



# **Pflanzenschnitte: Schneiden, Färben, Einschließen**

**Klaus Spiekermann**

**19. Januar 2019**

Mit Dank an Bob Lammert für die Herstellung der Klingenhalter!

# Programm

Schneiden, Färben und Einschließen von 2 vorbereiteten Pflanzenstielen:

- Efeu
- Ginkgo

Verschiedene Mikrotome sind vorhanden:

- Tisch Zylinder Mikrotome
- Haga Rasiermessermikrotom
- Uchida Tischmikrotom

Zwei Mehrfachfärbungen werden angewendet:

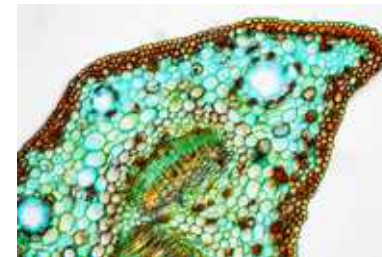
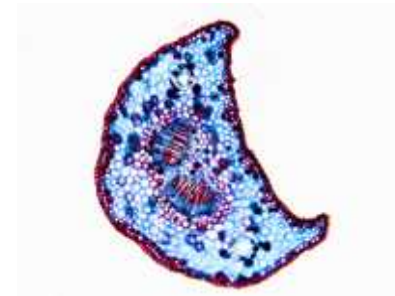
- Etzold's Farbgemisch
- Wacker W3A

Einbetten in Euparal, Anhärten im Trockenschrank

Danach:

**Kurzvortrag:** Mikrotome, Färbemethoden, Anatomie von Efeustiel und Ginkgo

# So soll es werden.....



# Sicherheit

Obwohl wir nur mit sehr kleinen Mengen hantieren, müssen wir über einige der verwendeten Stoffe Folgendes wissen:

Ethanol 70%, leicht entzündlich,



Isopropanol 100%, leicht entzündlich, reizend,

Formalin 35%, giftig, Bestandteil des AFE,



Essigsäure, ätzend, Bestandteil des AFE,



Euparal, entzündlich, giftig.

Die verwendeten Werkzeuge können zu Schnittverletzungen führen: die Klingen sind sehr scharf, Deckgläser können brechen und wie scharfe Klingen wirken.

Alle **Farbstoffe** sind kaum aus der Kleidung zu entfernen.

**Bitte ruhig und sorgfältig arbeiten**

# Schneiden

Die Proben wurden mit dem Skalpell in 1-2 cm lange Stücke geschnitten und in AFE\* fixiert.

Zunächst zum Üben Schnitte ohne Probe durchführen, dann:

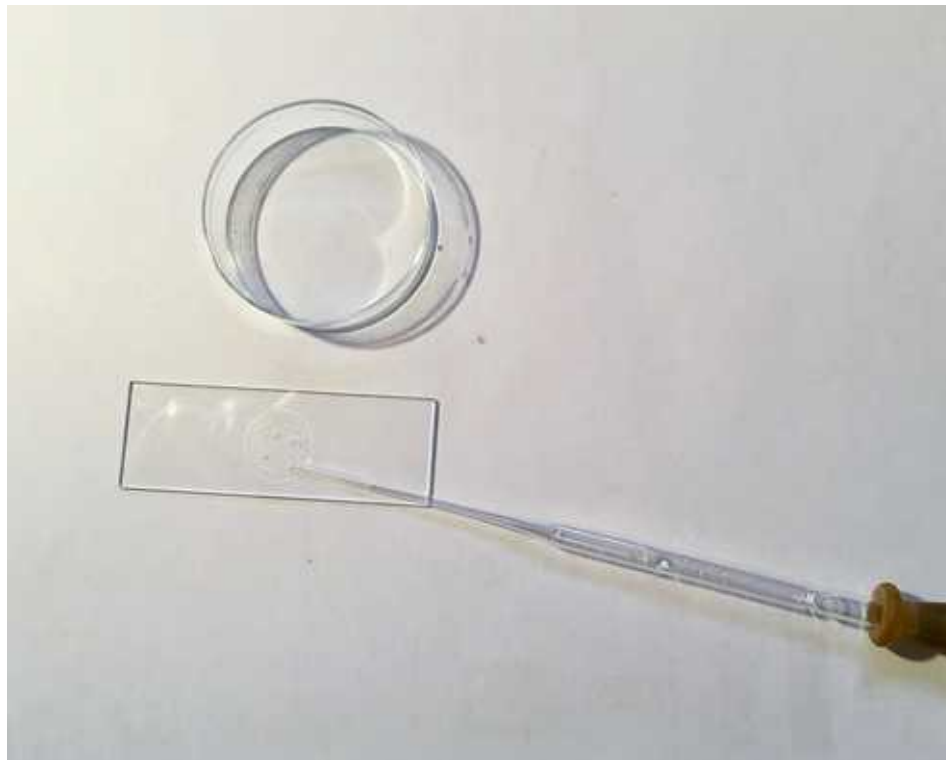
Probe in Möhre oder Holunder einbetten, oben pyramidenförmig anspitzen.	In Mikrotom einspannen.	Grob anschneiden mit alter Klinge.	6 Schnitte mit 50-100 $\mu$ anfertigen. Neue Klinge und Probe mit Ethanol anfeuchten.	Mit Pinsel auf Hohlsliff OT in 70% Ethanol übertragen. Eventuell Handlupe nutzen.
---	-------------------------	------------------------------------	---	---



\*AFE: Alkohol, Formalin, Essigsäure. 90 Teile 70% Ethanol, 5 Teile 35% Formalin, 5 Teile 99% Essigsäure

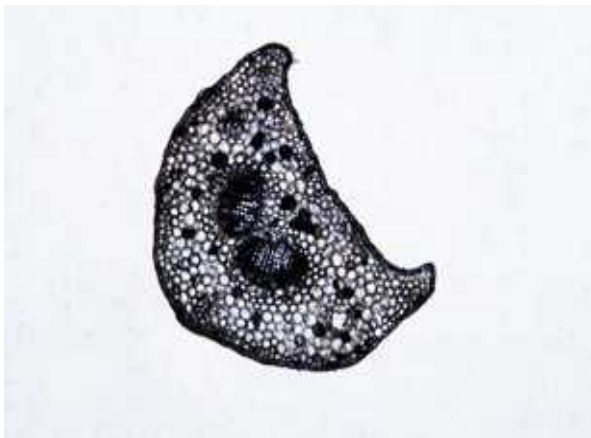
# In Aqua dest. überführen

70% Ethanol absaugen.	3 Tropfen 50% Ethanol zufügen und 2x austauschen. 50% Ethanol absaugen.	3 Tropfen 30% Ethanol zufügen und 2x austauschen. 30% Ethanol absaugen.	3 Tropfen Aqua dest. zugeben und 3x austauschen. Schnitte in Aqua dest. belassen.
--------------------------	---	---	---



