Spross & Blatt der Strauchpappel im mikroskopischen Präparat

Jörg Weiß

Inhalt

- Organisatorisches
- Ausgangsmaterial
- Präparationstechniken
  - *Probennahme*
  - Schneiden
  - Fixieren
  - Färben
  - Einschließen
- Anatomie
- Literatur und Links

Organisatorisches

- Vorstellung
- Arbeitszeit und Pausen
- Arbeitsmittel
- Ablauf des Workshops
- Sicherheit

Sicherheit

- Im Umgang mit einigen der verwendeten Stoffe sind Sicherheitsregeln zu beachten:
- Ethanol 70%, leicht entzündlich, F
- Isopropanol 100%, leicht entzündlich, reizend, Xi
- Formalin 35%, giftig, T
  Bestandteil des AFE
- Essigsäure, ätzend, C
  Bestandteil des AFE

- Aber auch Werkzeuge können tückisch sein:
  - Deckglasbruch im Finger ist sehr unangenehm

Ausgangsmaterial

- **Strauchpappel (*Lavatera x olbia Barnsley*)**
- Südeuropa / Nordafrika
- Kultivierte Zierpflanze
- Mehrjähriger Strauch
- Blüte ursprünglich rosa mit purpurfarbenen Adern
- Oft mit den Malven verwechselt

Ausgangsmaterial

MKB Schneiden, Färben, Legen 2017:
Spross & Blatt der Strauchpappel
im mikroskopischen Präparat

Ausgangsmaterial

MKB Schneiden, Färben, Legen 2017:
Spross & Blatt der Strauchpappel
im mikroskopischen Präparat

Präparationstechniken

- **Ziele der Präparation:**
- Weitestgehende Erhaltung der Gewebe
- Vermeidung von Artefakten
- Darstellung der Anatomie der Probe
- Unterscheidbarkeit der einzelnen Gewebearten
- Nachvollziehbarkeit der Ergebnisse

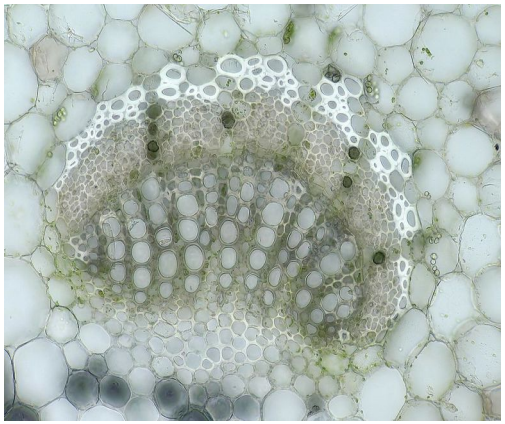
Präparationstechniken / Probenahme

- Frisches Material ohne Verletzungen
- Ausnahme: Dokumentation von Schädlingsbefall (z.B. Pilze)
- Keine geschützten Arten, nicht in Naturschutzgebieten
- Keine unnötigen Zerstörungen im Umfeld
- Scharfe Werkzeuge (Skalpell, Schere)
- Sofort schneiden oder fixieren

MKB Schneiden, Färben, Legen 2017:
Spross & Blatt der Strauchpappel
im mikroskopischen Präparat

Präparationstechniken / Schneiden

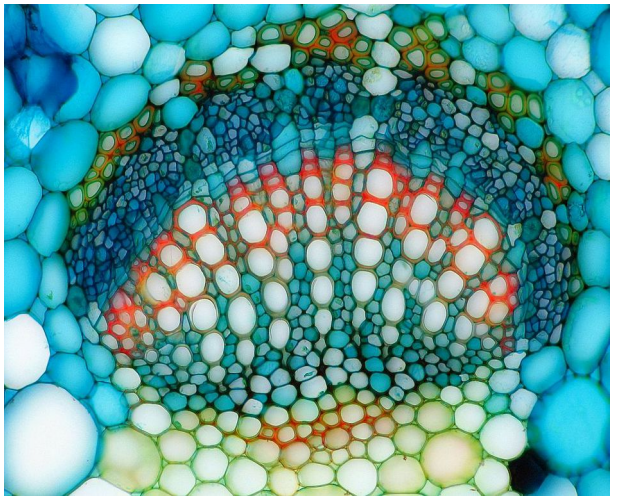
- Unterschiedliche Schnitttechniken
  - Freihandschnitt mit Umschließung (Holundermark, Möhre)
  - Handschnitt mit dem Zylindermikrotom
  - Rotations- und Schlittenmikrotome
- Schnittdicken ab 100 µm
  - Freihandschnitt 100 – 50 µm, eventuell auskeilend
  - Zylindermikrotom, Kastenmikrotom 50 – 20 µm
  - Rotationsmikrotome bis unter 2 µm



- Wir schneiden mit dem Zylindermikrotom und dem Kastenmikrotom (mit 40 bis 50 µm Schnittdicke)
- Quasi alle grundlegenden Erkenntnisse zur Pflanzenanatomie wurden im 19. Jahrhundert anhand von Handschnitten gewonnen (z.B. Haberlandt, Strasburger)

