

Von der Probe zum Präparat

Gefärbte Pflanzenschnitte mit einfachen Mitteln am Beispiel einer Schirmtannennadel (*Sciadopitys verticillata*)

Jörg Weiß

Version: 1.5
Stand : 17.03.2009

Inhaltsverzeichnis

1	Einführung.....	4
2	Benötigte Werkzeuge	5
2.1	Schere	5
2.2	Präpariernadel	5
2.3	Feiner Pinsel.....	5
2.4	Pipette	5
2.5	Glasstäbchen (aushilfsweise Holzstäbchen).....	5
2.6	Einseitige Rasierklingen mit Griffschutz	6
2.7	Deckglaspinzette	6
2.8	Objektträger	6
2.9	Deckgläser	6
2.10	Uhrgläser	6
2.11	Färbe- und Spültröge.....	7
2.12	Weithalsflasche 50 ml	7
2.13	Maschinenschraubenmuttern der Größe M8	7
2.14	Holundermark.....	7
2.15	Objektträgerschablone.....	7
2.16	Leinenlappchen oder Augenwatte	8
2.17	Etiketten.....	8
2.18	Fineliner.....	8
3	Benötigte Chemikalien.....	9
3.1	Destilliertes Wasser.....	9
3.2	Ethanol 70%	9
3.3	Isopropanol rein	9
3.4	AFE Fixierlösung.....	9
3.5	Etzold's Farbgemisch FCA.....	10
3.6	Euparal.....	10
3.7	Wundbenzin	10
3.8	Spiritus.....	10
4	Probennahme und Fixierung	11
4.1	Werkzeuge und Chemikalien.....	11
4.2	Vorbereitung.....	11
4.3	Durchführung.....	11
5	Erstellung der Schnitte.....	12
5.1	Werkzeuge und Chemikalien.....	12
5.2	Vorbereitung.....	12
5.3	Das Schneiden.....	13
5.4	Auswahl geeigneter Schnitte	13
6	Färben mit Etzold's Farbgemisch.....	14
6.1	Werkzeuge und Chemikalien.....	14
6.2	Vorbereitung.....	14
6.3	Färben	15
6.4	Differenzieren	17
6.5	Entwässern.....	17
6.6	Auswahl geeigneter Schnitte	18

7	Eindecken der Schnitte.....	18
	7.1 Werkzeuge und Chemikalien.....	18
	7.2 Vorbereitung.....	18
	7.3 Arrangieren der Schnitte.....	20
	7.4 Auftropfen des Einschlussmittels.....	20
	7.5 Auflegen des Deckglases.....	21
	7.6 Aushärten.....	22
8	Beschriften der Präparate	23
	8.1 Materialien	23
	8.2 Was sollte auf die Etiketten?.....	24
	8.3 Gedanken zur Ordnung der Präparate.....	24
9	Was zeigt das Präparat?.....	26
	9.1 Übersicht	26
	9.2 Leitbündel	27
	9.3 Palisadenparenchym	28
	9.4 Harzkanal.....	29
	9.5 Blattspalte.....	29
	9.6 Blattoberseite mit Epidermis	30
	9.7 Astrosklereid, ein Idioblast.....	31
	Literaturverzeichnis	32
	Abbildungsverzeichnis.....	33
	Index.....	34

1 Einführung

Dargestellt wird die Erstellung eines Dauerpräparates von gefärbten Querschnitten durch die Nadel einer Schirmtanne. Die beschriebenen Techniken sind auf die meisten anderen pflanzlichen Proben übertragbar, sie können natürlich auch mit jedem anderen Nadelbaumblatt durchgeführt werden.

Diese Anleitung richtet sich mit Schritt für Schritt Erklärungen und vielen Praxistipps an den Anfänger, der seine ersten Schritte bei der Erstellung pflanzlicher Dauerpräparate unternehmen möchte. Ich habe versucht, auf alle Fragen eine Antwort zu geben, die sich auch mir bei der ersten Präparation gestellt haben.

Benutzt werden nur Mittel und Techniken, die ohne großen finanziellen Aufwand für jeden Mikroskopiker verfügbar sind und ohne spezielle Vorkenntnisse mit etwas Übung angewandt werden können.

Vorausgesetzt werden allgemeine Grundkenntnisse vom Umgang mit Chemikalien und der Bedeutung der Gefahrenkennzeichen sowie die grundsätzliche Handhabung von Objektträgern, Deckgläsern und natürlich dem Mikroskop.

Zunächst werden alle für die Präparation benötigten Werkzeuge und Chemikalien vorgestellt. Anschließend erfolgt die Beschreibung der einzelnen Arbeitsschritte von der Probenahme bis zum fertigen Präparat einschließlich der Beschriftung und Katalogisierung. Im letzten Kapitel wird kurz erläutert, was das frisch erstellte Präparat zeigt.

Die hier gezeigten Bilder stellen nicht das Optimum dessen dar, was man mit langer Erfahrung und Praxis beim Einsatz der verwendeten Techniken erreichen kann. Sie zeigen den Fertigungsstand des Autors, und somit Ergebnisse, die man erwarten kann, wenn man die vorgeschlagenen Handgriffe mit ein wenig Übung umzusetzen weis.

Danksagung

Mein Dank gilt den Herren Klaus Herrmann und Rolf-Dieter Müller für das Korrekturlesen und den Mikroskopikern aus dem Mikroforum für die vielen guten Tipps. Sowie Herrn Christian Linkenheld für die Bereitstellung des großen deutschen Mikroskopie-Forums:

„[Mikro-Forum](http://www.mikroskopie-forum.de/)“ (<http://www.mikroskopie-forum.de/>).

2 Benötigte Werkzeuge



Abbildung 1: Werkzeuge, Unterschriften entsprechen Kapitelnummerierung

2.1 Schere

Eine spitze kleine Schere zum Abschneiden und Zerteilen der Proben.

2.2 Präpariernadel

Zur Handhabung des Probenmaterials.

2.3 Feiner Pinsel

Zur Handhabung des Probenmaterials. Besonders beim Umgang mit den empfindlichen Schnitten der Präpariernadel vorzuziehen.

Am besten sind Rotmarderhaarpinsel aus dem Künstlerbedarf in der Größe 0 oder feiner.

2.4 Pipette

Zum Auftropfen der verschiedenen Reagenzien. Am einfachsten zu handhaben sind die Kunststoffpipetten mit 0,5 ml Volumen. Mehrfach verwendbar, mindestens 10 Stück. Jedes Reagenz hat seine eigene Pipette!

2.5 Glasstäbchen (aushilfsweise Holzstäbchen)

Zum Übertragen und Aufbringen des Einschlussmittels auf den Objektträger.

2.6 Einseitige Rasierklingen mit Griffschutz

Für Freihandschnitte und zum Zerteilen von Objekten



Abbildung 2: Einseitige Rasierklingen

2.7 Deckglaspinzette

Eine Pinzette mit flachem Schnabel zum Auflegen der Deckgläser.

2.8 Objektträger

Die Basis für das Dauerpräparat. Am besten nimmt man für Dauerpräparate vorgereinigte Objektträger mit geschliffenen Kanten, dies verringert das Verletzungsrisiko

2.9 Deckgläser

Gibt es in runder und eckiger Form. Wir verwenden runde Deckgläser mit 18 mm Durchmesser.

2.10 Uhrgläser

Zum Abdecken der Färbetröge oder als Alternative für diese. Durchmesser 60 mm zum Abdecken und 40 mm zum Färben; von beiden Größen 3 Stück.

2.11 Färbe- und Spültröge

Inhalt um die 20 ml, Durchmesser 40 mm. Gut zu verwenden sind einfache Glasbecher, wie man sie als Hülle für Teelichter findet. Zur Zeit der Erstellung dieses Dokumentes z.B. GLIMMA 1“ von Ikea, 12 Stück unter 2 Euro.

Benötigt werden mindestens 3 Stück. Kleine Petrischalen können ebenfalls benutzt werden, oder die kleinen Uhrgläser aus 2.10..

2.12 Weithalsflasche 50 ml

Als Sammelgefäß für die Proben. Gibt es beim Apotheker für kleines Geld. Geeignet sind auch Schnappdeckelgläschen mit ca. 20 ml Inhalt, diese sind noch günstiger zu bekommen.

2.13 Maschinenschraubenmuttern der Größe M8

Die Muttern aus dem Baumarkt dienen als Gewichte zum Beschweren der Deckgläser beim Aushärten der Präparate.

2.14 Holundermark

Ermöglicht das exakte Schneiden der Proben und kann einfach selbst gesammelt werden. Wie das geht ist zum Beispiel im hier verlinkten Beitrag aus dem Mikroskopieforum beschrieben: [Link zum Beitrag Holundermark](http://www.mikroskopie-forum.de/index.php?topic=857.0)

(<http://www.mikroskopie-forum.de/index.php?topic=857.0>)

Sehr gut können auch Möhrenstücke verwendet werden.



Abbildung 3: Holundermark

2.15 Objektträgerschablone

Eine stabile Pappschablone, die den Objektträger von 3 Seiten umfasst und in dessen Mitte Markierungen für runde und eckige Deckgläser aufweist. Mindestens die Standardgrößen 18 * 18 mm und 18 mm Rund sollten eingezeichnet sein.

Selber bauen! Bewährt ist stabile Graupappe (1 - 3 mm stark) beidseitig kaschiert mit einem wasserfesten Papier wie z.B. Elefantenhaut. Geklebt wird mit wasserfestem Holzleim (Ponal oder Ähnliches).

2.16 Leinenläppchen oder Augenwatte

Zum Reinigen der Objektträger und Deckgläser. Das Leinenläppchen fusselt nicht und kann zusammen mit Spiritus genutzt werden.

Mit einem Wattestäbchen aus Augenwatte und einem Holzstäbchen und Wundbenzin kann man ebenfalls Gläser reinigen. Augenwatte gibt es beim Apotheker. Keine normale Watte benutzen, nur Augenwatte ist frei von Fremdstoffen und hinterlässt beim Reinigen keine zusätzlichen Schlieren auf Glasflächen.

