

WAARNEMINGEN MET HET POLARISATIEMICROSCOOP VAN MOSWEEFSELS

door E.C.H. Kolvoort

Microscopisch zichtbare celwandstructuur

Plantaardige celwanden zijn in het algemeen opgebouwd uit hoogmoleculaire stoffen afgescheiden door het protoplasma der levende cel. Deze stoffen worden in lagen afgezet en bestaan uit verschillende bestanddelen met verschillende fysische en chemische eigenschappen.

De eerste afscheiding tussen twee naburige plantencellen wordt gevormd door de middenlamel. Aan weerszijden wordt hiertegen eerst de primaire en eventueel later de secundaire wand aangelegd. De middenlamel kit dus schijnbaar de primaire wanden van twee naast elkaar liggende cellen aan.

De middenlamel is hoofdzakelijk opgebouwd uit pectineverbindingen van calcium en magnesium, is amorf en derhalve optisch isotroop.

De primaire wand bestaat hoofdzakelijk uit cellulose gemengd met pectineverbindingen en gewoonlijk nog polysacchariden en hemicellulosen. Verhouting, veel voorkomend bij de celwanden van hogere planten, is voor de mossen van geen belang.

De primaire wand is, dank zij de cellulose, die zich in de vorm van fibrillen heeft afgezet, optisch anisotroop, hetgeen van belang is voor de interpretatie van het beeld verkregen met het polarisatiemicroscop.

Nieuwe lagen kunnen op de primaire wand worden afgezet en deze enkel- of meervoudige lagen zijn rijk aan cellulose en sterk anisotroop.

Het gevolg van deze opbouw van celwanden is, dat ze zich, op hun kant bezien, microscopisch voordoen als dunne platen triplex, waarvan de middelste laag optisch isotroop en de beide buitenste lagen optisch anisotroop zijn. Bij zeer jonge cellen is de anisotrope primaire wand nog niet of nog niet in voldoende mate gevormd om waargenomen te kunnen worden.

Werking van het polarisatiemicroscop

Om de optische anisotropie waar te nemen maken we gebruik van een microscoop met polarisatieinrichting: een polarisator ergens in de stralengang onder het preparaat, meestal geplaatst onder de condensor, en een analysator ergens in de stralengang boven het preparaat, bij polarisatiemicroscopen geplaatst tussen objectief en oculair, bij normale microscopen als regel boven op het oculair. De meest perfecte polarisatie wordt verkregen door nicols, bestaande uit samengekitte kalkspaatprisma's, maar voor ons doel zijn polarisatiefilters, die in het belangrijkste deel van het zichtbare spectrum werkzaam zijn, voldoende.

Optisch worden aan de polarisator onder de condensor geen bijzonder hoge eisen gesteld. Een "glas" uit een Polaroid-zonnebril is hier al voldoende. Anders is het met de analysator, die zich in het beeldvormende deel van de stralengang bevindt. Hier dient, om vertekening van het beeld te voorkomen, bij voorkeur een volkomen planparallel polarisatie filter te worden gebruikt, zoals voor fotografie en microscopie in de handel wordt gebracht.

De polarisator zet het licht om in lineair gepolariseerd licht, dat slechts in één richting loodrecht op de optische as van het microscoop trilt. De analysator doet hetzelfde. Is de trillingsrichting hiervan dezelfde als die van de polarisator ("evenwijdige nicols"), dan gaat het door de polarisator gepolariseerde licht ongewijzigd door de analysator. Het beeldveld is licht.

Draaien we de analysator over een hoek van 90° ("gekreuste nicols"), dan wordt het gepolariseerde licht niet door de analysator doorgelaten en zien we in het microscoop de achtergrond donker, zwart bij kalkspaatnicols, zeer donker rood of blauw bij sommige polarisatiefilters.

Voor het door ons gestelde doel worden polarisator en analysator steeds gekruist gebruikt.

Brengen we een optisch anisotroop kristalpreparaat onder het polarisatiemicroscop, dan zal dit in het algemeen licht, wit of gekleurd, op donkere achtergrond verschijnen, doordat het anisotrope materiaal het gepolariseerde licht ontleedt in twee loodrecht op elkaar staande trillingen met verschillende voortplantingssnelheid, welke door de analysator weer tot

één resulterende trillingsrichting worden teruggebracht. Door het verschil in voortplantingssnelheid der beide componenten ontstaat interferentie. Het preparaat wordt daardoor in het algemeen licht tegen donkere achtergrond waargenomen.