Präparationstechniken / Fixierung

- Die Fixierung erhält die Gewebestrukturen
  - Unterbrechung der Stoffwechselaktivitäten
  - Abtötung von Mikroorganismen
  - Vermeidung von Gewebeschrumpfung
- Botanische Fixierlösungen:
  - Ethanol 70% (starke Entwässerung)
  - AFE (Ethanol 70%, Formalin 35%, konz. Essigsäure im Volumenverhältnis 90:5:5)
- Schnittfixierung für ca. 20 Minuten
- Oder: Probenlänge 8 bis 15 mm, saubere Schnitte; Aufbewahrung in Filmdöschen; 2 Tage Minimum, ggf. wechseln, anschließend Lagerung in Ethanol 70%

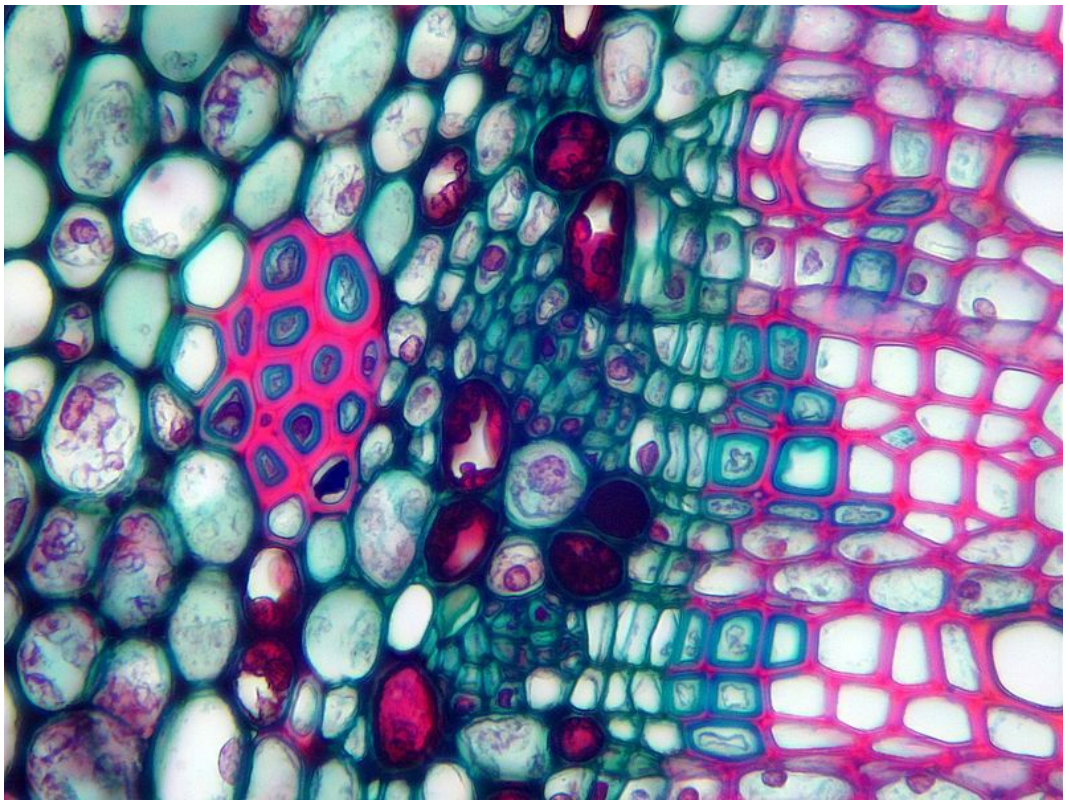


Präparationstechniken / Färben

- Anfärbung der Schnitte
- Wozu färben?
  - Die Färbung soll die einzelnen Gewebearten des Präparates deutlich differenziert anfärben
  - So lässt sich der Aufbau des Präparates erkennen (Anatomie)
- Zwei Färbungen im Workshop
  - Etzold grün nach Brügmann
  - W3Asim II nach Rolf-Dieter Müller auf Basis der Wacker W3A Färbung
- Die Bearbeitung der Schnitte erfolgt anhand der Arbeitsblätter zu den Färbungen (werden ausgegeben)
- Die Präparate bleiben im Uhrglas
- Die Reagenzien werden mit der Pipette zugegeben und abgesaugt (eventuell ausziehen)

Präparationstechniken / Färben

- Etzold grün nach Brügmann
  - Eine einstufige Färbung mit einem Farbgemisch aus 3 Farbstoffen
  - Chrysoidin, Fuchsin, Acliangrün
  - Besonders geeignet für dickere Handschnitte



MKB Schneiden, Färben, Legen 2017:
Spross & Blatt der Strauchpappel
im mikroskopischen Präparat

Etzold-grün Färbung nach Brügmann, Einschluss in Eukitt

Reagenzien:
Wasser entmin.,
70% Ethanol,

Etzold grün Lösung
(Chrysoidin, Fuchsin, Alciangrün - eine Mischung aus Alciangelb und Alcianblau),

100% Isopropylalkohol,

Euparal

eventuell alternativ:
Etzold FCA

Bezug:
Farbstoffe von WALDECK GmbH & Co Division Chroma.