Die Watte nie mit den bloßen Fingern berühren, da diese aufgrund der natürlichen Hautfette auch frisch gewaschen immer zu fettig sind.

2.17 Etiketten

Zum Beschriften der Präparate. Zum Beispiel 22 * 18 mm von Avery (Nr. 3318).

2.18 Fineliner

Zum Beschriften der Präparate. Zum Beispiel Staedtler pigment liner 0.05 (Artikel Nr. 308 005-9).

Die Werkzeuge erhält man, soweit nicht anders angegeben z.B. bei Lehrmittelhandlungen oder im Netz (Link auf den Linkbereich des Forums).

Tipp: Altes Zahnarztbesteck

Auf Flohmärkten findet man oft Händler, die altes Zahnarztbesteck verkaufen. Die Sonden eignen sich hervorragend als Präpariernadeln. Es gibt sie mit verschieden geformten Spitzen. Der Preis liegt bei wenigen Euro aber damit deutlich über dem einer einfachen Präpariernadel. Dafür sind die Geräte aus bestem Stahl, haben eine wunderbare Haptik und halten ewig. Einfach mal in die Hand nehmen.

Ebenso findet man hier vernünftige Pinzetten und Scheren. Wer möchte, kann sich auch ein Skalpellhalter und Klingen zulegen. Das schont die Rasierklingen bei den größeren Arbeiten.

Tipp: Besteckmappe

Beim Lehrmittelhandel werden einfache Besteckmappen angeboten, die mit einem Kunststoff ausgekleidet sind. Dieser besteht aus einem mit feinen Fasern beflocktem Gewebe.

Leider haben die Fasern die Angewohnheit, sich beim Entnehmen und Zurückstecken der Instrumente zu lösen. Sie sind so klein, dass man sie kaum sehen kann und daher findet man sie in der Regel erst unter dem Mikroskop auf seinen Präparaten wieder. Natürlich unter dem Deckglas – daher Finger weg, diese Mappen sind ungeeignet.

Besser geeignet sind Holz- oder Plastikboxen, auch wenn diese nicht so handlich sind. Für ein kleines Besteck findet sich vielleicht auch eine alte Manikür-Mappe.

3 Benötigte Chemikalien



Abbildung 4: Reagenzien, Unterschriften entsprechen Kapitelnummerierung

3.1 Destilliertes Wasser

Zum Ansetzen der Färbelösung und zum Spülen. Es reicht das demineralisierte Wasser im 5 Liter Kanister aus dem Supermarkt. Eine 0,5 Liter Spritzflasche erleichtert die Handhabung.

3.2 Ethanol 70%

Zum Differenzieren der Färbung. Gibt es in der Apotheke. Leicht entzündlich. 100 ml.

Tipp: Vergälltes Ethanol

Vergälltes Ethanol nutzen. Bei der Verwendung von Spiritus hingegen kann es wegen der unbekanntenen Inhaltsstoffe zu ungewollten Reaktionen kommen.

3.3 Isopropanol rein

Zum Entwässern der Schnitte vor dem Einschließen in Euparal. Gibt es in der Apotheke. Leicht entzündlich, reizend. 100 ml.

3.4 AFE Fixierlösung

AFE dient zur Fixierung des Probematerials. Zerkleinerte Stücke der Probe (8 bis 10 mm Länge) werden im Sammelglas in dieser Lösung aufbewahrt, um Veränderungen an den untersuchenden Geweben möglichst zu vermeiden. Auch eine längere Lagerung der Proben ist in dieser Lösung problemlos möglich.

AFE steht für Alkohol, Formalin (Formaldehyd-Lösung) und Essigsäure. Benötigt werden 70%iges Ethanol (vergällt), Formalinlösung 35% und Essigsäure 99%.

Das Mischungsverhältnis ist AFE: 90 zu 5 zu 5 ml.

Tipp: Alternative Fixierung

Formalin steht im Verdacht, Krebs zu erregen und ist giftig. Essigsäure ist ätzend und entwickelt stechende Dämpfe.

Wem der Umgang mit diesen Chemikalien zu heikel ist, kann auch darauf verzichten, und hilfsweise mit 70%igem Ethanol fixieren.

3.5 Etzold's Farbgemisch FCA

Der Farbansatz nach Etzold ist sozusagen das Standardfärbemittel bei botanischen Schnitten und besteht aus den drei Farbstoffen Fuchsin, Chrysoidin und Astrablau. Es gibt auch eine Variante Etzold Grün, die statt Astrablau ein Gemisch aus Alcianblau und Alciangelb enthält.

Der Vollständigkeit halber sei hier noch die erste Variante des Etzoldschen Farbgemisches erwähnt. Dieses enthält statt Chrysoidin den Farbstoff Safranin. Die Mischung wurde noch von Etzold selbst zu FCA optimiert.

Etzold's Farbgemisch ist nicht ganz einfach zu bekommen, es kann eventuell über eine Apotheke bezogen werden. Andernfalls kann zum Beispiel eine Anfrage bei einer Mikroskopischen Vereinigung weiter führen. 20 bis 50 ml, gut haltbar.

Tipp: Weitere Fixierungen und Färbungen

Informationen und Rezepte zu einer großen Anzahl von Fixiermitteln und Farbstoffen für die Lichtmikroskopie findet man bei [Armin Eisner](http://www.aeisner.de/) (<http://www.aeisner.de/>).

3.6 Euparal

Ist ein leicht zu verarbeitendes Einschlussmittel, da es in Isopropanol löslich ist und somit auf die Verwendung von Xylol als Lösungsmittel verzichtet werden kann. Sein Brechungsindex liegt bei 1,53 - 1,54, die genaue Zusammensetzung ist nicht bekannt.

Ein Nachteil ist der vergleichsweise lange Aushärtezeit. Die beim frisch eingedeckten Präparat etwas blassen Farben treten nach einigen Tagen sehr kräftig und transparent hervor.

Informationen zu und eine Bewertung alternativer Einschlussmittel findet man zum Beispiel auf der Website der Münchner Mikroskopischen Vereinigung: [Balsame](http://mikroskopie-muenchen.de/balsame.html) (<http://mikroskopie-muenchen.de/balsame.html>)

Für die Beschaffung gilt das Gleiche, wie für das Farbgemisch. 20 bis 100 ml, ebenfalls lange haltbar.

3.7 Wundbenzin

Zum Reinigen der Objektträger, gibt es in der Apotheke. Leicht entzündlich. 100 ml.

3.8 Spiritus

Spiritus ist ebenfalls vergälltes Ethanol, allerdings mit unbekannter Zusammensetzung des Vergällungsmittels. Er eignet sich zusammen mit einem Leinenläppchen gut zum Reinigen von Objektträgern und Deckgläsern; gibt es in der Literflasche im Drogeriemarkt.

Tipp: Der Apotheker des Vertrauens

Aufgrund verschiedener gesetzlicher Neuregelungen sind viele Chemikalien nicht mehr so einfach erhältlich, wie das noch vor einiger Zeit möglich war.

Apotheker sind jedoch manchmal bereit, die gewünschten Stoffe zu beschaffen, wenn sie sicher sein können, dass der Käufer diese sachgerecht zu verwenden weis. Hier hilft oft ein Gespräch in der Apotheke vor Ort, in dem man den Verwendungszweck und die eigene Erfahrung darlegen kann.

Ethanol, Isopropanol und Wundbenzin sind in der Regel vorrätig und können in kleinen Mengen abgefüllt werden.

Bei Stoffen, die extra bestellt werden müssen, wird der Apotheker auf die Abnahme der Mindestbestellmenge bestehen: Essigsäure gibt es ab 250 ml, Formalin leider nur ab 1000 ml. Weitere Bezugsquellen finden Sie z.B. in der [Linkliste bei Mikroskopie.de](http://www.mikroskopie.de/Div/Links.htm) (<http://www.mikroskopie.de/Div/Links.htm>).

4 Probennahme und Fixierung

Beim Sammeln von Proben allgemein bitte darauf achten, keine geschützten Arten zu verwenden und den Fundort nicht unnötig zu beeinträchtigen.

4.1 Werkzeuge und Chemikalien

- Sammelgläschen
- Schere, besser Rasierklinge oder Skalpell
- AFE

4.2 Vorbereitung

Die AFE Lösung in die Sammelgläschen füllen.

4.3 Durchführung

Die zu untersuchenden Pflanzenteile vorsichtig abschneiden, um unnötige Verletzungen an der Pflanze und der Probe zu vermeiden.

Die Probe gleich anschließend in 8 bis 10 mm lange Stücke zerteilen und in den mitgebrachten Sammelgefäßen mit dem AFE fixieren. Kleinere Stücke brauchen natürlich nicht noch weiter zerteilt werden.

Sinn der Fixierung ist es, das Gewebe der Probe so lebensecht wie möglich zu erhalten. Dies wird erreicht, in dem die Stoffwechselforgänge in den Zellen unterbunden werden. Der Alkohol des Fixiermittels härtet gleichzeitig das Material, was später ein einfacheres Schneiden erlaubt.



Abbildung 5: Stücke von der Schirmtannennadel im Probenglas fixiert mit AFE. Der Alkohol hat zum Teil bereits das Chlorophyll aus den Nadelstücken gelöst.

5 Erstellung der Schnitte

Die vorliegende Beschreibung beschränkt sich auf Schnitte aus der freien Hand mit einer einfachen einseitigen Rasierklinge, da so mit sehr geringem Aufwand – und einiger Übung – schon gute Ergebnisse erzielt werden können.

Wer mit dem Freihandschneiden nicht zu recht kommt, kann sich zur Unterstützung ein Garnrollenmikrotom bauen (Beschreibung z.B. in „Das große Kosmos-Buch der Mikroskopie“ Seite 256). Bessere Schnitte erzielt man mit einem gut gepflegten Rasiermesser speziell für mikroskopische Schnitte.

Eine gute Abhandlung vom Freihandschnitt bis zum Mikrotomschnitt findet sich auf der Website der Münchner Mikroskopischen Gesellschaft: [Mikroskopische Schnitttechniken](http://mikroskopie-muenchen.de/cut-allgem.html) (<http://mikroskopie-muenchen.de/cut-allgem.html>).