Vallen de beide trillingsrichtingen van het anisotrope preparaat samen met die van polarisator en analysator, dan heeft geen oplichting plaats: het preparaat blijft donker. Vandaar, dat bij het onderzoek het preparaat (niet de analysator!) wordt gedraaid tot zijn trillingsrichtingen een hoek maken met die van polarisator en analysator. Onder een hoek van 45° is de oplichting het sterkst. Optisch isotrope stoffen blijven tussen gekruiste nicols onder alle omstandigheden donker.

In veel gevallen wordt het preparaat niet wit op donkere achtergrond, doch gekleurd. Het is hier niet de plaats dieper op deze interferentiekleuren in te gaan; leerboeken over kristaloptiek geven hierover alle inlichtingen.

Waarnemingen met het polarisatiemicroscop van mosweefsels

Na deze uiteenzetting, die slechts bedoeld is voor hen, die niet bekend zijn met de werking van het polarisatiemicroscop, volgt nu de toepassing op het onderzoek van weefselstructuren van mossen. We houden steeds de trillingsrichting van polarisator en analysator gekruist, verticaal en horizontaal in het beeldveld. Een vezel van een kunststof, die volkomen horizontaal of vertikaal in het beeldveld ligt, moet donker blijven.

Leggen we een blad van bij voorkeur een pleurocarp mos met gestrekte bladcellen, waarbij de verschijnselen het duidelijkst optreden, in de richting "zuidwest-noordoost" onder het microscop, dan zien we een lichtend celnet op donkere achtergrond. De celinhoud blijft donker. Bijzonder sterk licht de nerf op en dit is een heel goed middel om zwakke nerven duidelijk zichtbaar te maken en na te gaan, hoe ver deze doorloopt.

Ook een bladzoom, bestaande uit cellen met sterker ontwikkelde wanden, tekent zich duidelijk af. Dit is zeer dienstbaar bij het onderzoek van Bryum- en Mniumsoorten.

Bij bladen met sterk papilleuze cellen is het vaak moeilijk, de celbegrenzing waar te nemen. In gepolariseerd licht

zijn deze goed zichtbaar te maken, daar de papilleuze oppervlakte niet oplicht en dus niet stoort (mits men het diafragma onder de condensor niet te ver dicht draait).

Bij sterke vergroting zien we de celwanden als tweelich-
tende lijnen, gescheiden door een donkere. Dit zijn de pri-
maire celwanden, gescheiden door de isotrope middenlamel.

Alle scheidingswanden lichten op, tenzij ze toevallig ver-
tikaal of horizontaal in het beeldveld liggen. Door draaien
van het preparaat lichten ook deze op. Maar niet alleen de
scheidingswanden, ook de dorsale en ventrale buitenwanden,
evenwijdig aan het voorwerpglas liggend, kunnen zwak oplich-
ten tengevolge van optische anisotropie. Hierop komen we hier-
onder terug.

Cellulose is optisch anisotroop, doch niet kristallijn.

Optische anisotropie is in het algemeen het gevolg van
een bepaalde ruimtelijke ordening van atomen en moleculen, zo-
als we die in kristallen aantreffen. De vraag rijst: Waardoor
zijn cellulosewanden optisch anisotroop, terwijl ze toch geen
kristalstructuren zijn?

Cellulose wordt in bundels moleculen, in fibrillen, te-
gen de wand afgezet. Loodrecht op de wand gezien vormen de-
ze fibrillen een regelloos netwerk in een plat vlak. De fi-
brillen afzonderlijk vertonen de optische anisotropie eigen
aan bundels evenwijdig gerichte colloïdale langgestrekte deel-
tjes. Als geen enkele richting dezer fibrillen in het vilt-
patroon overheerst gedraagt het geheel zich als isotroop: de
wand blijft donker. Heeft tussen gekruiste nicols oplichting
plaats, dan is er een overheersende richting in het fibril-
lenpatroon.

Toepassing van hulpplaatjes

Welke richting overheerst is zonder meer met gekruiste
nicols alleen niet uit te maken. Daartoe maken we gebruik van
een hulpplaatje, een dun splijtplaatje van gipskristal, waar-
van de beide trillingsrichtingen en de daarbij behorende bre-
kingsindices bekend zijn. Dit wordt door de fabrikant op het
hulpplaatje aangegeven.