Literatur:
http://www.mikroskopie.de/mikforum/read.php?2,46158,46158#msg-46158

Schnitte in 70% Ethanol.

Ausgangsmaterial fixierte Schnitte in Ethanol 70%

Färben mit

- Etzold grün Gemisch (7 - 10 Minuten)

Schnitte verbleiben im Uhrglas, Reagenzien werden mit der Pipette abgesaugt und zugegeben.

Tipp:
Einmaliges Erhitzen bis zum Dampfen (achtung, keine Blasen!) führt zu einer sehr intensiven Anfärbung der Cuticula durch das Chrysoidin.

In Wasser entmin. auswaschen, 2x wechseln, je 1 Minute.

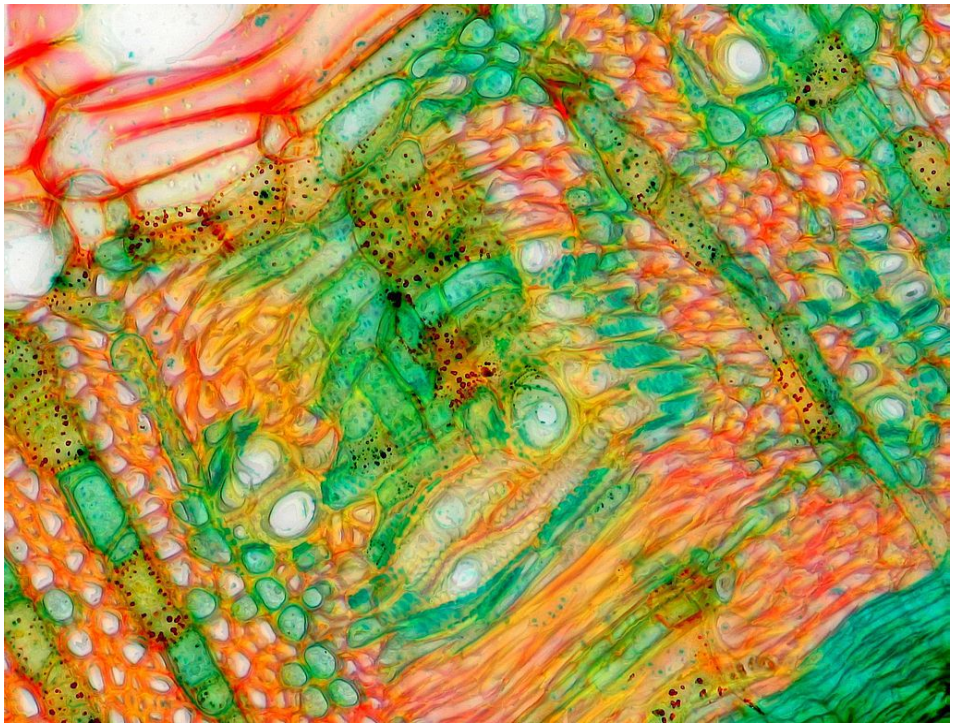
In 100% Isopropylalkohol, sorgfältig entwässern, 3x wechseln
1. Stufe: sofort absaugen
2.Stufe = 30 Sekunden,
3.Stufe = 3 Minuten,
4.Stufe = 5 Minuten.

Tipp:
Schnelles Entwässern erhält die Rotfärbung, die sonst ausgespült wird.
Daher Wasser gut absaugen, viel Isopropanol hinzugeben und sofort absaugen, dann weiter wie beschrieben.

Einschließen in Euparal

Präparationstechniken / Färben

- W3Asim II nach Rolf-Dieter Müller
  - Eine einstufige Färbung mit einem Farbgemisch aus 3 Farbstoffen
  - Acridinrot, Acriflavin, Alcianblau
  - Entwickelt für botanische Hand- und Dünnschnitte
  - Einfache Verarbeitung und gute Differenzierung



MKB Schneiden, Färben, Legen 2017:
Spross & Blatt der Strauchpappel
im mikroskopischen Präparat

Wacker-Färbung, Einschluss in Eukitt

Reagenzien:
Wasser entmin.,
70% Ethanol,

W3Asim II Lösung
(Acriflavin, Acridinrot, Alcianblau)

100% Isopropylalkohol,

Euparal

eventuell alternativ:
-/-

Bezug:
Farbstoffe von WALDECK GmbH & Co
Division Chroma.

Literatur:
„Wacker für alle – neue Simultanfärbungen auf der Basis der W3A Färbung von Robin Wacker“
Rolf-Dieter Müller und Jörg Weiß; MKB;
www.mikroskopie-bonn.de

Schnitte in 70% Ethanol.

Ausgangsmaterial fixierte Schnitte in Ethanol 70%

Färben mit

- **W3Asim II Gemisch**
  ca. 8 Minuten
- Ggf. mit einmaligem Erhitzen bis kurz vor dem Sieden

Schnitte verbleiben im Uhrglas, Reagenzien werden mit der Pipette abgesaugt und zugegeben.

Tipp:
Durch das Erwärmen ziehen die Farbstoffe oft etwas besser auf und ergeben so intensivere Farben insbesondere bei der Cuticula.