5.1 Werkzeuge und Chemikalien

- Holundermark
- Ggf. Skalpell
- Rasierklinge mit Griffschutz (einseitige Rasierklinge)
- Pinsel
- Objektträger
- Spültrog
- Ethanol 70% vergällt
- Probe in AFE

5.2 Vorbereitung

Das Holundermark wird in einige etwa 30 mm lange Stücke geschnitten, deren obere Enden in Form eines Pyramidenstumpfes bekennt werden (Abbildung 6). Anschließend erhält jedes Stück einen Einschnitt mittig und parallel zur Längsachse, der später die Probe aufnehmen wird.

Das Zuschneiden sollte mit einem Skalpell oder einer älteren, für die eigentlichen Dünnschnitte schon zu stumpfe Klinge erfolgen.



Abbildung 6: Ein Stück der Schirmtannennadel im bekennteten Holundermark

Die so zugerichteten Stücke ermöglicht leichtere Schnitte durch homogenes Material und verhindert das schnelle Abstumpfen der Rasierklinge bei Schnitten durch die am Außenrand liegenden festeren Leitbündel des Marks.

Zum Aufnehmen und Spülen der Schnitte wird ein Spültrog mit 70%igem Ethanol bereitgestellt.

Kurz vor dem Schneiden wird ein Probenstück vorsichtig in den vorbereiteten Schlitz des Holundermarks eingeklemmt. Wenn kein Holundermark zur Hand ist, kann man sich auch mit einem wie oben beschrieben zugeschnittenen Stück Möhre behelfen.

5.3 Das Schneiden

Vor dem eigentlichen Schneiden begradigt man die Oberfläche des Holundermarks mit der Probe durch einen dickeren Schnitt mit der Rasierklinge. Dazu nimmt man das Holundermark mit der Probe in die linke Hand und zieht die Klinge mit der rechten durch den Block.

Man schneidet zu sich hin, nicht von sich weg. Das hat den Vorteil, dass der Blick auf den Schnitt immer frei ist. Die Klinge muss möglichst ohne Druck durch das Material gezogen werden (ziehendes Schneiden).

Anschließend den Block und die Klinge mit 70% Ethanol leicht anfeuchten.

Für die Dünnschnitte geht man genau so vor. Die Klinge wird allerdings hinter der Probe in einem leichten Winkel aufgesetzt und dringt beim Schneiden in das Holundermark ein. Dabei legt man die Oberarme am Oberkörper an, um möglichst ruhig schneiden zu können.

Mit einiger Übung gelangen so gute Schnitte mit mehreren Zellschichten, ohne die Probe zu zerreißen. Es werden aber auch immer wieder unbrauchbare dabei sein, die zu dick geraten sind oder zu stark auskeilen. Ggf. muss der Block dann, wie eingangs beschrieben, wieder begradigt werden.

Tipp: Frische Klinge für bessere Ergebnisse

Für besonders gute Ergebnisse verwendet man eine ältere Klinge für die Begradigungsschnitte und eine frische Klinge für die eigentlichen Dünnschnitte. Nach ca. 10 bis 15 Schnitten ist die alte Klinge abgenutzt und es muss eine frische Klinge verwendet werden..

Die Schnitte haften zusammen mit dem umgebenden Holundermark an der Rasierklinge und können von dort mit dem feuchten Pinsel – ggf. mit einem zusätzlichen Ethanoltröpfchen – abgenommen und in den Spültrog mit 70%igem Ethanol überführt werden.

Wenn es nicht direkt zufriedenstellend funktioniert: nicht aufgeben – man braucht etwas Übung und Gefühl für das Material, um gute Schnitte zu erhalten.

5.4 Auswahl geeigneter Schnitte

Zum Schluss werden die Schnitte unter dem Mikroskop mit dem Übersichtobjektiv geprüft und unbrauchbare Exemplare aussortiert.

Darunter fallen alle Schnitte, die zu dick oder gerissen sind oder bei denen die Probe nicht ganz getroffen wurde („Keile“) oder das Gewebe beschädigt ist.

Wer zusätzlich ein Stereomikroskop besitzt, nimmt die Auswahl unter diesem vor.

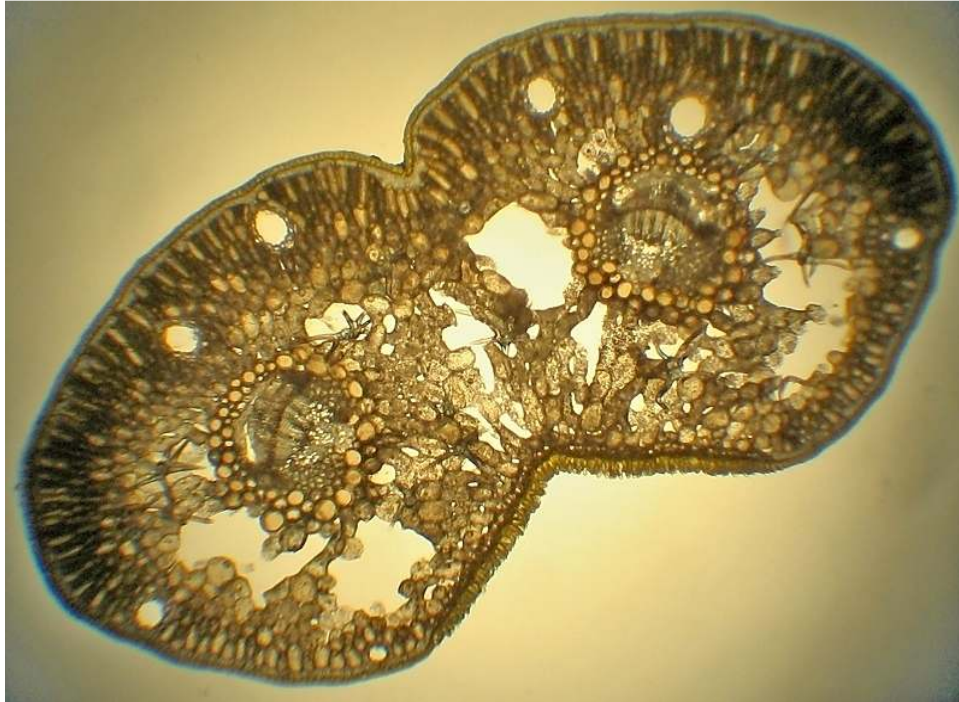


Abbildung 7: Ein frischer Schnitt in Wasser und ohne Deckglas zur schnellen Qualitätskontrolle. Da der Schnitt nicht plan liegt, kommt es zu der beobachteten Unschärfe an den Rändern.

6 Färben mit Etzold's Farbgemisch

Die Färbung des Präparates dient dazu, die einzelnen Gewebearten farblich hervorzuheben und so deren Aufbau deutlich zu machen.

6.1 Werkzeuge und Chemikalien

- Färbe- und Spültröge
- Uhrglas
- Pinsel
- Pipette
- Objektträger
- Destilliertes Wasser
- Etzold's Farbgemisch
- Ethanol 70%, 50% und 30%
- Isopropanol rein

6.2 Vorbereitung

Die zu färbenden Schnitte müssen zunächst von noch aus dem 70%igen Ethanol über zwei Stufen (50% und 30%) in Wasser überführt werden. Die Verweildauer sollte jeweils ca. 5 Minuten betragen. Die Alkoholstufen sollten zwei mal und das Wasser drei mal innerhalb der Verweildauer gewechselt werden.

Verdünnung: 50% Ethanol: Ethanol 70% zu dest. Wasser im Verhältnis 1 : 0,40;
 30% Ethanol: Ethanol 70% zu dest. Wasser im Verhältnis 1 : 1,33.



Abbildung 8: Wässern der Schnitte

Tipp: Arbeiten auf dem Objektträger

Arbeitet man nur mit einzelnen Schnitten, kann das Spülen auch auf dem Objektträger erfolgen. Dazu überschichtet man den Schnitt mit einigen Tropfen destilliertem Wasser und gießt dieses nach der Einwirkzeit vorsichtig ab. Wenn nötig, hält man den Schnitt oder die Schnitte mit dem Pinsel in Position.

6.3 Färben

Zum eigentlichen Färben überführt man die Schnitte in einen frischen Trog mit ca. 5 ml destilliertem Wasser und fügt einen Tropfen Etzold's Farbgemisch hinzu. Je nach Gewebearart und Schnittstärke kann die benötigte Menge Farbstoff variieren. Generell ist hier weniger mehr: bei einem Ansatz mit 5 ml Wasser sollten nicht mehr als 3 Tropfen Farblösung zugegeben werden.



Abbildung 9: Schnitte in Wasser direkt nach Zugabe der Farblösung

Die Einwirkzeit beträgt 24 Stunden. Zum Schutz vor Staub und Verdunstung wird der Färbetrog mit einem Uhrglas abgedeckt.



Abbildung 10: Schnitte am Ende der Färbung

Nach dem Färben werden die einzelnen Schnitte wieder unter dem Mikroskop geprüft

Tipp: Schnellfärbung

Wenn es schnell gehen soll oder nur wenige Schnitte zu bearbeiten sind, kann die Färbung auch auf dem Objektträger vorgenommen werden.

Dazu überschichtet man den Schnitt mit einigen Tropfen des Farbgemisches und erwärmt über der Flamme. Dabei ist unbedingt darauf zu achten, dass der Schnitt nicht austrocknet - er muss immer vom Farbgemisch überdeckt sein. Auch darf das Gemisch nicht zu sieden beginnen – es dürfen keine Bläschen entstehen.

Zum Schutz der Schnitte hält man den Objektträger am besten mit der Hand über die Flamme. Wenn es den Fingern zu heiß wird, ist der richtige Punkt erreicht und man nimmt den Objektträger aus der Flamme. Das Erwärmen wird dreimal wiederholt, anschließend lässt man abkühlen.

Alternativ kann man das aufgetropfte Farbgemisch (eventuell 1:1 mit destilliertem Wasser verdünnt) für 10 bis 15 Minuten ohne Erhitzen einwirken lassen. Auch hier muss der Schnitt immer gut überdeckt sein und darf nicht antrocknen. Von Zeit zu Zeit kurz aufschütteln, damit die Schnitte gut von der Farblösung umspült werden.