Onder 45° ergens tussen polarisator en analysator ge-

bracht krijgt de oorspronkelijke achtergrond de interferentiekleur rood. Deze plaatjes zijn bekend als gipsplaatje rood 1^e orde.

Wordt bovendien een preparaat onder het microscoop gebracht, dan zal het preparaat blauw worden, als een geringe verhoging van het gangverschil der beide trillingen optreedt, in het tegengestelde geval geel.

In het nu volgende nemen we aan, dat het hulpplaatje steeds zodanig wordt aangebracht, dat de trillingsrichting met de hoogste brekingsindex in de richting "zuidwest-noordoost" ligt. Een kunstvezel ook in deze richting gelegd moet dan blauw op rode achtergrond verschijnen.

Celwanden loodrecht op het beeldvlak

Leggen we nu een mosblad ook in de richting zw-no, dan zullen alle primaire wanden in die richting lopend blauw (additiekleur) worden, terwijl de nw-zo lopende primaire wanden geel (substractiekleur) zijn. Dit geldt voorlopig in dit artikel voor scheidingswanden, die loodrecht op het beeldvlak staan. De isotrope middenlamel neemt de kleur van de achtergrond aan, dus rood.

Bepalen we ons tot zw-no lopende scheidingswanden. Hierin liggen de cellulosefibrillen ongeordend in een plat vlak. Geen der fibrillen zullen nw-zo lopen, dus de gele substractiekleur zal niet optreden. Wel lopen de fibrillen evenwijdig aan het voorwerpglas, ook loodrecht erop en in alle tussenliggende standen. De resultante van al deze optisch werkzame richtingen is een zw-no richting, met als gevolg de additieve interferentiekleur blauw.

We kunnen voor deze vertikaal op het beeldveld staande wanden niet uitmaken of er voor de fibrillen een voorkeursrichting bestaat. Wel kan dat voor celwanden welke evenwijdig aan het voorwerpglas gelegen zijn.

Celwanden evenwijdig aan het beeldveld.

Het best is dit weer waar te nemen bij een pleurocarpmos. Is het bladgroen hinderlijk voor de kleurbepaling, dan wordt dit met een druppel bleekwater verwijderd. Het blad wordt weer zw-no gericht.

Het blijkt dan, dat de dorsale en ventrale celwanden alle blauw zijn met uitzondering van een of enkele celreeksen aan de bladbasis en in de bladoortjes, welke geel zijn (steeds de lengterichting van de cel zw-no richten en het blad zonedig iets draaien).

De conclusie is, dat de cellulosefibrillen in de dorsale en ventrale celwanden van pleurocarpe mossen overwegend in de lengterichting van het blad en van de cel zijn gericht, doch die der basis en der bladhoekcellen zijn overwegend dwars op de lengterichting van het blad georiënteerd. Bij pleurocarpe mossen is de grens tussen beide oriëntatierichtingen in het algemeen zeer scherp.

Veel minder uitgesproken zijn deze verschijnselen bij de bladcellen van acrocarpe mossen en van pleurocarpe mossen met isodiametrische cellen, terwijl de buitenwanden van de bladcellen van levermossen niet of nauwelijks waarneembaar anisotroop zijn.

Wat de voorkeursrichting der fibrillen in de scheidingswanden betreft geeft deze waarneming geen uitkomst. Daartoe zijn lengtecoupes van het blad nodig, die ons in staat stellen, loodrecht op deze tussenwanden te kijken.

Voor zeer zwakke dubbelbreking kan ook de toepassing van een $\frac{1}{4}\lambda$ glimmerplaatje dienst doen. Onder 45° ingebracht wordt het beeldveld grijs. Heeft additie plaats, dan worden de celwanden lichter dan de achtergrond, subtractie maakt ze donkerder. Onder dezelfde omstandigheden komt blauw bij het gipsplaatje dus overeen met een lichter zijn dan de achtergrond bij toepassing van een glimmerplaatje.

Deze methode voldoet zeer goed en is vooral geschikt voor zwart-wit fotomicrografie. Ze moet echter alleen voor zéér zwakke dubbelbreking worden toegepast om een foutieve interpretatie te voorkomen.