In Wasser entmin. auswaschen, 2x wechseln, je 1 Minute.

In 100% Isopropylalkohol, sorgfältig entwässern, 3x wechseln
1. Stufe: sofort absaugen
2.Stufe = 30 Sekunden,
3.Stufe = 3 Minuten,
4.Stufe = 5 Minuten.

Tipp:
Schnelles Entwässern erhält die Rotfärbung, die sonst ausgespült wird.
Daher Wasser gut absaugen, viel Isopropanol hinzugeben und sofort absaugen, dann weiter wie beschrieben.

Einschließen in Euparal

Präparationstechniken / Einschließen

- Zur Erstellung eines Dauerpräparates müssen die gefärbten Schnitte eingeschlossen werden
- Dazu wird der Schnitt auf einem Objektträger mit dem Einschlussmittel betropft und ein Deckglas aufgelegt
- Haltbarkeit einige 10 Jahre, hauptsächlich abhängig vom Wasseranteil
- Einschlussmittel für botanische Präparate
  - Euparal
    Intermedium Isopropanol, leuchtende Farben, Eigenfluoreszenz, Trockenzeit 7 Tage
  - Malinol
    Intermedium Xylol, keine Eigenfluoreszenz, Trockenzeit 7 Tage
  - Eukitt
    Intermedium Xylol, keine Eigenfluoreszenz, Trockenzeit 2 Stunden

Präparationstechniken / Einschließen

- Vor dem Einschließen müssen die Schnitte gut mit Isopropanol entwässert werden, siehe Arbeitsanleitung auf den Arbeitsblättern.
- Wir verwenden Euparal, die langen Trocknungszeiten wird durch Isopropanol als Intermedium und vor allem den günstigen Brechungsindex wieder wett gemacht.
- Objektträger und Deckglas müssen sauber sein. Mit Spiritus abreiben.
- Die Schablonen auf den Arbeitsblättern erlauben eine genaue Ausrichtung von Probe und Deckglas

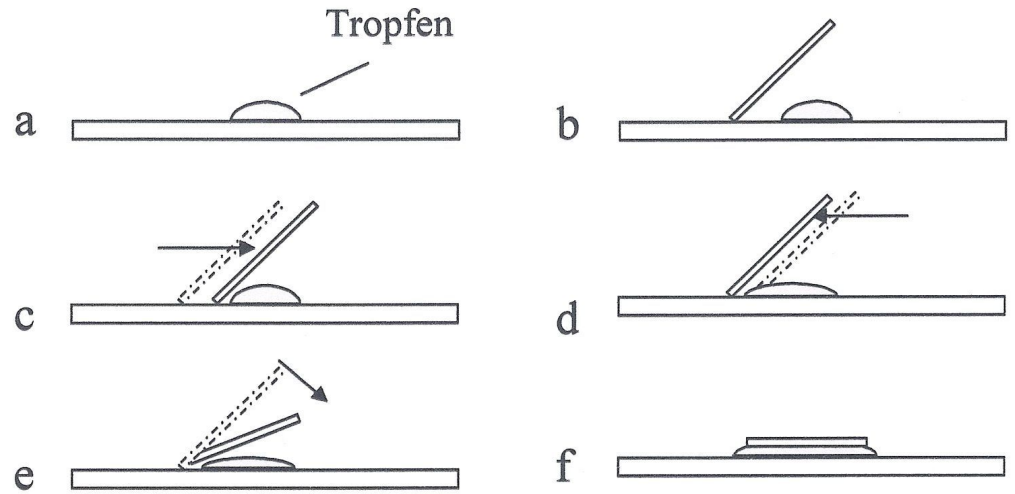
Präparationstechniken / Einschließen

- Schnitt mit dem Pinsel isopropanolfeucht auf den Objektträger geben
- Mit zwei Tropfen Euparal bedecken (aus geringer Höhe auftropfen, Tropfflasche oder Glasstab/Schaschlikspieß)
- Deckglas mit Flachpinzette aufnehmen
- Unterstützt durch die geöffnete Spitzpinzette gemäß der Markierung auf der Schablone ansetzen
- Langsam absenken, Blasenbildung vermeiden
- „Anziehen lassen“ - das Euparal verteilt sich unter dem Deckglas
- Vorsichtig mit dem Ende des Pinselstiels andrücken
- Präparat markieren (Name und Nummer, Liste der Nummern mit Beschreibung führen)