# Färben(gilt für Etzold und Wacker W3A)

Zu dicke Schnitte und evtl. Verunreinigungen mit Pinsel entfernen. (Stereolupe)	1-2 Tropfen der vorbereiteten Farblösung* hinzugeben. Gut vermischen.	Gemisch 2-3x über Spiritusflamme erhitzen, nicht kochen! Färbung unter Stereolupe kontrollieren.	Farblösung absaugen, 3x Aqua dest. zufügen und absaugen.
--	---	--	--

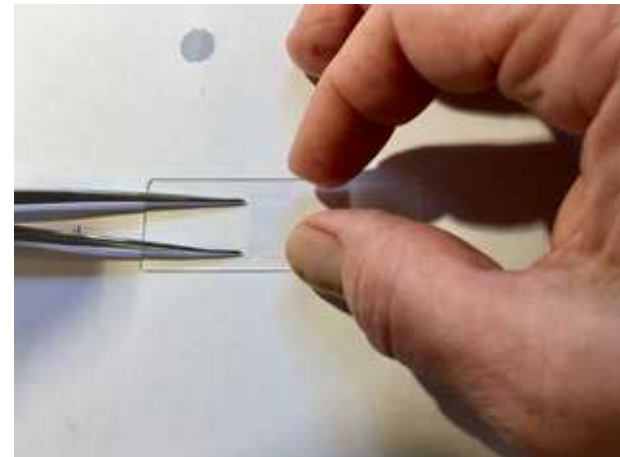


\*Etzold: 1 Tropfen in 10 Tropfen Aqua dest.. Wacker W3A: 1 Tropfen Acriflavin/Acridinrot und 4 Tropfen Astrablau in 20 Tropfen Wasser

# Einbetten

Überführen in Isopropanol: 3 Tropfen Isopropanol hinzufügen, absaugen.	Vorgang 3x wiederholen. Schnitte unter Stereolupe korrigieren, die 3-4 besten auswählen.	Mit trockenem, isopropanolfeuchtem Pinsel die besten Schnitte mittig auf einen sauberen Objektträger überführen.	1-2 Tropfen Euparal* mittig auf die Schnitte geben und sauberes Deckglas vorsichtig aufsetzen, dabei Pinzette als Platzierungshilfe benutzen.	Präparat beschriften und in den Trockenschrank (50 Grad C) legen.

**Das Aushärten kann einige Wochen dauern. Insbesondere in den ersten 3 Tagen: Vorsicht beim Betrachten unter dem Mikroskop: Objektive dürfen nicht mit Euparal in Berührung kommen!**



\* Euparal verträgt sich nicht mit Wasser, deshalb möglichst alle Feuchtigkeit entfernen



# Mikrotome (1)

## Schlittenmikrotom



Gilt für alle professionellen Mikrotome:

- Schwere Geräte, mehrere Kilogramm;
- Präparate werden in Paraffin eingebettet;
- Hohe Präzision: sehr dünne Schnitte möglich;
- Messer extrem scharf und teuer, werden teilweise selbst geschärft

Bearbeitung der Schnitte ist umständlich, Paraffin muß erst mit Lösemittel (Xylol) entfernt werden.

# Mikrotome (2)

## Rotationsmikrotom



# Grundlagen: Fixierung

Die Fixierung erhält und härtet Gewebe

- Unterbrechung der Stoffwechselaktivitäten;
- Abtötung von Mikroorganismen;
- Vermeidung von Gewebeschrumpfung.

Typische Fixierlösung\* für Pflanzenschnitte:

**AFE** (Ethanol 70%, Formalin 35%, Essigsäure 99% im Volumenverhältnis 90:5:5)

- Probenlänge ca. 10mm;
- Aufbewahrung in kleinem Glasbehälter;
- Minimum über Nacht bevor geschnitten wird, verholzte Proben länger.

\* Alternativ kann auch Ethanol 70% verwendet werden



# Grundlagen: Färbung

Art der Farbstoffbindung an Zelltypen und Zellstrukturen ist unterschiedlich

- Elektrostatische Anbindung
- Chemische Anbindung
- Komplexbildung

Rezepturen sind empirisch entwickelt worden.

# Beispiele für Färbungen von Pflanzenanschnitten

- **Einfachfärbung:** z. B. Methyleneblau oder Karmin;
- **Mehrfachfärbungen** (nacheinander):
  - Zweifachfärbungen: z. B. Anilinblau, Fuchsin
  - Dreifachfärbungen: z. B. Wacker-Färbung (Acridinrot, Acriflavin, Astrablau);
- **Simultanfärbung:** (Färbung erfolgt in einem Arbeitsgang):
  - z. B. Etzold's Farbgemisch oder Wacker W3A