Zu Letzt wird das Farbgemisch abgegossen (Schnitt(e) wenn nötig mit dem Pinsel halten – kein Filterpapier nutzen, wegen der Gefahr, Flusen einzuschleppen) und mit etwas destilliertem Wasser nachgespült, bis keine Farbstoffschlieren mehr auftreten. Dazu mehrmals mit der Pipette Wasser auftropfen und wie oben beschrieben abgießen.

In der Regel werden bei gut gelungenen dünnen Schnitten mit dem Anfärben in stark verdünnter Farblösung und langer Färbezeit die besseren Ergebnisse erreicht. Sind die Schnitte dicker, arbeitet man besser mit den hier beschriebenen Alternativen.

6.4 Differenzieren

Ist die Färbung zu stark geraten oder überlagert das Fuchsin die blau angefärbten Bereiche des Schnittes, kann dies durch Differenzieren in 70%-igem Ethanol behoben werden. Grundlage ist die gute Löslichkeit von Fuchsin in Ethanol, mit dem überflüssiger Farbstoff aus dem Schnitt entfernt werden kann.

Bei der Verwendung des aktuellen Etzold's Farbgemisch FCA ist eine Differenzierung bei korrekter Anwendung in der Regel nicht notwendig.

Da die Differenzierung sehr zeitkritisch ist und regelmäßig nicht alle Schnitte gleichermaßen betroffen sind, erfolgt sie wenn nötig am besten einzeln auf dem Objektträger.

Da dazu überschichtet man den Schnitt zunächst noch mal mit einigen Tropfen destilliertem Wasser und gießt vorsichtig ab.

Anschließend gibt man einige Tropfen 70%igen Ethanol darauf und lässt diesen für ca. 30 Sekunden einwirken.

Die Differenzierung wird durch Zugabe von einigen Tropfen absolutem Isopropanol gestoppt (Überleitung zum Entwässern).

Den Vorgang durch Abgießen mindestens 3-mal wiederholen. Schnitte wenn nötig mit dem Pinsel halten.

Die zum Differenzieren notwendige Einwirkzeit ist abhängig von der verwendeten Färbemethode, dem Ausgangsmaterial und dessen Dicke. Die Zeiten können daher variieren. Differenziert man zu lange, wird zu viel Fuchsin ausgespült und die roten Zellbereiche erscheinen zu blass.

Allerdings kann es aus unterschiedlichen Gründen immer wieder einmal vorkommen, dass das Fuchsin vom Probengewebe nicht ausreichend aufgenommen wird. Dies erkennt man jedoch bereits bei der Kontrolle vor dem Differenzieren.

Tipp: Zwischenspülung mit 30%igem Ethanol

Erreicht man mit der hier beschriebenen Vorgehensweise keine befriedigenden Ergebnisse, kann man nach [Armin Eisner](http://www.aeisner.de/) (<http://www.aeisner.de/>) vor dem Differenzieren noch eine Spülung mit 30%igem Ethanol einschieben, das man leicht durch Verdünnen des 70%igen Ethanol erhalten kann (Ethanol 70% zu dest. Wasser im Verhältnis 1 : 1,33). Die Einwirkzeit beträgt zweimal ca. 30 Sekunden. Nicht selbst probiert.

6.5 Entwässern

Vor dem Einschließen mit Euparal müssen die Schnitte entwässert werden. Dies geschieht, in dem anhaftendes Wasser durch das Euparal-freundliche Lösungsmittel Isopropanol ausgetauscht wird.

Entwässert werden jeweils die gerade zur Verarbeitung anstehenden Schnitte auf einem Objektträger oder in einem Uhrglas, auf den bzw. auf das sie vorsichtig mit dem Pinsel gebracht werden.

Um das Wasser schnell zu entfernen und die Fuchsinfärbung zu erhalten wird auch hier das Isopropanol dreimal gewechselt. Die erste Charge bleibt für 15 Sekunden auf den Schnitten, die beiden folgenden für jeweils 3 Minuten.

6.6 Auswahl geeigneter Schnitte

Die Auswahl geeigneter Schnitte zum Eindecken erfolgt am besten während der Einwirkzeit der letzten Charge Isopropanol. Auch hier ist darauf zu achten, dass die Schnitte nicht eintrocknen. Isopropanol ist leicht flüchtig: ggf. kann etwas nachgetropft werden.

Geprüft wird wieder unter dem Mikroskop bei kleinster Vergrößerung oder – soweit vorhanden – unter dem Stereomikroskop.

7 Eindecken der Schnitte

Unter dem Begriff Eindecken oder Einschließen versteht man die eigentliche Herstellung eines Dauerpräparates. Dazu wird die Probe auf dem Objektträger in ein geeignetes Einschlußmittel (in der Regel ein Kunstharzgemisch in einem passenden Lösungsmittel) überführt und mit einem Deckglas abgedeckt. Nach dem Aushärten des Einschlußmittels ist das Präparat fertig.

7.1 Werkzeuge und Chemikalien

- Objektträger
- Deckgläser
- Holzstäbchen
- Pinsel
- Deckglaspinzette
- Einige Maschinenschraubenmutter „M8“
- Ggf. Objektträgerschablone
- Ggf. Tropfstab aus Glas oder Metall
- Spiritus
- Leinenlappen
- Ggf. Wundbenzin
- Ggf. Augenwatte
- Euparal
- Ggf. Isopropanol

7.2 Vorbereitung

Vor dem Eindecken müssen die verwendeten Objektträger und Deckgläser gereinigt werden. Dies gilt auch für vorgereinigte Ware, wovon man sich leicht überzeugen kann, wenn man die Gläser ins Licht hält.

In der Literatur und im Netz sind verschiedene sehr aufwändige Reinigungsverfahren beschrieben. Für unseren Zweck reicht ein Abwischen der Gläser mit einem Leinenlappen und Brennspiritus.

Alternativ taucht man ein Holzspießchen in das Wundbenzin (die Watte haftet dann besser) und nimmt damit eine kleine Menge Augenwatte auf, die mit Hilfe eines Objektträgers aufgerollt wird - nicht die Hand verwenden, da immer etwas Hautfett mitgenommen würde. Es entsteht eine Art Riesen-Wattestäbchen, das leicht mit Wundbenzin befeuchtet wird.

Die Objektträger und Deckgläser werden durch Anblasen z.B. mit einem Gummiball von anhaftendem losem Staub befreit und anschließend mit dem spiritusgetränkten Leinenlappen oder dem gerade erstellten Reinigungsstäbchen abgewischt .

Dabei ist darauf zu achten, die Gläser nur mit den Fingerspitzen am Rand zu halten um unnötiges Übertragen von Hautfett zu vermeiden.

Objektträger und Deckgläser sind sauber, wenn beim Abdampfen des Spiritus oder des Benzins keine Schlieren mehr auf dem Glas zurückbleiben. Eventuell noch anhaftende Wattefasern werden ebenfalls weggepusht.

Die gereinigten Gläser bewahrt man bis zur Verwendung zum Beispiel in einem staubgeschützt Kästchen auf.

Wenn man eine Objektträgerschablone benutzt, wird nun der ersten Objektträger aufgelegt.

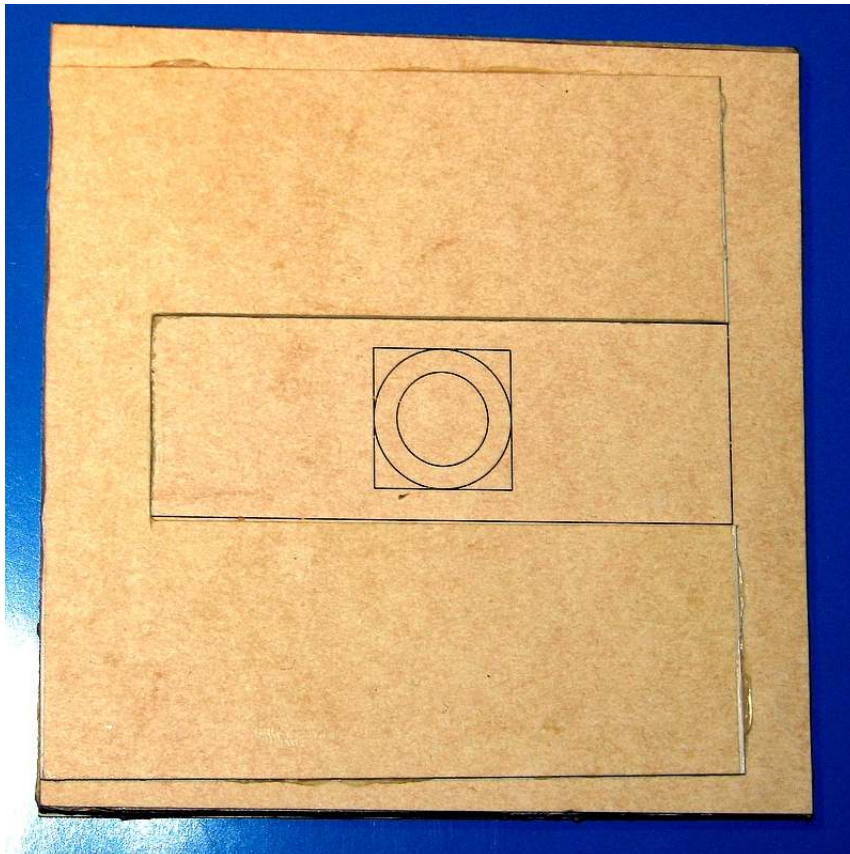


Abbildung 11: Eine einfache Objektträgerschablone

Tipp: Einmalhandschuhe

Um Fingerabdrücke auf den Gläsern oder Fett auf dem Reinigungstuch bzw. -stäbchen zu vermeiden, nutzt man Einmalhandschuhe aus Silikon ohne Beschichtung oder Talk.

Tipp: Zwischenstufe mit verdünntem Einschlussmittel

Bei schwierigen Proben kann es hilfreich sein, eine Zwischenstufe aus verdünntem Einschlussmittel einzuschieben um z.B. Bläschenbildung zu vermeiden. Dazu mischt man hier z.B. Euparal und Isopropanol im Verhältnis 1 : 1 und belässt die Schnitte darin für ca. 3 Minuten.