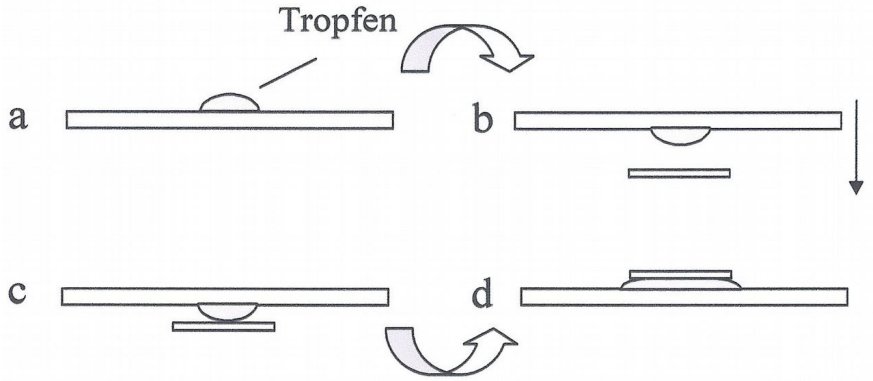
Präparationstechniken / Einschließen

- Illustrationen zum Auflegen des Deckglases

Decklas auflegen nach der herkömmlichen Methode



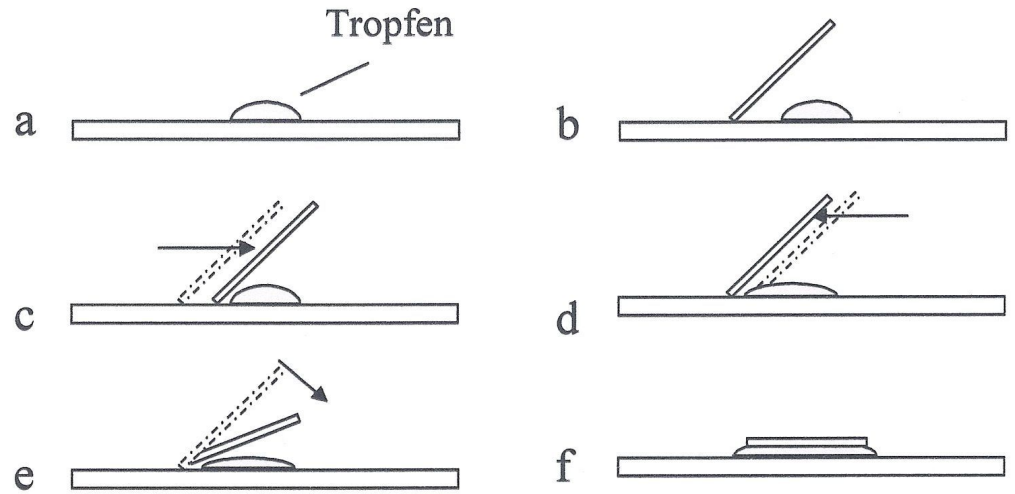
Deckglas auflegen nach der "Wacker" Methode