## Etzold's Farbgemisch

**F:** Fuchsin, rotblauer Farbstoff

**C:** Chrysoidin, goldgelber Farbstoff

**A:** Astrablau, blauer Farbstoff

## Wacker W3A

**A:** Acridinrot, orangeroter Farbstoff

**A:** Acriflavin, rötlicher Farbstoff

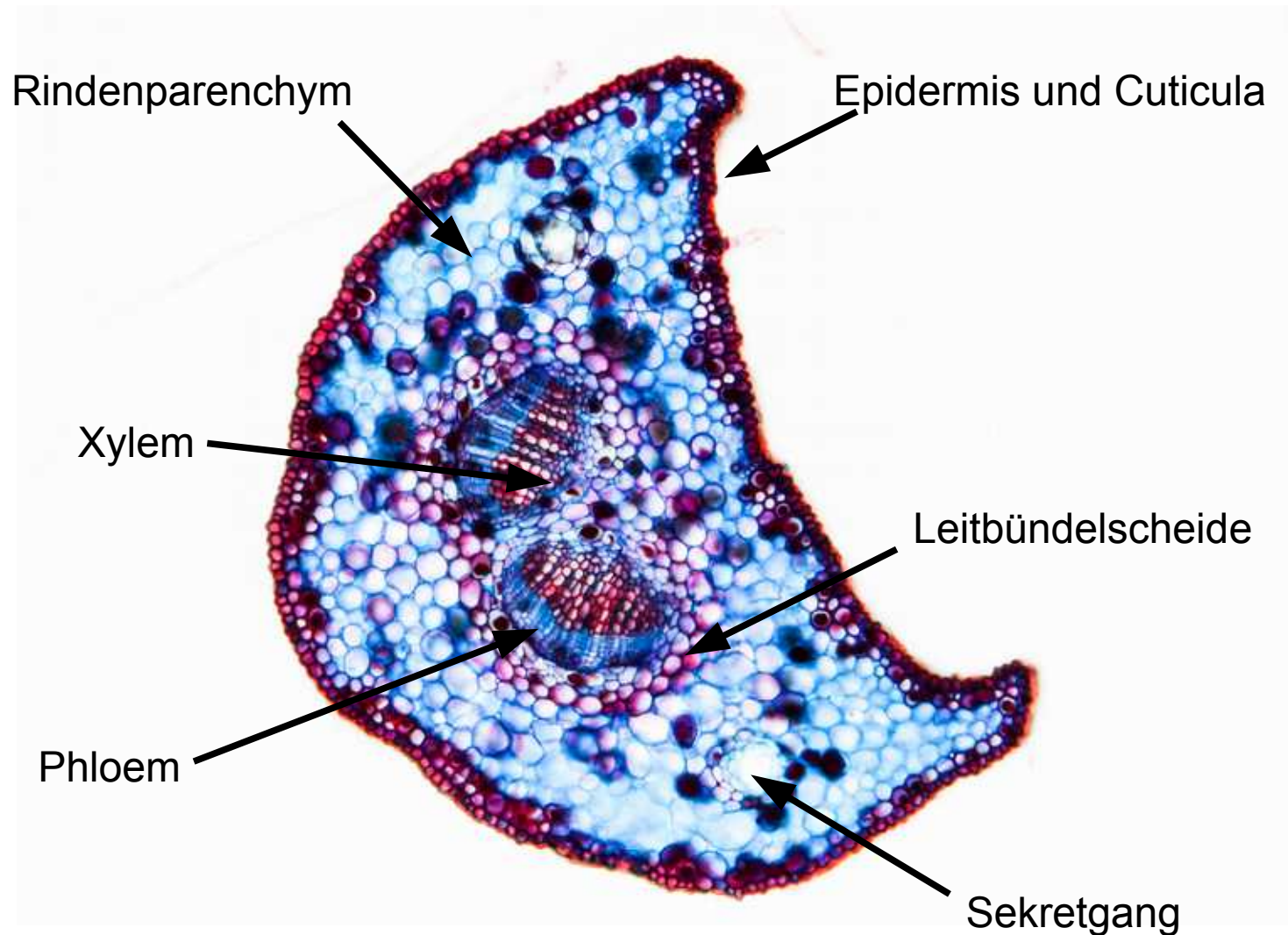
**A:** Astrablau, blauer Farbstoff

# Ginkgo / Schnitt durch Blattstiel





# Schnitt durch Stiel Ginkgo Färbung Etzold

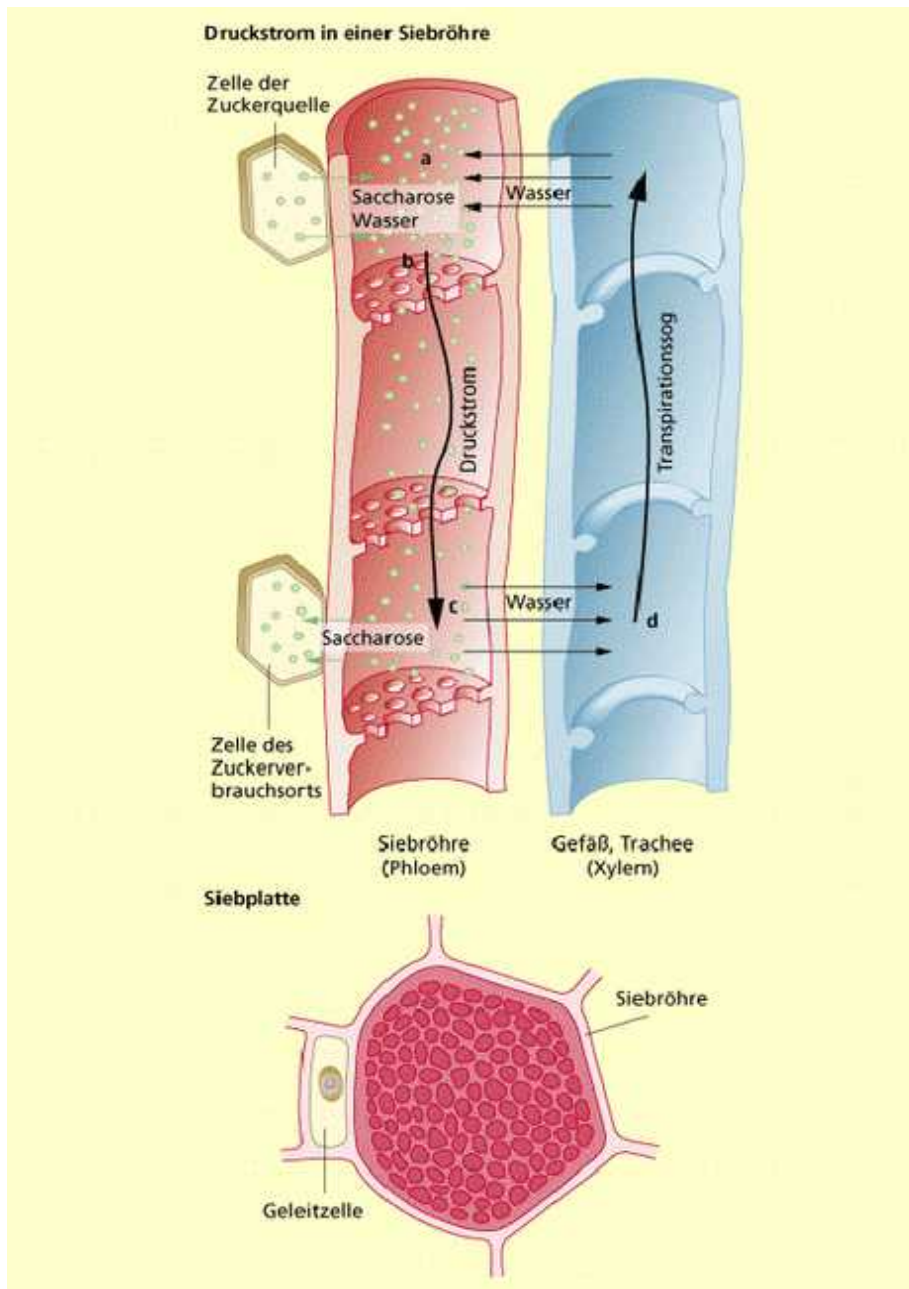


# Ergebnis Färbungen

Etzold`s Farbgemisch (FCA)	Wacker W3A
<p>Verholzte Zellwände in verschiedenen Rottönen:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Schichten einer Zellwand in verschiedenen rot bis orange Tönen.</li></ul>	<p>Verholzte Zellwände: Wie Etzold</p>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Cutinisierte Zellwände gelb bis