We hebben door deze methode dus een middel om voor celwanden, liggende evenwijdig aan het beeldvlak, d.i. evenwijdig aan het voorwerpglas, uit te maken, of er een overheersende richting is voor de cellulosefibrillen, en zo ja, welke.

In onderstaand schema wordt een overzicht gegeven, hetwelk alleen geldt, indien de hulpplaatjes op de beschreven wijze zijn aangebracht:

ligging der fibrillen	/////	\\\\\\	achtergrond
gipsplaatje rood 1e orde glimmerplaatje $\frac{1}{4} \lambda$ beïnvloeding	blauw lichter additie	geel donkerder substractie	rood grijs

Diverse waarnemingen

In peristoomtanden is de overheersende richting evenwijdig aan de lengterichting der tanden. Bij dit onderzoek moet rekening gehouden worden met de invloed van de dwarswanden op de tanden, die een substractiekleur geven, hetgeen wanneer ze dicht opeen liggen, tot foutieve conclusies kan leiden.

De lichte zoom langs de buitenste peristoomtanden, zoals b.v. bij Ceratodon voorkomt, vertoont in zw-no richting echter een substractiekleur, d.i. de overheersende richting der cellulosefibrillen staat loodrecht op die der peristoomtanden. Met een glimmerplaatje zijn de peristoomtanden oranjegeel (eigen kleur) met donkere zomen.

De buitenwanden van de cellen van de kapselwand van Ceratodon hebben dezelfde fibrillenorientatie als die van de zomen der peristoomtanden, dus loodrecht op de lengterichting van het kapsel, voor dát deel, dat later de bolle plooi vormt van het gevoorde rijpe kapsel. Voor de dieper liggende groeven zijn de fibrillen evenwijdig aan de lengterichting van het kapsel georiënteerd.

Overeenkomstige waarnemingen werden gedaan bij kapsels van Ulota en Orthotrichum. Opgemerkt moet nog worden, dat toepassing van gepolariseerd licht ook nuttig is voor het zoeken van stomata in kapsels; ze lichten door de aanwezigheid van iets sterker ontwikkelde celwanden sterker op dan die van het omringende weefsel.

Andere waarnemingen zijn: in het algemeen vertonen de cellen van acrocarpe mossen weinig sterke dubbelbreking. Orthodontium heeft echter cellen, die wat sterkte van dubbelbreking betreft overeen komen met pleurocarpe mossen met gestrekte cellen.

Bij Plagiothecium is de fibrillenorientatie in de blad-

cellen normaal evenwijdig aan de lengte van het blad, doch de basiscellen en de aflopende band hebben de fibrillen overheersend dwars op de lengterichting der cellengeoriënteerd.

Uit het bovenstaande onderzoek blijkt, dat in het algemeen bij lang gestrekte cellen de overheersende oriëntatie der cellulosefibrillen evenwijdig aan de lengterichting der cel is met uitzondering van een of meer rijen basiscellen, hoekcellen, aflopende bandcellen.

Bij droogte gegroefde kapsels vertonen soms afwisselende banen van cellen met overheersende fibrillenrichting evenwijdig aan en loodrecht op de lengterichting van het kapsel.

Daar de afzetting van de cellulosefibrillen een groei-proces van de cel is, moet de interpretatie der waargenomen verschijnselen gezocht worden in de wijze, waarop de betreffende celwanden zijn ontstaan en gegroeid.

Afgezien daarvan heeft de toepassing van gepolariseerd licht, ook zonder hulpplaatjes, vooral haar nut bij het vaststellen van het verloop van de bladnerf, het waarnemen van de bladzomen, hoekcellen, stomata en celbegrenzungen bij sterk papilleuze bladen.

Summary

For those not familiar with the use of a polarising microscope a concise instruction is given.

Cellulose is deposited on the cell walls as a network of fibrils. It has been shown by the use of polarised light that a prevailing orientation of these fibrils consists, particularly in elongated cells. As a rule the prevailing orientation is parallel to the length of the cell, but one or a few rows of basal cells and the alar cells show a different pattern. The same holds for the decurrent bands of *Plagiothecium* leaves and the small margin on the outer peristome teeth of *Ceratodon* a.o.

The advantages of the application of polarised light in the examination of moss tissues are summarised.