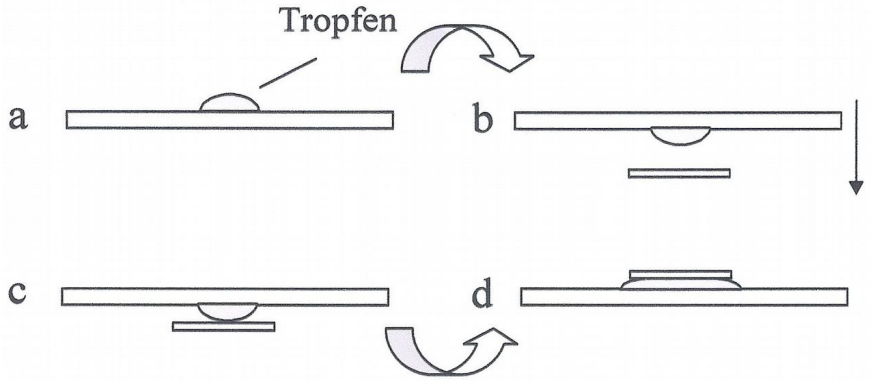
Präparationstechniken / Einschließen

- Illustrationen zum Auflegen des Deckglases

Decklas auflegen nach der herkömmlichen Methode



Deckglas auflegen nach der "Wacker" Methode



Präparationstechniken / Einschließen

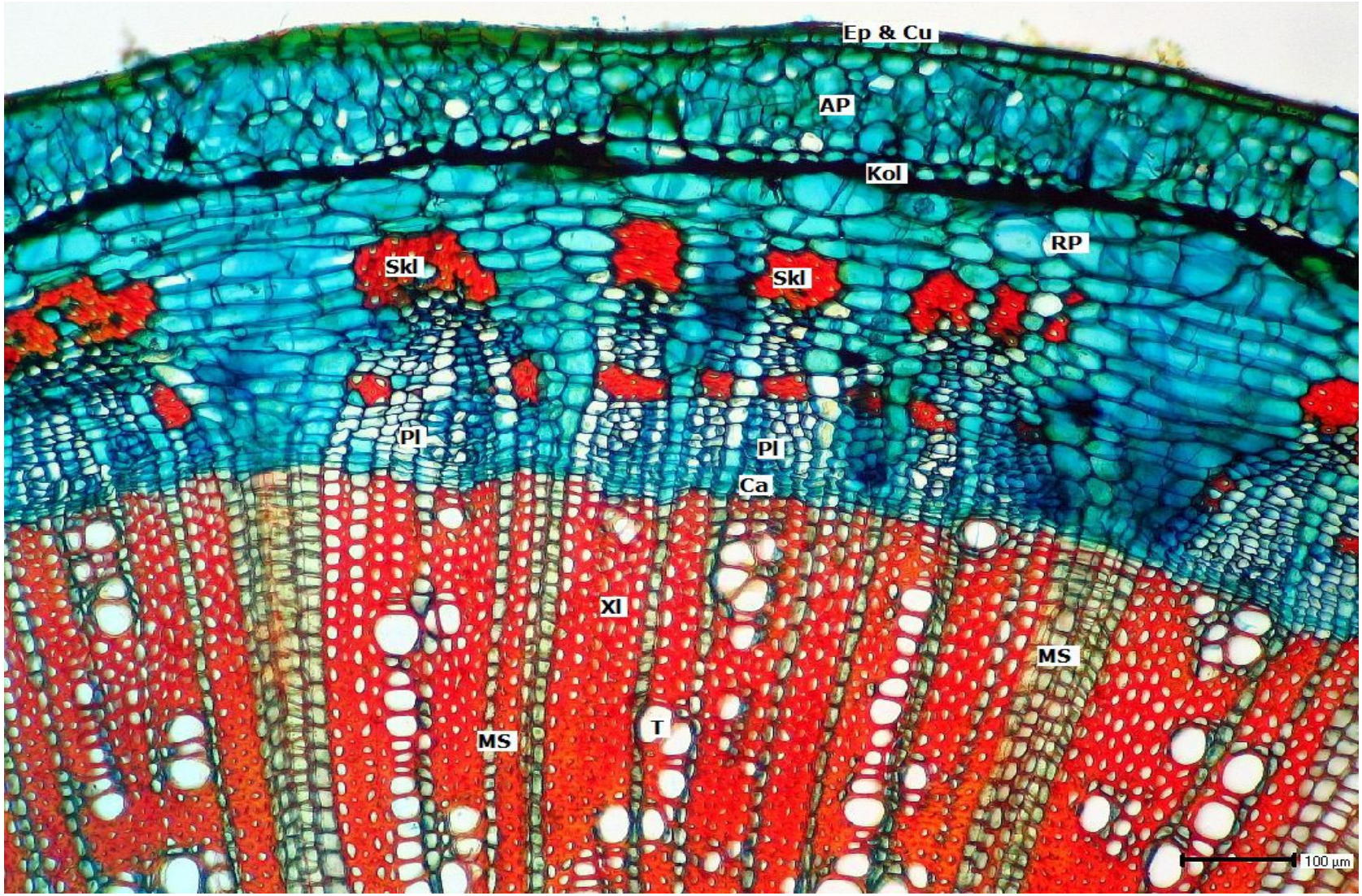
- Beschriften des Präparates
  - Linke Seite
    Name und lat. Name des Objektes, Objektteil und Orientierung, eventuell Schnittdicke
  - Beispiel: Strauchpappel
    Lavatera maritima
    Spross quer
  - Rechte Seite
    Name des Präparators, Färbung, Einschlussmittel und Datum
  - Beispiel: Jörg Weiß
    W3Asim II
    Euparal
    15.06.2017

Anatomie

- Wie bei allen Lebewesen erfüllen auch in Pflanzen verschiedene Gewebearten unterschiedliche Aufgaben
- Die Gewebe sind durch Spezialisierung an ihre jeweilige Aufgabe angepasst
- Gewebearten (unvollständig)
  - **Markparenchym (MP)** – Füllgewebe
  - **Xylem (Xl)** – Leitet Wasser und gelöste Salze von den Wurzeln in die Blätter
  - **Cambium (C)** - Wachstumsschicht
  - **Phloem (Pl)** - Leitet Wasser mit Assimilaten zu Wachstumszonen oder Speicherzellen
  - **Sklerenchym (Skl)** – verholzte Stützzellen, abgestorben
  - **Endodermis (Ed)** – Begrenzt des Zentralzylinder einer Wurzel gegen das Rindenparenchym, Casparistreifen, Filterfunktion
  - **Rindenparenchym (RP) -** Füllgewebe
  - **Epidermis (Ep)** – Abschlussgewebe
  - **Phellem (Ph), Phellogen (Pg), Phelloderm (Pd)** – Aufbau der (Wurzel-)Rinde
  - **Cuticula (Cu)** – Von der Epidermis gebildete Wachsschicht, Verdunstungsschutz