orange (Chrysoidin wird aber nicht leicht aufgenommen)</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Cutinisierte Zellwände hellrosa</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Unverholzte und nicht cutinisierte Zellwände blau</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Unverholzte Zellwände blau bis grün</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Plasma leicht rot.</li><li>• Zellkerne rot oder blau.</li><li>• Chloroplasten oliv bis braun</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Zellkerne tiefrot</li></ul>



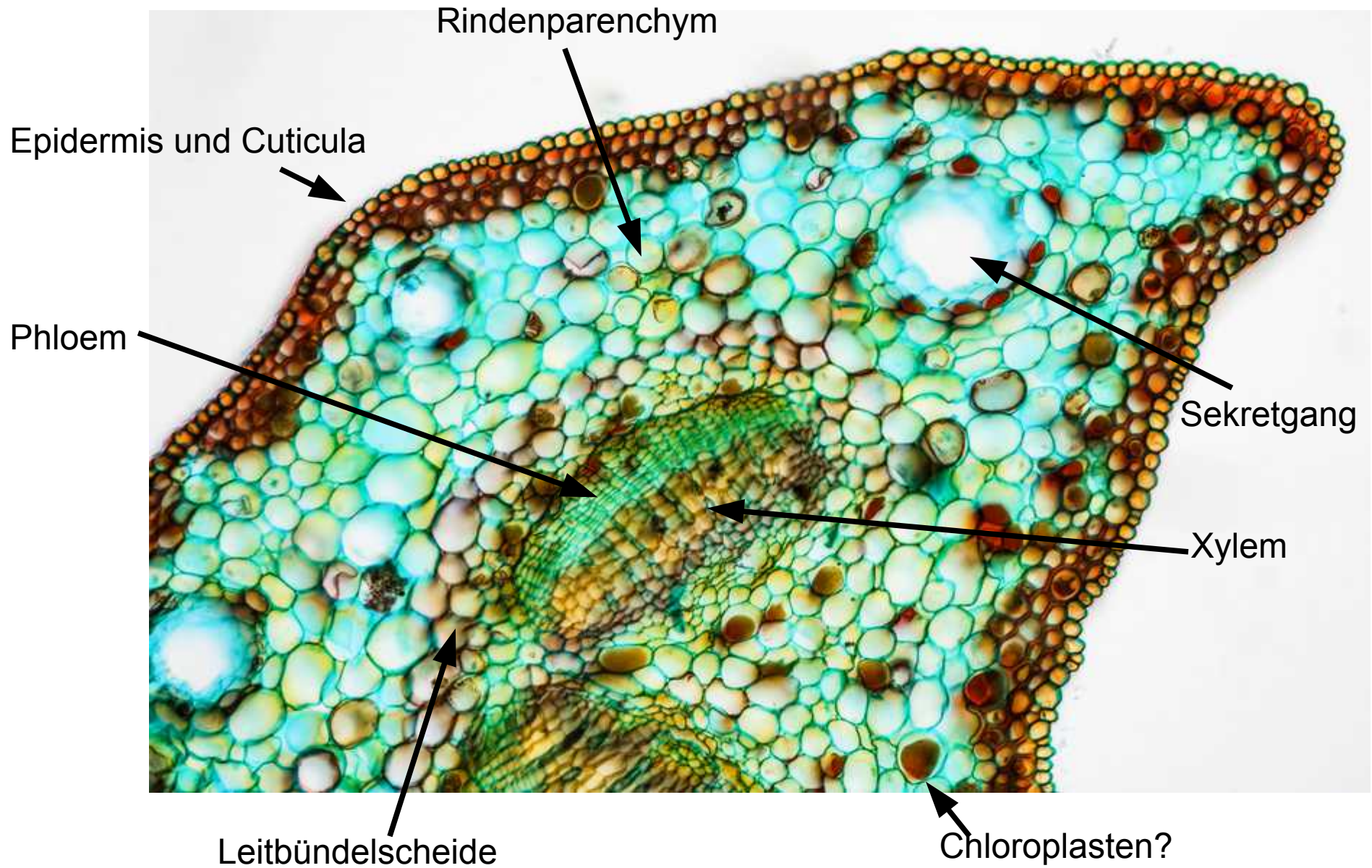
# Anatomie von Pflanzenschnitten des Stiels : Xylem und Phloem



**Xylemzellen** (Tracheen) sind abgestorben mit verstärkten Ligninwänden (verholzt). Wassertransport durch Kapillarwirkung.