Dabei ist unbedingt darauf zu achten, dass das Isopropanol wasserfrei ist und während der Einwirkzeit nicht komplett verdampft. Bei Bedarf kann mit der Pipette etwas Isopropanol nachgetropft werden.

Wenn beim Mischen von Isopropanol und Euparal keine klare, homogene Flüssigkeit entsteht, sondern sich milchige Schlieren bilden, ist Wasser enthalten und die Mischung nicht verwendbar.

7.3 Arrangieren der Schnitte

Die hier verwendeten Querschnitte der Schirmtannennadel sind so klein, dass mehrere davon gemeinsam auf einem Objektträger eingeschlossen werden können. Dies ist sinnvoll, weil einzelne Schnitte nicht immer alle Aspekte eines Gewebes gleich gut zeigen.

Während auf dem einen die Leitbündel und die Blattspalte besonders gut zu sehen sind, zeigt ein anderer vielleicht die Astrosklereiden (eine besondere Form von Idioblasten, die bei Schirmtannennadeln häufig anzutreffen sind) besonders schön.

Die ausgewählten Schnitte werden nun mit dem Pinsel vorsichtig auf dem Objektträger platziert. Ein einzelner Schnitt sollte immer mittig liegen, bei mehreren Schnitten ist darauf zu achten, dass ein Mindestabstand von einigen Millimetern zum späteren Deckglasrand gewahrt bleibt. Hierbei leistet die Objektträgerschablone mit entsprechenden Markierungen gute Dienste.



Abbildung 12: Arrangieren der Schnitte auf dem Objektträger mit Hilfe der Schablone. Um genügend Abstand zum Deckglasrand zu halten, dürfen die Präparate nur innerhalb des inneren Kreises liegen.

7.4 Auftropfen des Einschlussmittels

Das Euparal wird nicht mit einer Pipette sondern mit einem Tropfstäbchen aufgebracht, da eine Pipette wegen der zähflüssigen Konsistenz schwer zu handhaben und zu reinigen ist.

Man nimmt ein Tropfstäbchen aus Glas oder Metal. Im einfachsten Falle nimmt man ein Holzstäbchen, was auch gut funktioniert und nicht gereinigt werden muss. Allerdings könnten hier kleine Splitter ins Präparat gelangen.

Nun tropft man mit dem Stäbchen eine ausreichende Menge Euparal auf, sodass möglichst keine Lufteinschlüsse entstehen und das Einschlussmittel die Schnitte von allen Seiten gut umfließen kann. Dabei ist wieder auf eine möglichst mittige Positionierung zu achten.

Die aufgetropfte Menge muss ausreichen, um den Raum unter dem Deckglas vollständig zu füllen, ohne dass beim späteren Andrücken zu viel davon unter dem Deckglasrand hervorquillt. Je dicker die einzudeckenden Schnitte geraten sind, desto mehr Euparal wird benötigt

und umso größer ist die Gefahr, dass sich durch den Volumenverlust beim Verdunsten des Lösungsmittels Blasen unter dem Deckglas bilden. Diese sind nur sehr schwer zu entfernen und das Präparat ist in der Regel verdorben.

Alleine schon wegen der unterschiedlichen Tropfengröße durch unterschiedliche Tropfstäbchen ist es schwer, hier konkrete Mengenangaben zu machen. Die optimale Menge muss also jeder selbst ermitteln.

Nach dem Auftropfen des Euparals sollte die Probe komplett von diesem umschlossen sein. Der Einschlussmitteltropfen darf dabei keine sichtbaren Luftblasen enthalten. Kleinere Luftblasen am Schnitt verschwinden in der Regel innerhalb weniger Tage beim Aushärten.

Tipp: Tropfverhalten

Um ein Gefühl für das Fließverhalten des Euparals zu bekommen, taucht man das Stäbchen zunächst mehrfach etwa 2 cm weit ein und nimmt es soweit wieder hinaus, dass man das zurücktropfende Einschlussmittel beobachten kann.

Anschließend setzt man einige Tropfen davon auf einen Objektträger. Diese sind je nach Eintauchtiefe und Durchmesser des Stäbchens unterschiedlich groß. Auch werden die nachfolgenden Tropfen natürlich immer kleiner.

Der jeweils ersten Tropfen nach erneutem Eintauchen des Stäbchens kommt zu schnell und ist oft zu groß. Ihn verwendet man nicht sondern lässt ihn in die Vorratsflasche zurücktropfen.

7.5 Auflegen des Deckglases

Nun muss nur noch das Deckglas aufgelegt werden. Dazu fasst man dieses mit der Deckglaspinzette an einer Seite vorsichtig an und führt es schräg an das Präparat heran.

Die andere Seite wird an ihrem Auflagepunkt auf dem Objektträger vorsichtig z.B. mit der Präpariernadel abgestützt. Dann öffnet man die Pinzette (das Deckglas liegt nun lose auf der unteren Pinzettenschaukel auf) und senkt die Pinzette langsam ab.

Berührt das Deckglas nun den Euparaltropfen, senkt man langsam noch ein wenig weiter ab und nimmt dann die Pinzette weg. Das Deckglas gleitet nun von alleine in Position, während sich das Harz gleichmäßig darunter verteilt. Zum Schluss entfernt man auch die Präpariernadel und drückt das Deckglas mit deren Griffseite oder dem stumpfen Ende eines Bleistifts leicht an.

Dieses Vorgehen kann man bei den Versuchen zur richtigen Menge Euparal aus Kapitel 7.4 ebenfalls gut einüben. Auch beim Auflegen des Deckglases ist die Objektträgerschablone von großem Nutzen.

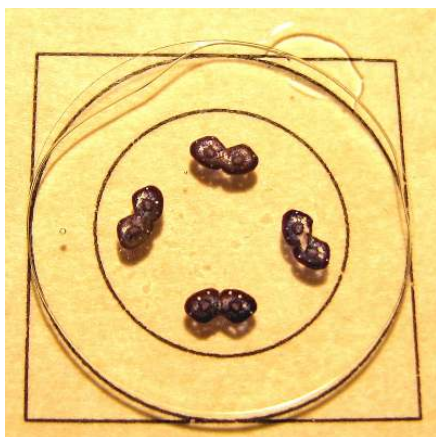


Abbildung 13: Präparat mit Euparal und frisch aufgelegtem Deckglas

Anschließend kann man das Ergebnis seiner Arbeit noch mal unter dem Mikroskop kontrollieren. Die Farben wirken im frischen Euparal noch etwas stumpf. Was sich mit dem Aushärten ändert.

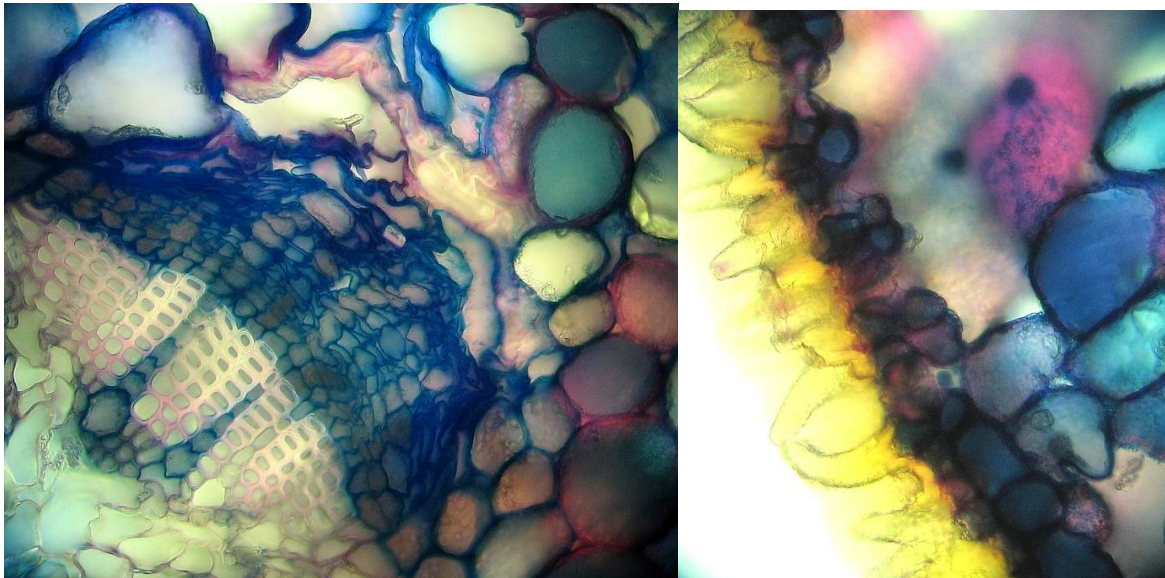


Abbildung 14: Zwei Bilder von einem frisch eingedeckten Schnitt, links ein Leitbündel, rechts Blattspalte zwischen Blatthaaren

7.6 Aushärten

Zum Aushärten belastet man das frische Präparat auf dem Deckglas mit einer Anzahl M8-Muttern. Dabei muss genügend Druck erzeugt werden, um die Probe und das Deckglas möglichst plan zu halten. Allerdings nicht so viel, dass das Euparal unter dem Deckglas hervorquillt.

In der Praxis haben sich 1 bis 4 Muttern bewährt. Für ein Präparat mit nur einem Schnitt oder besonders feinem Material reicht eine Mutter, bei mehreren Schnitten nimmt man je nach Dicke der Schnitte 3 bis 4 Muttern.



Abbildung 15: Eine M8 Mutter auf dem Deckglas, je nach Präparat können mehrere Muttern übereinander geschichtet werden, um den Schnitt plan zu bekommen.

Nach dem Auflegen der Gewichte müssen die Präparate ruhen. In der Heizperiode ist ein Heizkörper der ideale Platz. Ansonsten ist ein warmer trockener Platz zum Beispiel auf einem Schrank gut geeignet. In beiden Fällen für Staubschutz sorgen!