Anatomie

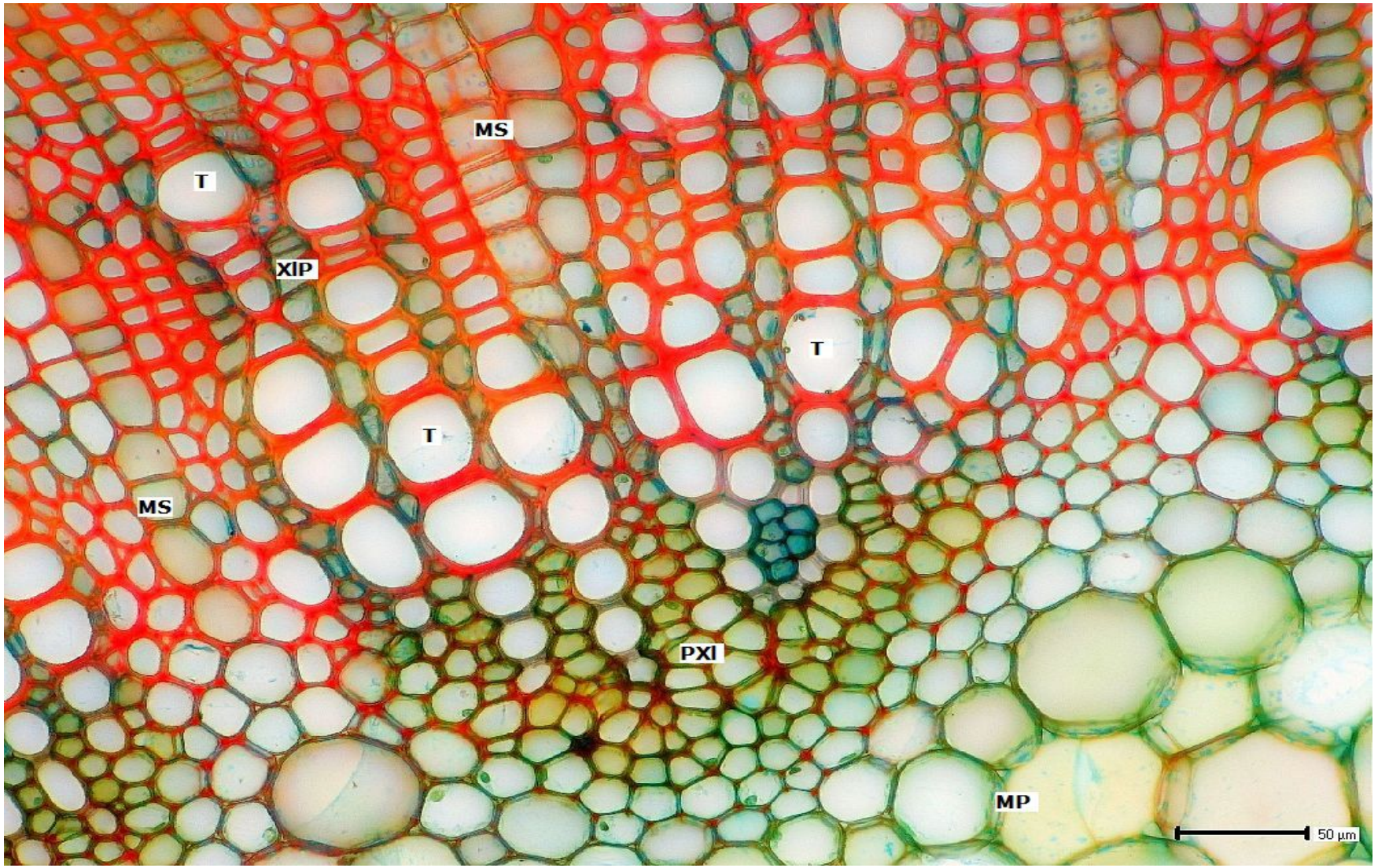
- Malve: Spross, W3A



MKB Schneiden, Färben, Legen 2017:
Spross & Blatt der Strauchpappel
im mikroskopischen Präparat