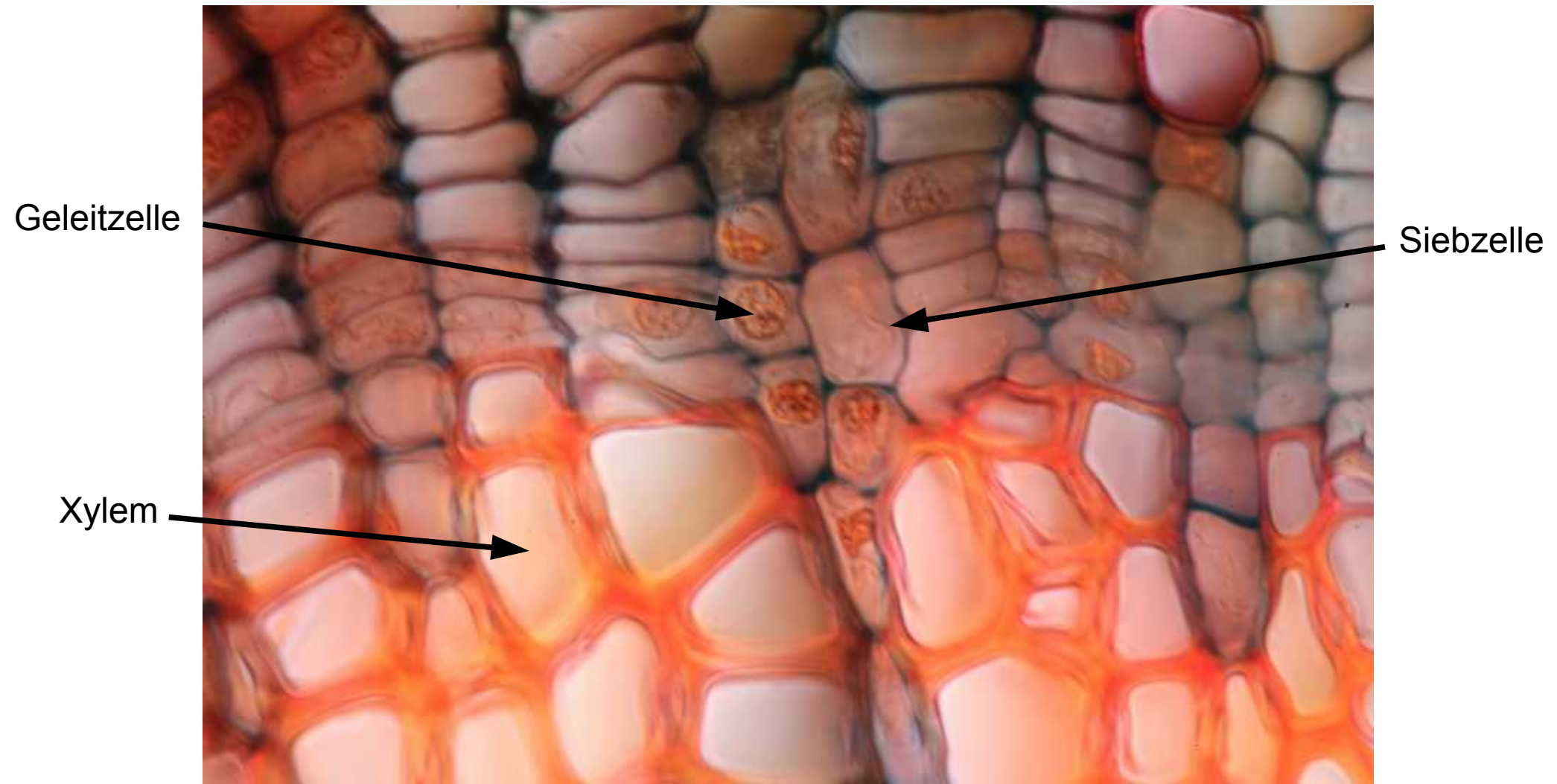
**Siebröhren** sind lebende, jedoch unvollständige Zellen. Sie benötigen die Geleitzellen, um ihre Funktion zu erfüllen. Transport von Zuckern und Aminosäuren durch osmotischen Druck.