Dort bleiben die Präparate für 3 bis 6 Tage und werden täglich kontrolliert. Haben sich durch z.B. einen Volumenverlust Luftblasen am Deckglasrand gebildet, so kann man diese durch vorsichtiges Auftropfen von frischem Euparal auffüllen. Unschöne Kleckse am Deckglasrand lassen sich dabei allerdings nicht vermeiden.

Vorsicht, es sollten sich dabei keine geschlossenen Blasen unter dem Deckglas bilden, da diese nur sehr schwer wieder zu entfernen sind. Ist es doch passiert, hilft ein gezielter leichter Druck auf das Deckglas, um eine solche Blase zum Rand zu treiben.

Nach den ersten Tagen unter den Gewichten lagert man die Präparate noch für einige weitere Tage waagrecht, danach können sie stehend in den üblichen Präparatekästen aufbewahrt werden.

Tipp: Entlüften mit Unterdruck

Ein Präparat mit Luftblasen lässt sich oft noch retten, wenn man es vorsichtig einem leichten Unterdruck aussetzt. Dies erreicht man zum Beispiel mit einem ausreichend großen durchsichtigen Weithalsglas (der Objektträger muss waagrecht hinein passen), das mit einem passenden Stopfen mit einer Bohrung verschlossen wird.

Über ein entsprechendes Glasrohr und ein Stück PVC Schlauch (druckfest) kann man eine 100 ml Einwegspritze ansetzen, wie sie in Dosimeterpumpen verwendet wird. Durch Herausziehen des Kolbens wird Unterdruck erzeugt und man kann die Blasen wandern sehen. Den Kolben lässt man so langsam wieder zurück gleiten, dass die Blasen möglichst an ihrem neuen Platz bleiben. Dann beginnt das Spiel aufs Neue, bis sie den Rand des Deckglases erreicht haben.

Wenn man in einem Krankenhaus freundlich nachfragt, kann man vielleicht eine solche Spritze bekommen oder erfahren, woher man sie beziehen kann. Eventuell hilft auch hier der Apotheker.

8 Beschriften der Präparate

Jetzt muss das Präparat nur noch beschriftet werden. Zum einen, damit der Betrachter weiß, was er sich gerade anschaut, zum anderen auch für spätere Vergleiche mit entsprechenden Hinweisen zum Einschlussmittel und der verwendeten Färbemethode.

8.1 Materialien

- Das fertige Präparat
- Etiketten
- Fineliner
- Objektträgerschablone

8.2 Was sollte auf die Etiketten?

Die folgenden Informationen sollten auf den Etiketten eines Präparates enthalten sein:

- Bezeichnung des Organismus oder des Materials, von dem das Präparat stammt (hier „Schirmtanne“)
- Ggf. wissenschaftlicher Name - genaue Artbezeichnung (hier „*Sciadopitys verticillata*“)
- Bezeichnung des präparierten Teils und ggf. Schnittrichtung (hier „Nadel, quer“)
- Name des Präparators
- Einschlussmittel (hier „Euparal“)
- Färbung (hier „Etzold FCA“)
- Datum
- Ggf. eine Qualitätsstufe
- Ggf. eine Ordnungs- oder Referenznummer

Die ersten 3 Daten kommen zum Beispiel auf das linke, die verbleibenden auf das rechte Etikett.



Abbildung 16: Nach dem im Text erläuterten Muster beschriftete Objektträger

8.3 Gedanken zur Ordnung der Präparate

Mit der Zeit sammelt sich bei jedem Mikroskopiker eine größere Anzahl selbst erstellter und erworbener Präparate an. Schnell sitzt man auf mehreren Präparatekästen und stellt sich die Frage wo denn nun genau das gesuchte Stück ist.

Daher ist es neben der Beschriftung der Präparate selbst sinnvoll, an einer zentralen Stelle eine Liste der eigenen Präparate zu führen. Dies gibt die Möglichkeit, neben dem Aufbewahrungsort noch weitere Informationen zu den einzelnen Stücken festhalten zu können.

Eine solche Liste kann man ganz traditionell als Tabelle im Laborbuch oder einem eigenen Heft führen. Andererseits bietet sich auch eine Tabellenkalkulation wie z.B. Excel oder die Freeware Open Office an, deren komfortable Suchfunktion beim Auffinden bestimmter oder gleichartiger Präparate unterstützt. Wer sich auf die EDV verlässt, sollte aber unter keinen Umständen die Sicherungen vernachlässigen.

Hier ein Beispiel für den Aufbau einer Präparateübersicht:

- Referenznummer (diese findet sich auch auf dem Etikett des Präparates wieder)
- Kasten (die Nummer oder Bezeichnung des Präparatekastens, in dem das Präparat liegt)
- Platz (Nummer des Steckplatzes im Präparatekasten)
- Status (beispielsweise zur Kennzeichnung von verliehenen Präparaten)
- Qualität (Qualitätsstufe des Präparates)
- Präparator
- Name (Bezeichnung des Organismus oder des Materials, von dem das Präparat stammt)
- Wissenschaftlicher Name (soweit sinnvoll und bekannt)
- Bezeichnung (Bezeichnung des präparierten Teils und ggf. Schnitttrichtung)
- Reich (Ordnungsmerkmal, zum Beispiel: zoologisch, botanisch, Mineral, Materialprobe, etc.)
- Färbung (verwendetes Färbeverfahren)
- Einschlussmittel
- Erstellungsdatum
- Bemerkung

Tipp: Datensicherheit

Nur ein lesbares Backup ist ein gutes Backup. Daher nach jeder Sicherung anhand einiger Beispieldateien probieren, ob auch die Rücksicherung klappt.

9 Was zeigt das Präparat?

Hier nun anhand einiger Bilder eine Beschreibung des Aufbaus der erstellten Querschnitte durch eine Nadel der Schirmtanne. In Detailbildern werden die einzelnen Gewebearten erläutert und es wird kurz auf deren Funktion eingegangen.

Viele der Erläuterungen dieses Kapitels lassen sich auch auf andere pflanzliche Schnitte übertragen. Dies gilt natürlich insbesondere für die Querschnitte der Blattnadeln anderer Nadelbäume.

9.1 Übersicht



Abbildung 17: Überblick über den gesamten Nadelquerschnitt

In der Übersicht über den gesamten Querschnitt der Schirmtannennadel im fertigen Präparat kann man gut den für Nadelbäume ungewöhnlichen zweiflügeligen Aufbau erkennen.

Schon hier lassen sich die unterschiedlichen Gewebearten erkennen.

9.2 Leitbündel

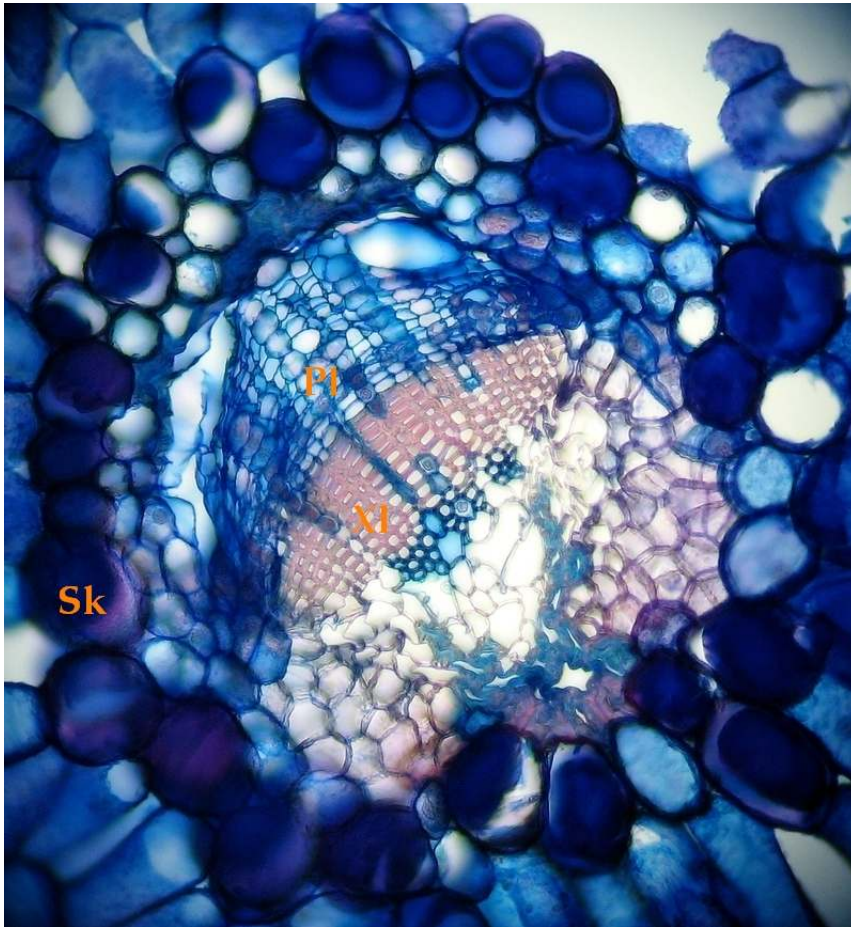


Abbildung 18: Eines der zwei Leitbündel der Schirmtannennadel mit Phloem (Pl), Xylem (Xl) und Sklerenchym (Sk)

Abbildung 18 zeigt eines der beiden Leitbündel in der Schirmtannennadel (bei den meisten Nadelbäumen haben die Nadeln je nur ein Leitbündel).

Das Leitbündel besteht aus dem verholzten Xylem (Xl, durch das Fuchsin der Etzoldschen Farbmischung hier leicht rötlich angefärbt) und dem nicht verholzten Phloem (Pl), das hier blau gefärbt ist. Beide Leitgewebetypen sind von einer Bündelscheide (Sk, Sklerenchym) umgeben.

Über das Xylem gelangen Wasser und Nährsalze von den Wurzeln zu den Zellen der Nadel. Die Zellen des Xylems sind abgestorben und haben eine hohe Leitfähigkeit. Ein großer Teil des hoch transportierten Wassers verdunstet über die Nadel und hält so den ständigen Zufluss von den Wurzeln aufrecht.

Über die nicht verholzten, lebendigen Zellen des Phloems erfolgt der sehr viel langsamere Rücktransport der bei der Photosynthese gebildeten organischen Nährstoffe zu den Wurzeln.

