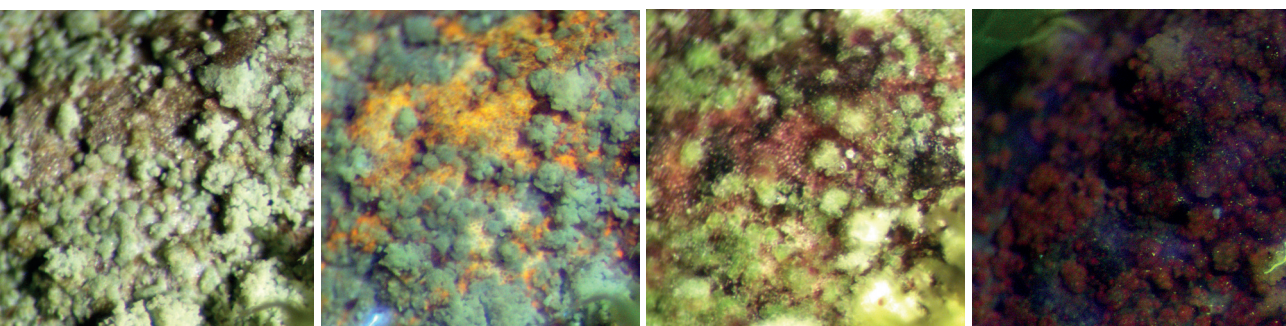
De positieve KUV reactie bij de steenschildmos- sen wordt veroorzaakt door zowel glomelliferic acid als glomellic acid. Olivetoric acid komt o.a. voor in *Pseudevernia furfuracea*. Bij mijn onder- zoek op de hunebedden heb ik van een aantal hunebedden materiaal verzameld van de steen- schildmossen, *Xanthoparmelia loxodes* cf. of de andere soort *Xanthoparmelia verruculifera* cf. Met behulp van de KUV test heb ik ze allemaal op naam kunnen brengen. Voor deze twee soorten is het een eenvoudig hulpmiddel, veel toegan- kelijker dan een TLC onderzoek. Ook voor het onderscheid tussen de twee groepen uit het ge-

slacht *Porpidia* is het een eenvoudig testmiddel. Ik heb me afgevraagd of er nog meer groepen metabolieten zijn die met KOH en UV licht een bijzondere kleurreactie geven. De eerste waar- neming hiervan vond plaats tijdens mijn inven- tarisatie op de hunebedden. Om een onderscheid te maken tussen een aantal lastige soorten heb ik veel gebruik gemaakt van de UV lamp in het veld. In een aantal gevallen heb ik op die soorten eerst een K spottest gedaan en vervolgens het UV onderzoek, met soms opmerkelijk resultaat.

In Figuur 5 is een voorbeeld van zo'n test weer- gegeven. Hunebed G01, steen A, een afgesloten exemplaar, K- maar met UV licht fel groenblauw oplichtend. De sorediën hebben een UV reactie zonder de K spottest, licht- tot donkergeel. Het thallus heeft geen UV reactie. De plek met K re- geert alleen op het UV licht in contact met het korstmos, de plek met alleen steen reageert niet. Ik heb de spottesten C en P in het veld niet uit- gevoerd. Het zou een afgesloten exemplaar van *Fuscidea praeruptorum* kunnen zijn. Deze soort is K- en heeft sorediën met een lichtgele UV re- actie en is eerder op deze steen waargenomen. Het metaboliet van deze soort, alectorialic acid, is ook een depside maar deze past niet goed in het bovengeschetste plaatje. Het mist een gekop- pelde keto-alkyl groep.

Figuur 5. Een KOH test in het veld. Links met een K spottest, rechts gevolgd door een UV belichting.





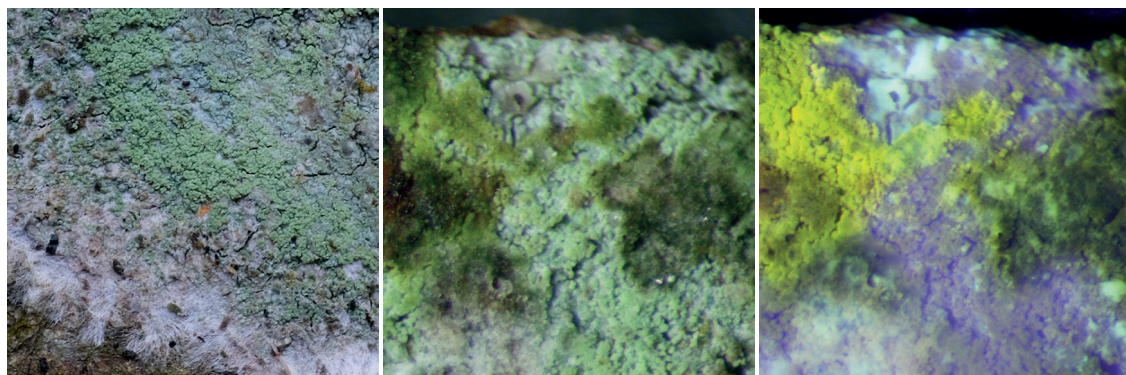
Figuur 6. *Trapeliopsis pseudogranulosa*. Links: een stukje onbehandeld thallus met sorediën. Midden links: hetzelfde stukje onbehandeld thallus in UV licht, delen van het thallus met een flauw oranje tint geven een sterke geeloranje UV reactie. Midden rechts: thallus met toegepaste K spottest in gewoon licht, de thallusdelen met een flauw oranje kleur hebben een rode K reactie. Rechts: dezelfde plek eerst met K behandeld en vervolgens UV licht. De sorediën kleuren diep rood.

