

# Einfache Simultanfärbung botanischer Präparate

Geschichte  
Grundlagen  
Methode

## Workshop Simultanfärbung

Mikroskop-Seminar für Lehrer Bonn, 12.05.2011

# Geschichte

- 1714 Leeuwenhoek: Safran in Branntwein
- 1778 Freiherr von Gleichen-Russworm: Karminfiltration bei Infusorien
- 18. Jahrhundert Injektionsfärbungen
- 1825 Raspail: Jodlösung
- 1858 Joseph von Gerlach: Karminfärbung
- 1863 Waldeyer-Hartz: Hämatoxylin, Anilinfarben Rosanilin, Anilinviolett, Anilinblau
- 1867 Frey: Fuchsin, Indigokarmin

# Grundlagen

Mechanismus der Farbstoffanbindung an Gewebe  
ist verschiedenartig

- Elektrostatische Anbindung
- Chemische Anbindung
  - Komplexbildung
  - Löslichkeit
  - Teilchengröße

Rezepturen sind empirisch entwickelt.

# Grundlagen

- primäre Farbstoffe oder natürliche Farbstoffe sind von Natur aus in den Zellen enthalten (Chlorophyll, Hämoglobin, Anthocyane, ...)
- sekundäre Farbstoffe werden dem Objekt künstlich durch Färbung zugeführt.
- Vergleichbarkeit der Färberesultate hängt ab von Fixierung (Art, Dauer, Sorgfalt), Gewebestruktur, Veränderung von Farblösungen, Färbeprozess (Temperatur, Zeit, Verdünnung)

# Grundlagen

Substantive (direkte) Färbung – Farbstoffe binden direkt, ohne Vorbehandlung.

Additive (indirekte) Färbung – Farbstoffe färben erst nach Vorbehandlung, dem Beizen.

Gefärbt wird in wässriger oder alkoholischer Lösung, vereinzelt auch in Xylol o.ä.

Simultanfärbung (verschiedene Farbstoffe in einer Lösung)

sukzedane Färbung (verschiedene Farblösung nacheinander)

# Methoden

- progressive Färbung – kontinuierliche Färbung bis zum gewünschten Ergebnis
- regressive Färbung – Überfärbung, danach Farbüberschuss auswaschen (differenzieren)
- Farbstoffverteilung ist abhängig von Gewebestrukturen

# Methoden

Schnitt-, Objekt- oder Injektionsfärbung

Einfachfärbung – das Objekt wird mit einer Farblösung gefärbt

Mehrfachfärbung – das Objekt wird mit zwei oder mehr Farbstoffen gefärbt (Doppelfärbung, Dreifachfärbung)

# Beispiele für botanische Färbungen

- Einfachfärbung:  
mit Methyleneblau, Karmin oder Toluidinblau
- Zweifachfärbung:  
Anilinblau-Fuchsin, Astrablau-Safranin, Hämatoxylin-Chrysoidin
- Dreifachfärbung:  
Wacker-Färbung (Acridinrot, Acriflavin, Astrablau)  
Dujardin-Färbung (Astrablau, Acridinrot, Chrysoidin)
- Simultanfärbung:  
Etzold's Farbgemisch (FCA = Fuchsin, Chrysoidin, Astrablau)

# Literatur

- Gerlach, Dieter: Botanische Mikrotechnik
- Gerlach, Dieter: Geschichte der Mikroskopie
- Schömmmer, Franz: Kryptogamen-Praktikum
- Kremer, Bruno P.: Das große Kosmos-Buch der Mikroskopie
- Schlüter, Werner: Mikroskopie
- Schneider-Zimmermann: Botanische Mikrotechnik

# Literatur

- Braune/Lemann/Taubert:  
Pflanzenanatomisches Praktikum
- Henkel, Klaus: Mikrofibel  
([www.mikroskopie-muenchen.de/mikrofibel.pdf](http://www.mikroskopie-muenchen.de/mikrofibel.pdf) )
  
- Zeitschriften:
- Bryologische Rundbriefe
- Mikrokosmos

# Simultanfärbung mit Etzold FCA

- Objekt: *Lavandula angustifolia*, Blütenstängel
- Fixierung: Stückfixierung in AFE (90:5:5 = Ethanol 90%, Formalin 37%, Essigsäure 100%)
- Auswaschen und Aufbewahren: mit/in Ethanol 70%.
- Schneiden: Objektstück mit Sekundenkleber auf Holzklötzchen geklebt, Schlittenmikrotom, extrem schräg gestelltes C-Messer.
- Schnittdicke: 60 µm.
- Schnitte aufbewahren: in Ethanol 70%.

# Etzold's Farbgemisch – eine Simultanfärbung

- Etzold FSA (Fuchsin, Safranin, Astrablau)
- Etzold FCA (Fuchsin, Chrysoidin, Astrablau)
- Etzold grün (Fuchsin, Chrysoidin, Alciangrün)

in wässriger Lösung

# Ablauf

- Schnitte aus 70 % Ethanol über Alkoholstufen abnehmender Konzentration in Wasser überführen.
- Simultanfärbung in wässriger Farblösung.
- Entwässern in 100% Isopropylalkohol.
- Einschließen in Euparal.

# Ablaufplan

- Benötigte Reagenzien: Wasser entmin., Ethanol 30% und 50%, Isopropylalkohol 100%, Etzold FCA oder Etzold grün, Euparal.
- Schnitte aus 70% Ethanol:
  - 1. Ethanol (50 %) 2 Minuten
  - 2. Ethanol (30%) 2 Minuten
  - 3. Wasser, 3x wechseln 3 Minuten
  - 4. Etzold Farblösung (Etzold FSA, Etzold grün) 5 bis 10 Minuten
  - 5. Wasser, 3x wechseln 2 Minuten
  - 6. Isopropylalkohol (100%) 30 Sekunden
  - 7. Isopropylalkohol (100%) 1 Minute
  - 8. Isopropylalkohol (100%) 3 Minuten
  - 9. Euparal

# Ergebnis Etzoldfärbung (FCA)

- Verholzte Zellwände in verschiedenen Rottönen: Sklerenchym purpurrot, Xylem ziegel- bis gelbrot, Steinzellen orange, Schichten einer Zellwand in verschiedenem rot bis orange, Markstrahlzellen mehr gelbrot.
- Cutinisierte Zellwände gelb bis orange (Chrysoidin wird aber nicht leicht aufgenommen)
- Unverholzte und nicht cutinisierte Zellwände blau

# Ergebnis Etzoldfärbung (FCA)

- Kallose und Reservezellwände in Samen ungefärbt, selten bleiben auch die Zellwände gewisser Fasern in der primären Rinde ungefärbt.
- Korkschichten bleiben ungefärbt. Dagegen Mittellamellen verkorkter Zellen oft rot, da verholzt.
- Plasma leicht rot.
- Zellkerne rot oder blau.
- Chloroplasten oliv bis braun

# Empfehlung

- Mikrolaborbuch für Arbeitsprotokolle
- Sammelbuch für Objekte (Funddatum, Art- und Familienname, Standort mit Koordinaten, Verarbeitungshinweise)
- Präparateliste (Ild.Nummer, Datum, Artnamen, Objektbezeichnung, Schnitt, Schnittdicke, Fixierung, Färbung, Einschlusmittel, Einbettung, Referenz zum Sammelbuch)