9.3 Palisadenparenchym

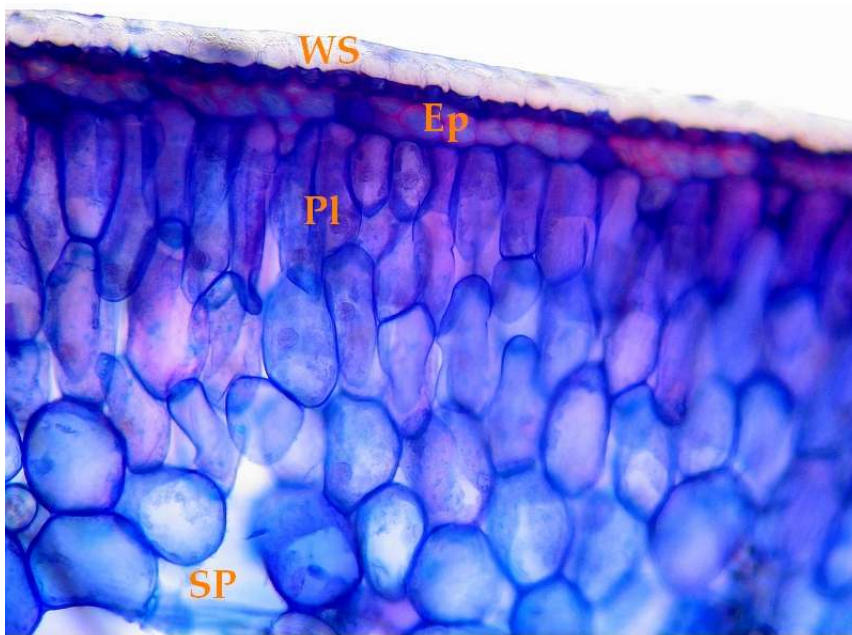


Abbildung 19: Dicht stehende Zellen des Palisadenparenchyms. Wachsschicht (WS), Epidermis (Ep), Palisadenparenchym (Pl) Schwammparenchym (SP)

Abbildung 19 zeigt den Aufbau der Blattoberseite. Ganz außen liegt eine vor Umwelteinflüssen schützende Wachsschicht, gefolgt von den Zellen der Blatthaut (Epidermis).

Darunter liegen 2 bis 3 Zellreihen, die besonders dicht stehen und deshalb Palisadenparenchym genannt werden. Die Zellen des Palisadenparenchyms tragen mit ihren vielen Chloroplasten den größten Teil zur Photosyntheseleistung der Nadel bei.

Bei der in der vorliegenden Anleitung beschriebenen AFE Fixierung bleiben die Chloroplasten in der Regel erhalten und zeichnen sich in den Zellen als runde Strukturen ab. Oft ist so auch der Zellkern zu sehen. Der grüne Blattfarbstoff (Chlorophyll) wird allerdings bei der Fixierung ausgeschwemmt bzw. zerstört.

9.4 Harzkanal

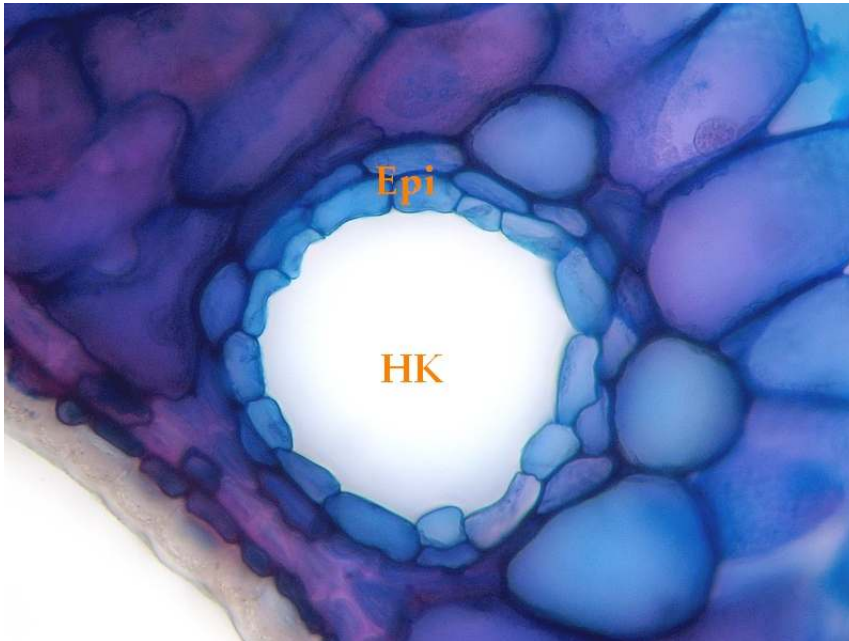


Abbildung 20: Harzkanal (HK) mit 2-lagigem Epithel (Epi)

Abbildung 20 zeigt einen Harzkanal, der von einem 2-lagigen Epithel. Das Harz in den Harzkanälen dient wohl dem Fraßschutz und macht sich beim Knicken einer Nadel durch seinen Duft bemerkbar. Es wird von den Zellen des Epithels gebildet, die gleichzeitig das umliegende Gewebe vor dem Harz schützt.

9.5 Blattspalte

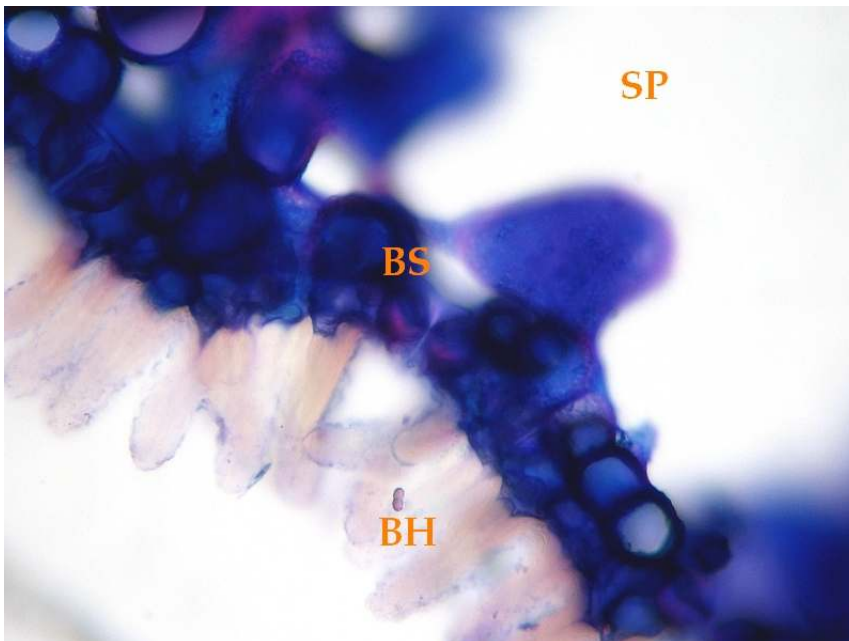


Abbildung 21: Blattspalt (BS) an der Nadelunterseite, umgeben von Blatthaaren (BH). Zum Blattinneren hin folgt das Schwammparenchym (SP)

Über die Blattspalte findet bei Nadeln und Blättern der Gasaustausch mit der Umgebung statt. Die Spalte werden über das Anschwellen der Spaltzellen geschlossen. Dazu nimmt die Spaltzelle Wasser auf. Der Spalt (BS) im Bild ist leicht geöffnet.

Bei der Schirmtanne finden sich die Blattspalte nur in dem behaarten Streifen an der Nadelunterseite. Die Blatthaare (BH) sind hier ebenfalls zu erkennen.

Die Spalte öffnen sich in Richtung Blattinneres zum lockeren Zellgewebe des Schwammparenchyms.

9.6 Blattoberseite mit Epidermis

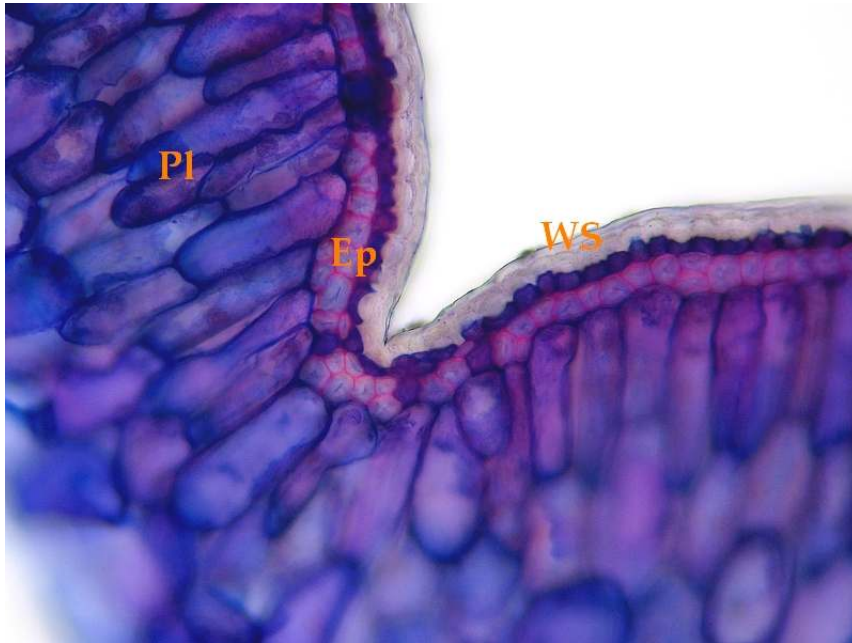


Abbildung 22: Furche an der Nadeloberseite mit Wachsschicht (WS), Epidermis (Ep) und Palisadenparenchym (Pl)

Abbildung 22 zeigt die Mittelfurche an der Nadeloberseite. Schön zu erkennen ist wieder die Wachsschicht (WS), die Epidermis (Ep) aus zwei teilweise verholzten Zellschichten (die rote Färbung durch Fuchsin weist auf verholzte Zellen hin) sowie das Palisadenparenchym (Pl).