Om te onderzoeken welke metabolieten een kleurreactie geven op een KUV test heb ik aantal experimenten thuis uitgevoerd op een aantal gedetermineerde specimen. Het eerste experiment betreft *Trapeliopsis pseudogranulosa* met o.a. de tridepside gyrophoric acid en een anthraquinone. Ook hier is het resultaat verrassend (zie Figuur 6).

Een volgend experiment is uitgevoerd op een specimen gedetermineerd als *Lecanora compallens* cf., met de volgende geobserveerde spot-testreacties: thallus K-, KC-, P-, UV- en sorediën K+gelig, C-,P-, UV+mauve. De metabolieten van *Lecanora compallens*: usnic acid en zeorin (zie Figuur 7). Usninezuur (usnic acid) is een stof met verschillende isomeren en behoort tot de bezofuranen, zeorin is een complex metaboliet, een hopanoid, een diol en een pentacyclische tri-terpenoid met formule $C_{30}H_{52}O_2$.

Discussie

Welke reacties er precies plaatsvinden tussen metabolieten en de base KOH is verre van duidelijk. Organische zuur-base reacties zijn erg complex en welke eindproducten ontstaan en welke fluorescentie-eigenschappen ze hebben is ook niet bekend. Dit vraagt meer studie en experimenten. Het proces van een KUV test is niet vergelijkbaar met het proces van TLC. Er wordt binnen het TLC-proces gebruikt gemaakt van oplosmiddelen, waaronder aceton, maar daarmee houdt de vergelijking dan ook op. Het TLC-proces is complex en gericht op de herkenning van individuele metabolieten waardoor het korstmos waarin de metabolieten zijn aangetroffen op naam gebracht kan worden (zie Orange 2010). Er zijn veel data beschikbaar over het gedrag van metabolieten in het TLC-proces, openbaar beschikbaar in databases, gepubliceerd in



Figuur 7. *Lecanora compallens* cf. Links: een fragment van het onbehandelde thallus, ter plekke op de boom. Midden: stukje thallus thuis onderzocht, met thallus K-, sorediën K+ gelig. Rechts: zelfde fragment na de K spottest belicht met UV, sorediën met K knalgeel in UV, overige sorediën hebben een mauve kleurreactie.

veel publicaties. Het TLC-proces omvat veel handelingen en de uitvoering vergt soms dagen. De KUV test is simpel, vergt slechts enkele handelingen en is binnen korte tijd uitvoerbaar.

Het doel van beide technieken is het op naam brengen van een specimen waarbij morfologische eigenschappen tekortschieten en de traditionele spottesten geen uitkomst bieden. Een alternatief is DNA/RNA-sequencing, maar deze techniek is (nog) kostbaar en slechts voor een enkeling bereikbaar. De toepasbaarheid van de twee processen KUV en TLC is niet vergelijkbaar. Voor een onbekend specimen kunnen in een TLC-proces de metabolieten benoemd worden die aanwezig zijn in het onderzochte specimen en dat kan leiden tot het op naam brengen van het onbekende korstmos. De KUV reactie is tot op heden alleen onderzocht voor een aantal depsides met een specifieke structuur. De toepassing van de KUV spottest is nu nog slechts zinnig in de context van de steenschildmossen en de soorten in het geslacht *Porpidia*.

Auteursgegevens

W.J. Toetenel, wjtoetenel@gmail.com

Literatuur

- Huneck, S., I. Yoshimura, Identification of Lichen Substances, 493 pp. Springer verlag ISBN-13:978-3-642-85245-9
- Soderberg, T. Organic chemistry with a biological emphasis, University of Minnesota Morris, 2019, [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic_Chemistry/Book%3A_Organic_Chemistry_with_a_Biological_Emphasis_v2.0_\(Soderberg\)](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic_Chemistry/Book%3A_Organic_Chemistry_with_a_Biological_Emphasis_v2.0_(Soderberg))
- Orange, A., P.W. James, F.J. White, Microchemical methods for the identification of Lichens, British Lichen Society, Second edition with additions, 2010, Reprinted 2013
- Uriac, P., Le genre *Porpidia* en France et ses métabolites secondaires, Bulletin d'informations de l'Association Française de Lichénologie, Volume 48-Fascicule 1, pp 35-44, 2023
- Hellou, S., P. Uriac, F. Le Dévehat, A. Sauvager, P. Jéhan, A. Zebboudj, J. Boustie, J. Esnault, 2019, A chemotaxonomic study of the *Xanthoparmelia pulla* group in Algeria. – *Herzogia* 32: 485 –502.
- Ferron S, P. Jéhan, X. Guillory, P. Uriac, Intramolecular transesterification of depsides yields fluorescent 1H-isochromen-1-ones: Application as a chemical probe for lichen determination. *Phytochemistry*, 2022, 198, pp. 113-139

Abstract

KUV spot test: work in progress...

To name a species using only field characteristics is hard for several groups of lichen, e.g. the lichen in the genus *Xanthoparmelia*, *Lepraria* etc. Sometimes a common used spot test will solve the problem, but in most cases TLC is required or even more specific advanced laboratory methods. This article addresses a new kind of spot test, the KUV test, that exists of a single spot test using potassium hydroxide (K) and long wave UV light. This method was proposed by a French-Algerian research group investigating the genus *Xanthoparmelia* in Algeria.

Another experiment was presented on the genus *Porpidia* in France. To examine the usefulness of the KUV probe, it is tested on two species of the genus *Xanthoparmelia* in the Netherlands and two species of *Porpidia*.

The KUV probe succeeds to distinguish between the different species. The KUV probe has up till now a limited scope of application. Several experiments on other species have shown that the KUV probe gives interesting results which are currently not well understood and need further research.