# Schnitt durch Stiel Ginkgo Färbung W3A





# Ginkgo Siebzellen und Geleitzellen



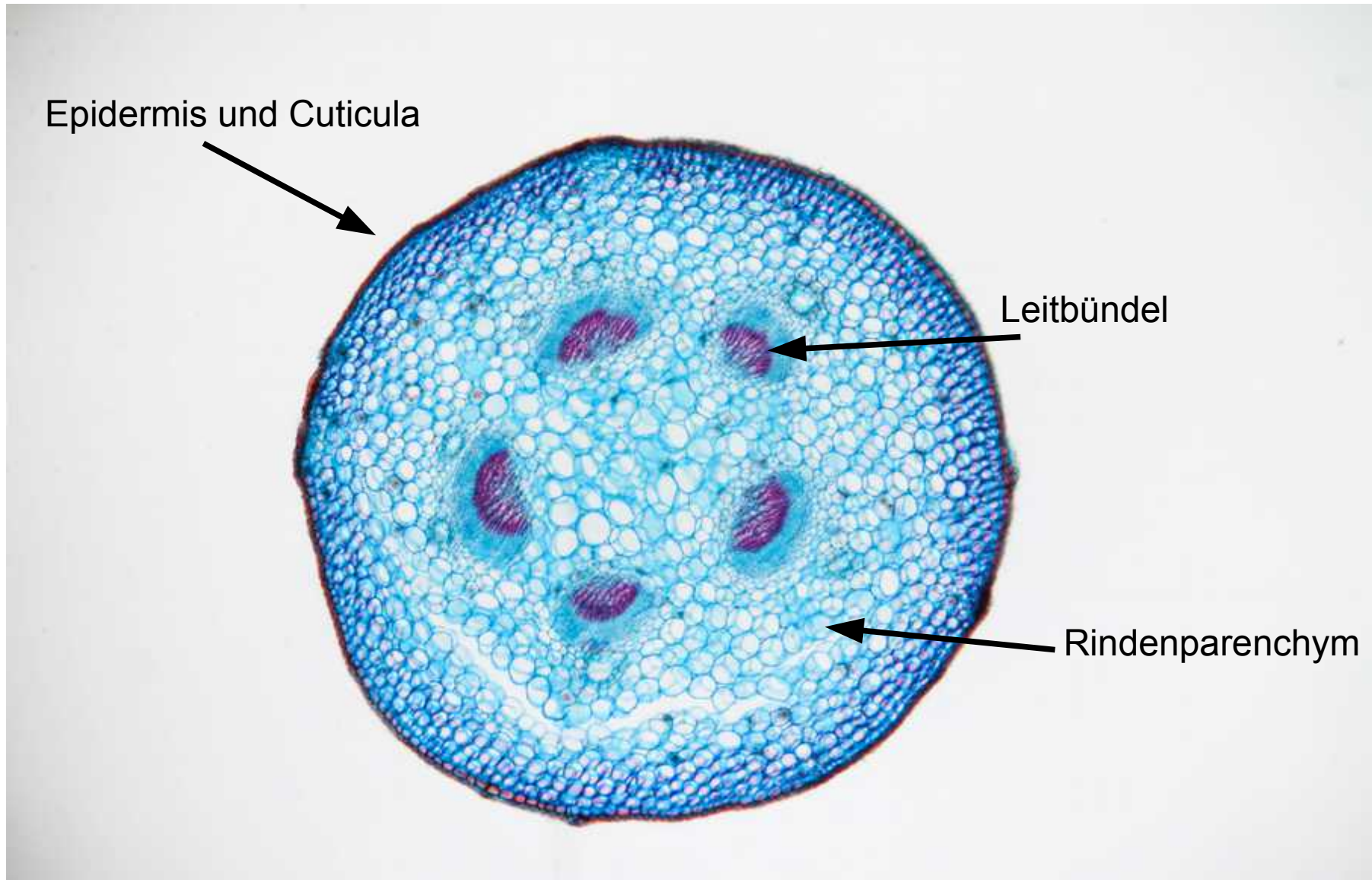
# Efeu / Schnitt durch Blattstiel



[www.baumkunde.de](http://www.baumkunde.de)

Bitte vorbereitete Proben mikroskopieren und Strukturen nachvollziehen!