Anatomie

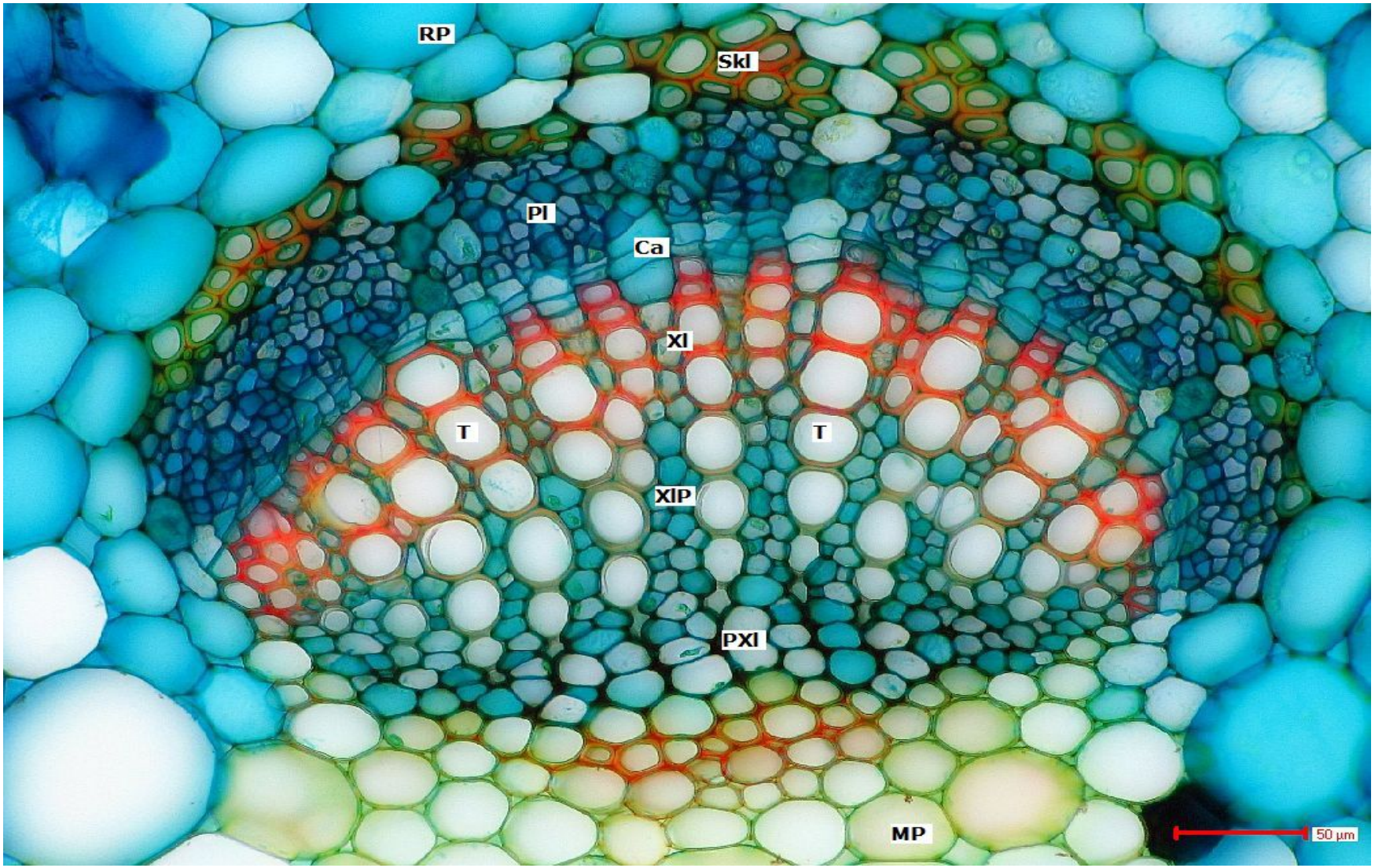
- Malve: Spross, W3A



MKB Schneiden, Färben, Legen 2017:
Spross & Blatt der Strauchpappel
im mikroskopischen Präparat

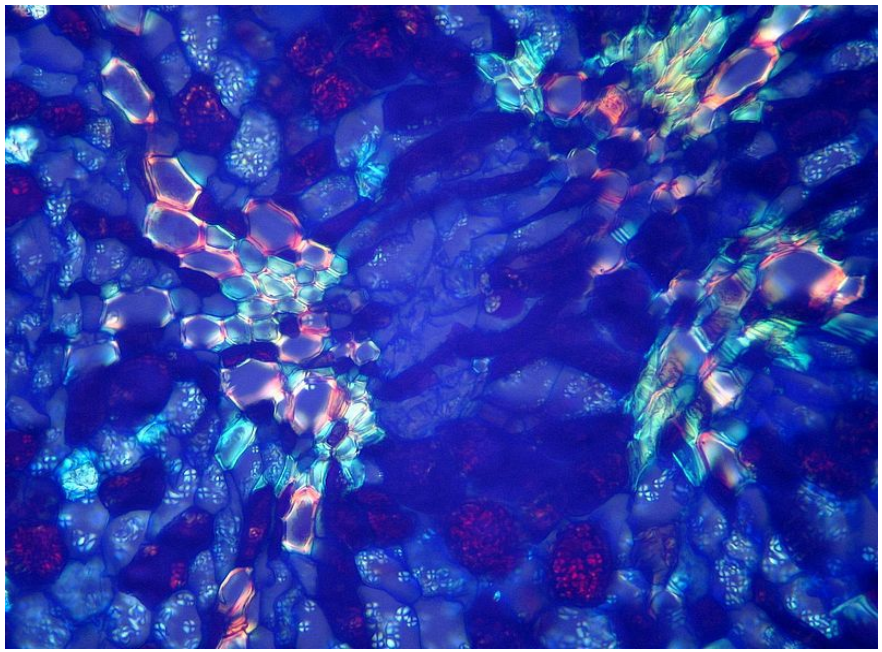
Anatomie

- Malve, Leitbündel, W3A



Literatur und Links

- Literatur
  - Das große Buch der Mikroskopie, Bruno P. Kremer, Kosmos, ISBN 978-3-440-08989-7
  - Mikroskopisch-Botanisches Praktikum, Gerhard Wanner, Thieme, ISBN 3-13-440312-9
  - Funktionelle Pflanzenanatomie, Walter Eschrich, Springer, ISBN 3-540-59131-1
  - MKB Artikel zum Zylindermikrotom, dem Haga-Mikrotom sowie zu den W3Asim Färbungen im Bereich Bibliothek/Botanische Mikrotechnik auf der Webseite des MKB und als PDF zum Herunterladen
- Links
  - Mikroskopie-Forum
    http://www.mikroskopie-forum.de/index.php
  - Offene Naturführer
    http://www.offene-naturfuehrer.de
- Mikroskopie in Bonn
  - MKB (Mikroskopisches Kollegium Bonn)
    Monatliche Treffen
    http://www.mikroskopie-bonn.de



Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit und den angenehmen Workshop!