9.7 Astrosklereid, ein Idioblast

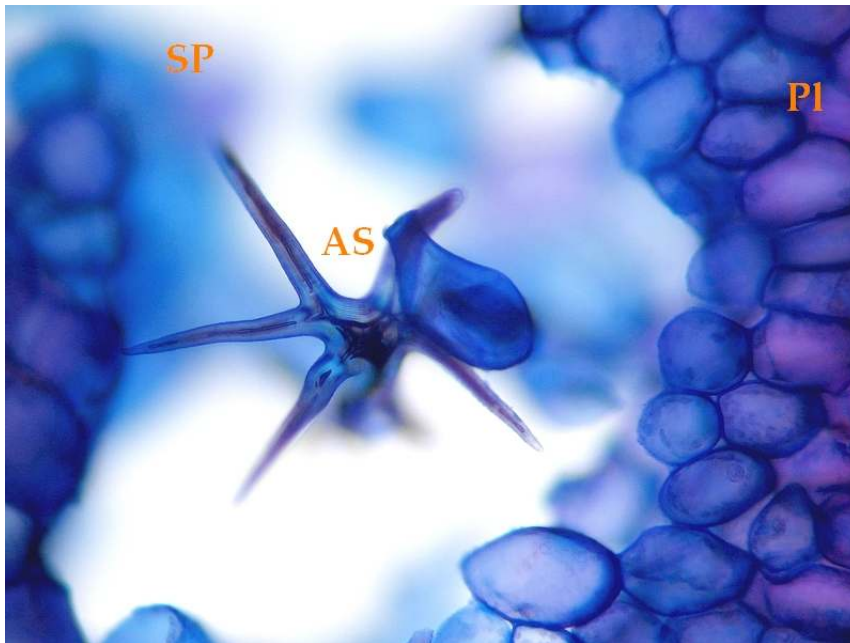


Abbildung 23: Astrosklereid (AS) im umgebenden Schwammparenchym (SP), am rechten Bildrand das Palisadenparenchym (PI)

Bei manchen Schirmtannen enthalten die Nadeln noch einen weiteren Zelltyp, der sich deutlich vom umgebenden Zellgewebe unterscheidet. Solche Zellen nennt man Idioblasten.

Der Name Astrosklereid bezeichnet eine Sternförmige Zelle. Die Funktion in der Nadel ist nicht abschließend geklärt. Eventuell dient dieser Zelltyp auch dem Fraßschutz.

Literaturverzeichnis

Bücher

Das große Buch der Mikroskopie

Bruno Kremer, Kosmos, ISBN 978-3-440-08989-7, 317 Seiten

Einführung in die Mikroskopie mit kurzer Beschreibung des Mikroskops. Im Hauptteil Kurzanleitungen zur Präparation pflanzlicher und tierischer Gewebe, sowie Dünnschliffe von Kristallen. Auch das Leben im Wassertropfen kommt nicht zu kurz. Im Anhang knappe Beschreibungen und Rezepte zur mikroskopischen Technik, Kontrastverfahren, Färbungen und Erstellung von Dauerpräparaten.

Botanische Mikrotechnik

Dieter Gerlach, Thieme, antiquarisch, 1969 oder 1977, 298 Seiten

Methoden und Rezepte von der Fixierung über das Schneiden, Färben bis zur Erstellung von Frisch- und Dauerpräparaten aus pflanzlichen Materialien.

dtv-Atlas zur Biologie, Band 1

Günter Vogel/Hartmut Angermann, ISBN 3-423-03221-9, 223 Seiten

Nachschlagewerk zum Aufbau der Zellgewebe.

Anatomie der Pflanze

Hans Molisch, Verlag Gustav Fischer, Jena, antiquarisch 1920, 144 Seiten

Beschreibung der Pflanzenanatomie von der Wurzel bis zur Blattspitze mit vielen Zeichnungen. Pflanzen werden in den Beispielen in der Regel nur mit ihrem Wissenschaftlichen Namen genannt. Kann als Anregung für eigene Zeichnungen dienen.

Web-Links

Mikro-Forum

Christian Linkenhelds deutschsprachige Plattform für Mikroskopie.

<http://www.mikroskopie-forum.de>

Mikroskopische Färbe- und Fixiermethoden und Rezepte

Armin Eisners Seite enthält eine Vielzahl von Methoden und Rezepten zur Färbung und Fixierung pflanzlicher und tierischer Präparate.

<http://www.aeisner.de/>

Site der Münchner Mikroskopischen Vereinigung

Die Website der Münchner Mikroskopischen Vereinigung enthält eine Vielzahl nützlicher Informationen und Links rund um das Thema Mikroskopie. Unter Anderem die Mikrofibel von Hr. Henkel und eine Kaufberatung.

Es gibt Fachartikel zu vielen Themen, wie zum Beispiel Köhlersche Beleuchtung, Kameraadaptation, und Schnitttechniken, ein Besuch lohnt sich immer!

<http://mikroskopie-muenchen.de/>

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Werkzeuge, Unterschriften entsprechen Kapitelnummerierung.....	5
Abbildung 2: Einseitige Rasierklingen.....	6
Abbildung 3: Holundermark.....	7
Abbildung 4: Reagenzien, Unterschriften entsprechen Kapitelnummerierung.....	9
Abbildung 5: Stücke von der Schirmtannennadel im Probenglas fixiert mit AFE.	11
Abbildung 6: Ein Stück der Schirmtannennadel im bekanteten Holundermark.....	12
Abbildung 7: Ein frischer Schnitt in Wasser und ohne Deckglas.....	14
Abbildung 8: Wässern der Schnitte.....	15
Abbildung 9: Schnitte in Wasser direkt nach Zugabe der Farblösung.....	15
Abbildung 10: Schnitte am Ende der Färbung.....	16
Abbildung 11: Eine einfache Objektträgerschablone.....	19
Abbildung 12: Arrangieren der Schnitte auf dem Objektträger mit Hilfe der Schablone.	20
Abbildung 13: Präparat mit Euparal und frisch aufgelegtem Deckglas.....	21
Abbildung 14: Zwei Bilder von einem frisch eingedeckten Schnit.....	22
Abbildung 15: Eine M8 Mutter auf dem Deckglas.....	22
Abbildung 16: Nach dem im Text erläuterten Muster beschriftete Objektträger.....	24
Abbildung 17: Überblick über den gesamten Nadelquerschnitt.....	26
Abbildung 18: Eines der zwei Leitbündel der Schirmtannennadel.....	27
Abbildung 19: Dicht stehende Zellen des Palisadenparenchym(s).....	28
Abbildung 20: Harzkanal (HK) mit 2-lagigem Epithel (Epi).....	29
Abbildung 21: Blattspalt (BS) an der Nadelunterseite.....	29
Abbildung 22: Furche an der Nadeloberseite.....	30
Abbildung 23: Astrosklereid (AS) im umgebenden Schwammparenchym (SP).....	31

Index

AFE	Siehe Fixierlösung	
Alcianblau.....	10	
Alciangelb.....	10	
Astrablau	10	
Astrosklereid.....	20, 31	
Augenwatte	8 , 18	
Aushärten	22	
Balsam	Siehe Euparal	
Benzin.....	Siehe Wundbenzin	
Beschriften.....	23–25	
Besteckmappe	8	
Bezugsquellen.....	11	
Blatthaare.....	30	
Blattspalte	29	
Chlorophyll	28	
Chloroplasten.....	28	
Chrysoidin.....	10	
Datensicherheit.....	25	
Deckgläser	6 , 18	
-reinigung	18	
Differenzieren	17	
Eindecken	18–23	
Einmalhandschuhe.....	19	
Einwirkzeit	16	
Eisner, Armin.....	10, 32	
Entlüften	23	
Entwässern	17	
Epidermis.....	28	
Epithel	29	
Essigsäure	Siehe Fixierlösung	
Ethanol	9 , 12, 14	
vergällt	9	
Etiketten.....	8 , 23	
Etzold Grün.....	10	
Etzold's Farbgemisch.....	10 , 14	
Euparal.....	10 , 18	
verdünntes Einschlussmittel.....	19	
Färben.....	14–18	
Arbeiten auf dem Objektträger	15	
Schnellfärbung	16	
FCA.....	Siehe Etzold's Farbgemisch	
Fineliner.....	8 , 23	
Fixierlösung	9	
AFE.....	11	
Fixierung	11	
Formalin	Siehe Fixierlösung	
Freihandschneiden	12	
Fuchsin	10	
Harzkanal.....	29	
Holundermark.....	7 , 12	
Idioblast.....	20, 31	
Isopropanol.....	9 , 14, 18	
Köhlersche Beleuchtung	32	
Leinenläppchen.....	8	
Leinenlappen	18	
Leitbündel.....	27	
Phloem.....	27	
Sklerenchym	27	
Xylem.....	27	
Linkenheld, Christian.....	4, 32	
Mikrofibel.....	32	
Mikro-Forum	4, 32	
Mikroskop.....	13 , 18, 22	
Mikrotomschnitt	12	
Mutter, M8	7 , 18, 22	
Objektträger	6 , 12, 14, 18	
-reinigung.....	18	
Objektträgerschablone	7 , 18, 20, 23	
Palisadenparenchym.....	28	
Photosynthese	27, 28	
Pinzel.....	5 , 12, 14, 18	
Pinzette, Deckglas-.....	6 , 18	
Pipette.....	5 , 14	
Präparateübersicht.....	25	
Präpariernadel.....	5	
Zahnarztbesteck	8	
Probennahme.....	11	
Rasierklinge	6 , 12	
Rasiermesser	12	
Schere.....	5 , 11	
Schnitte	12–14	
Schwammparenchym.....	30	

Skalpell.....	12	Tropfstäbchen.....	20
Spiritus	10, 18	Tropfverhalten.....	21
Stäbchen.....	5	Uhrglas	6, 14
Glasstäbchen.....	5	Wachsschicht	28
Holzstäbchen.....	18, 20	Wasser, destilliertes.....	9, 14
Stereomikroskop.....	13, 18	Weithalsflasche.....	7
Trog	7	Sammelgläschen.....	11
Färbetrog	7, 14	Wundbenzin	10, 18
Spültrog	7, 12, 14		