# Schnitt durch Stiel Efeu Färbung W3A

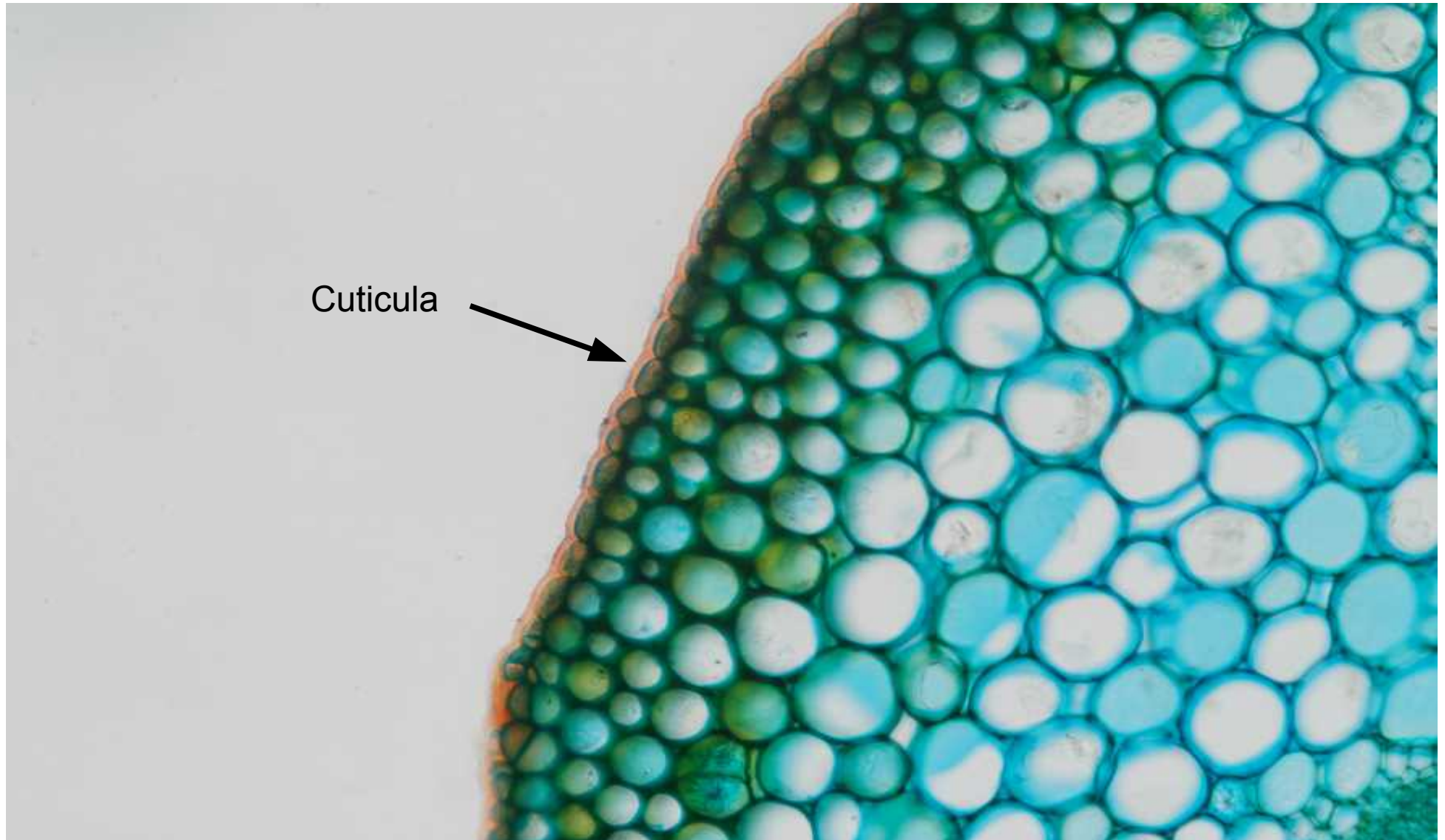




# Schnitt durch Stiel Efeu Färbung Etzold

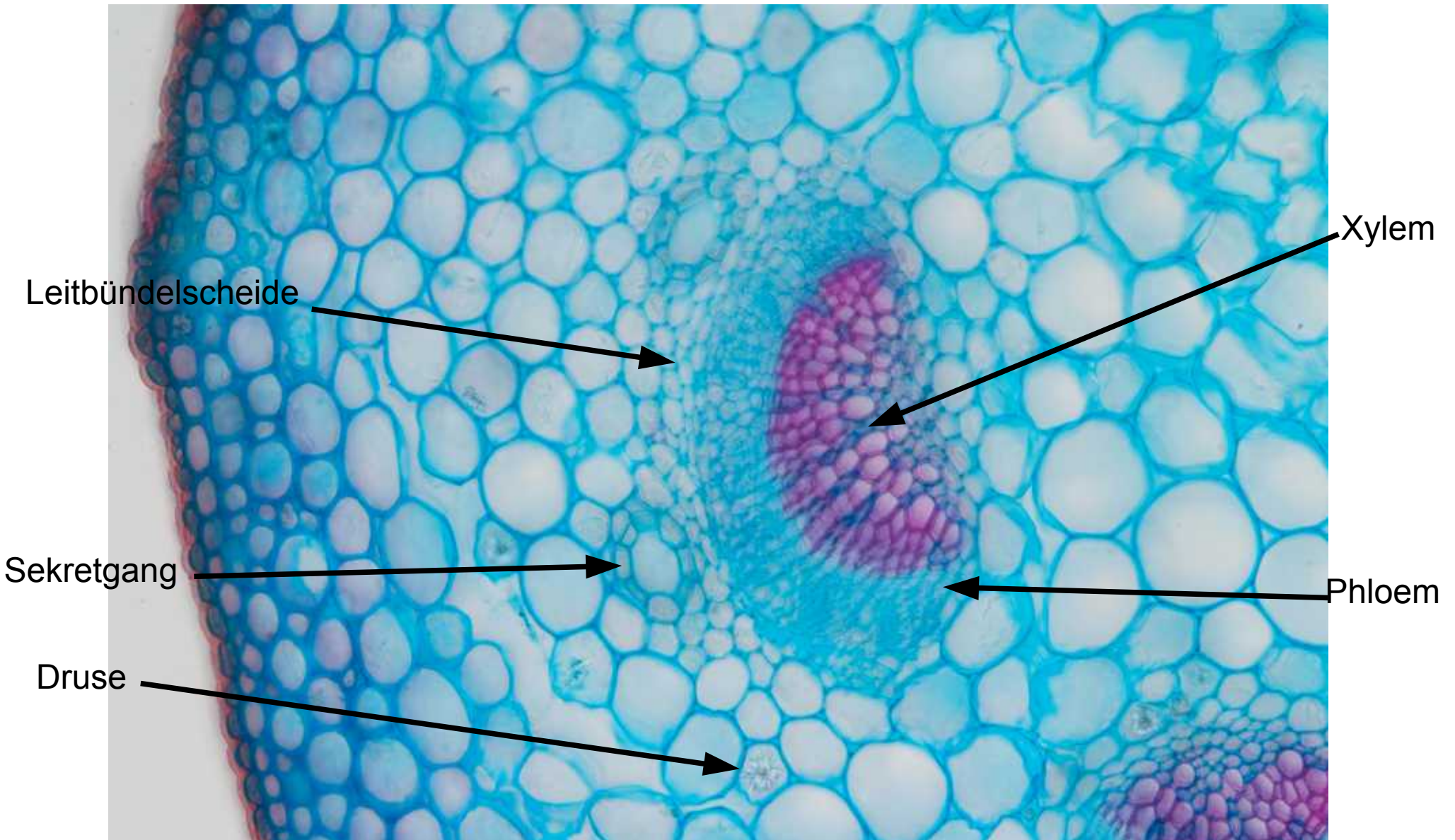


# Schnitt durch Stiel Efeu Färbung Etzold



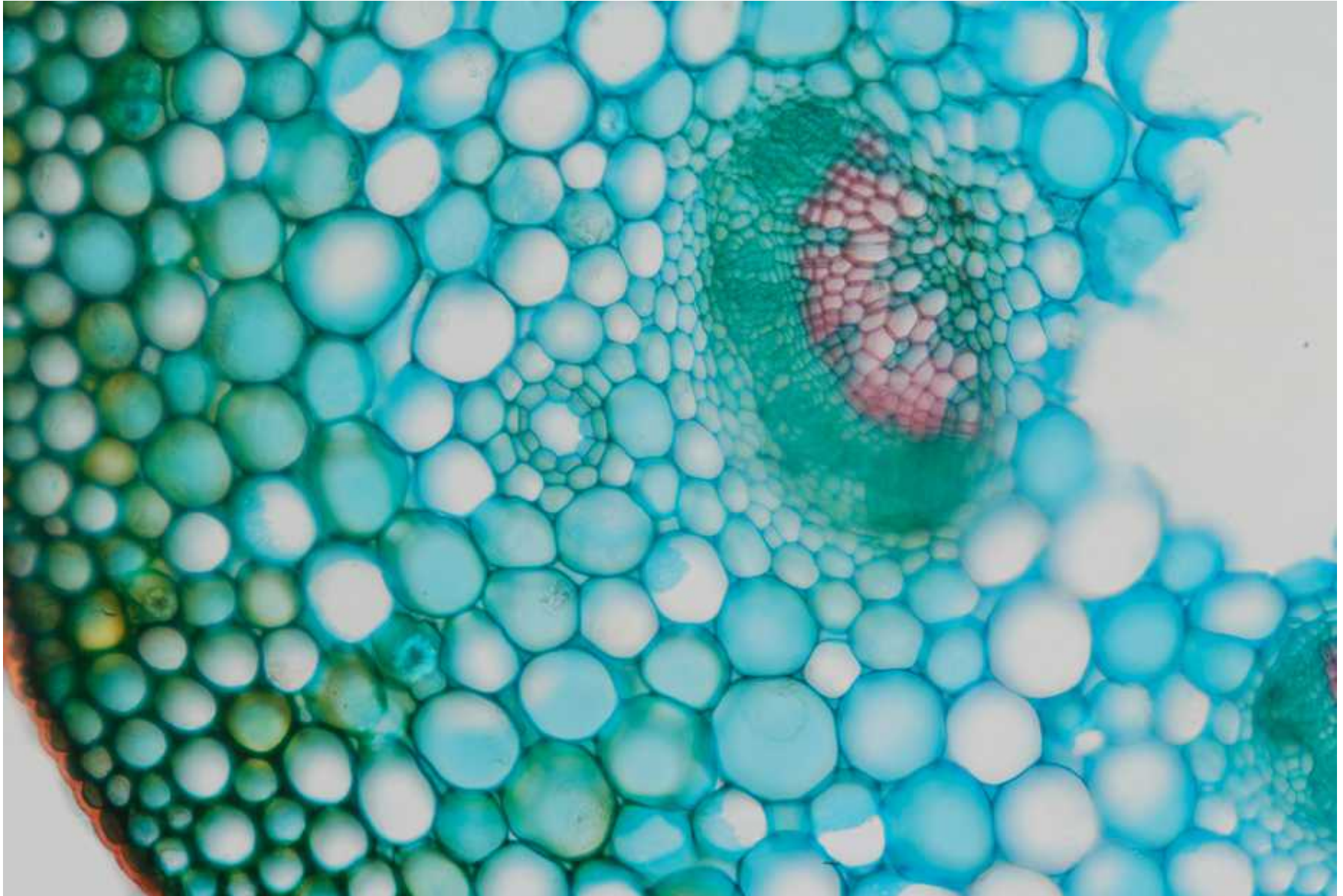


# Schnitt durch Stiel Efeu Färbung W3A

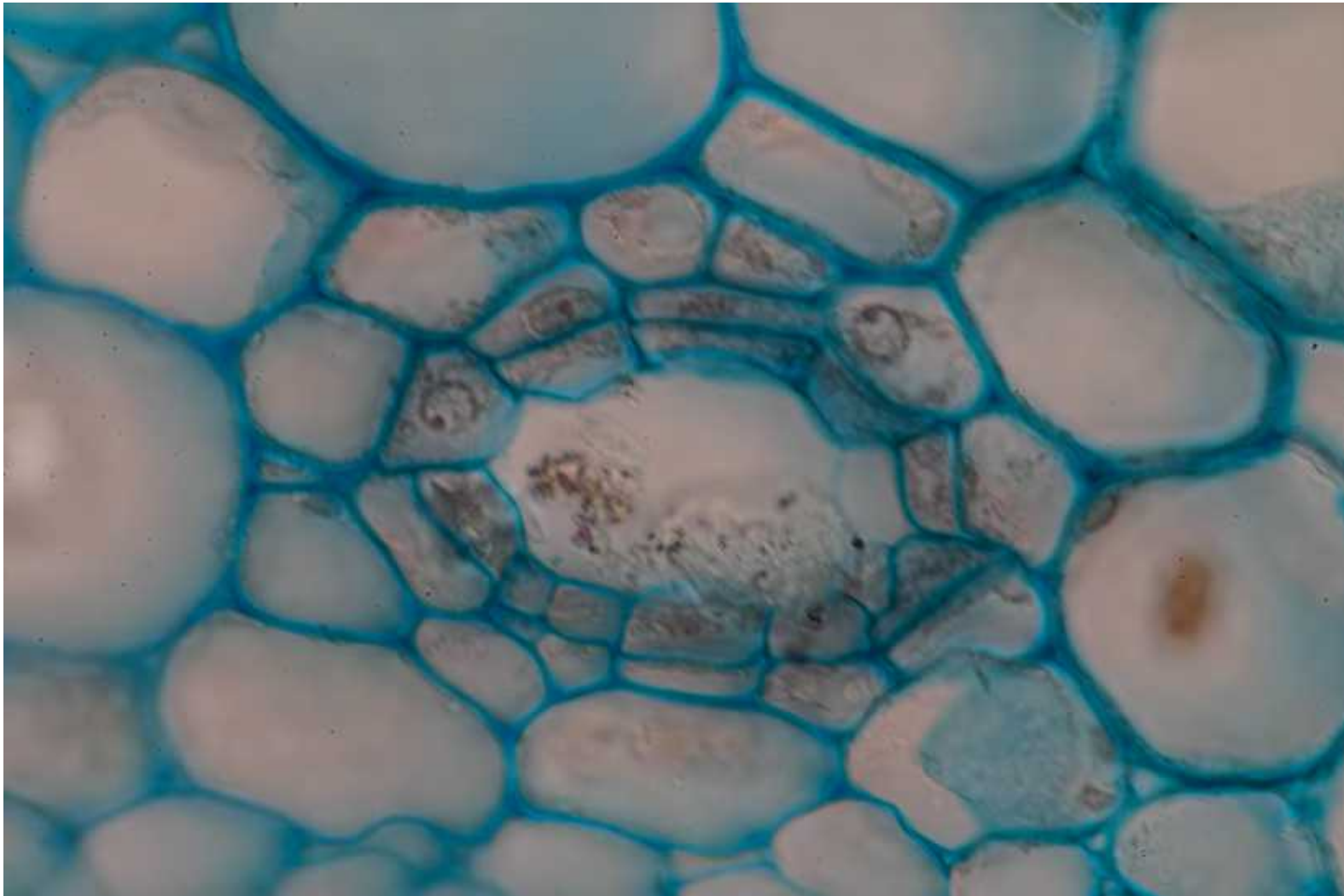




# Schnitt durch Stiel Efeu Färbung Etzold



# Sekretgang Efeu Färbung Etzold





# Efeu Druse Färbung Etzold

Druse



**Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit!**

Back-Up



# Anatomie von Pflanzenschnitten des Stiels / Auswahl

**Cuticula** – Äussere Haut des Blattes („Wachs“)

**Epidermis** – Oberflächenschicht („Haut“)

**Xylem** – Leitet Wasser und gelöste Salze von den Wurzeln in die Blätter

**Leitbündelscheide (Sklerenchym)** – stabilisiert die Leitbündel

**Phloem** - Stofftransport zu Wachstumszonen oder Speicherzellen (Siebzellen“)

**Sekretgang** – transportiert Sekrete z. B. Öl, Harz, Schleim....

**Druse** – Zelle mit Calciumoxalatkristallen (Entsorgung des Oxalats?)

**Rindenparenchym** - Füllgewebe

# Materialien

- Proben in Fixiermittel (AFE)
- Stereolupe
- Eventuell Handlupe
- Mikrotom mit Halter und Messer
- Möhren
- Objektträger mit Hohlschliff
- Feiner Pinsel (Marderhaar)
- Pinzette
- Glaspipetten
- Ethanol 70%, 50% und 30%
- Aqua dest.
- Färbemittel Etzold`s Farbgemisch, Wacker W3A
- Isopropanol 99%
- Schablone zum Platzieren der Schnitte auf dem Objektträger
- Einschlussmittel Euparal

# Hilfreiche Literatur

- Jörg Weiß: Von der Probe zum Präparat, Veröffentlichung des MKB
- Helmut Etzold: Simultanfärbung von Pflanzenschnitten mit Fuchsin, Chrysoidin und Astrablau. Mikrokosmos 91, Heft 5, 2002, p. 316
- Robin Wacker: Eine neue und einfache Methode zur polychromatischen Anfärbung von Paraffinschnitten pflanzlicher Gewebe. Mikrokosmos 95, Heft 4, 2006, p. 210
- Rolf-Dieter Müller und Jörg Weiß: Wacker für alle - neue Simultanfärbungen auf Basis der W3A Färbung von Robin Wacker. Veröffentlichung des MKB, 17.06.11, [www.mikroskopie-bonn.de](http://www.mikroskopie-bonn.de)
- Bruno P. Kremer: Das grosse Kosmos-Buch der Mikroskopie, Kosmos Verlag