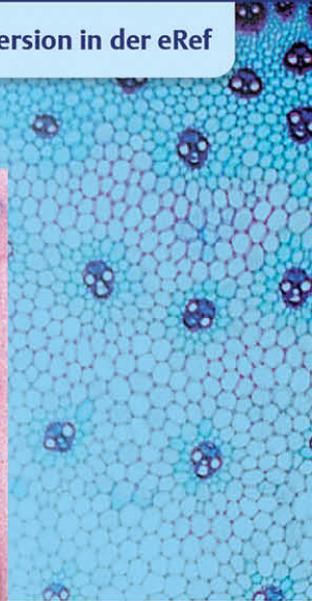
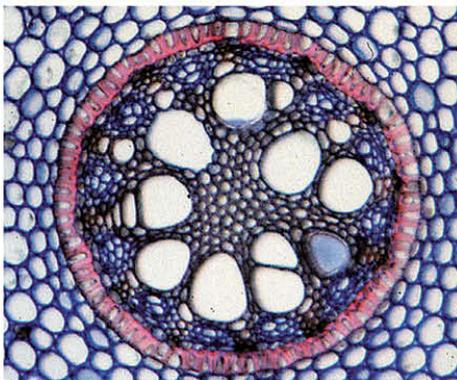
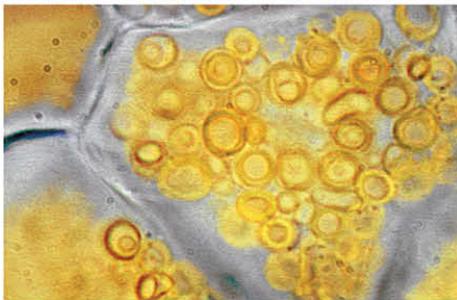
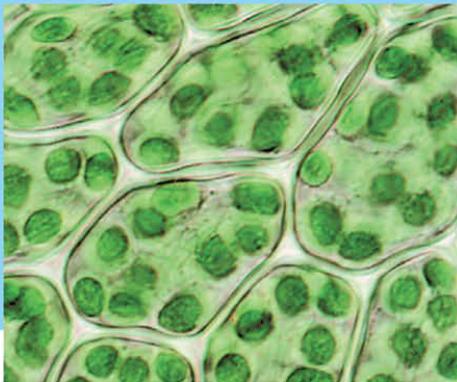


Mikroskopisch-botanisches Praktikum

Gerhard Wanner

3. Auflage

 Online-Version in der eRef



Gerhard Wanner

Mikroskopisch- botanisches Praktikum

3. Auflage

800 Einzeldarstellungen

Georg Thieme Verlag
Stuttgart · New York

Prof. Dr. Gerhard Wanner
AG Ultrastrukturforschung
Biozentrum der LMU
Großhadernerstr. 2–4
D–82152 Planegg-Martinsried

Ihre Meinung ist uns wichtig! Bitte schreiben Sie uns unter

www.thieme.de/service/feedback.html



*Bibliografische Information
der Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese
Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie;
detaillierte bibliografische Daten sind im Internet
über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

1. Auflage 2004
2. Auflage 2010

© 2004, 2017 Georg Thieme Verlag KG
Rüdigerstraße 14
70469 Stuttgart
Deutschland
Telefon: +49/(0)711/8931-0
Unsere Homepage: www.thieme.de

Printed in Germany

Umschlaggestaltung: Thieme Verlagsgruppe
Zeichnungen: Renate Reichinger-Bock
Satz: L42 AG, Berlin
gesetzt aus Indesign CS3
Druck: aprinta druck, Wemding

DOI 10.1055/b-005-143649

ISBN 978-3-13-241671-0

1 2 3 4 5 6

Auch erhältlich als E-Book:
eISBN (PDF) 978-3-13-241672-7
eISBN (epub) 978-3-13-241673-4

Geschützte Warennamen (Warenzeichen) werden
nicht besonders kenntlich gemacht. Aus dem Fehlen
eines solchen Hinweises kann also nicht geschlossen
werden, dass es sich um einen freien Warennamen
handelt.

Das Werk, einschließlich aller seiner Teile, ist urheber-
rechtlich geschützt. Jede Verwertung außerhalb der
engen Grenzen des Urheberrechtsgesetzes ist ohne
Zustimmung des Verlages unzulässig und strafbar.
Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Überset-
zungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung
und Verarbeitung in elektronischen Systemen.

Vorwort

Warum schreibt man ein Praktikumsbuch?

Seit vielen Jahren unterrichte ich in an der LMU-München Studenten im „Mikroskopischen Anfängerpraktikum“. Anfängerkurse mit ihren hohen Studentenzahlen sind sehr betreuungsintensiv und die Studierenden in mehrfacher Weise unter Druck gesetzt:

- Erster wissenschaftlicher Umgang mit dem Lichtmikroskop.
- Erlernen verschiedener Schnitttechniken.
- Anwendung von Färbetechniken.
- Interpretation von Gewebeschnitten.
- Zeichnen von Geweben und Zellen.

Erfahrenes Lehrpersonal steht für die großen Grundkurse leider meist nicht mehr in der benötigten Zahl zur Verfügung. Ein Anfänger, der noch mit Theorie und Praxis kämpft, wird deshalb schnell frustriert, wenn er nicht „das sieht, was er sehen soll“ und dann etwas „zeichnen muss, das er nicht sieht“. Ein Praktikumsbuch hat deshalb für den Anfänger einen besonderen Stellenwert.

Ein Student erwartet aber von einem Buch, das er im Praktikum verwendet, etwas anderes als von einem typischen Lehrbuch. Ich habe die Dinge berücksichtigt, die sich Studierende wünschen:

- Freiraum für Ästhetik an jedem Kapitelanfang; der Studierende soll sich auf das Mikroskopieren freuen.
- Das Buch bleibt offen auf dem Tisch liegen und die Schrift ist so groß, dass das

Buch nicht ständig in die Hand genommen werden muss.

- Ein botanischer Steckbrief vermittelt einen dauerhaften Bezug zu den Pflanzen und ihren wissenschaftlichen Namen.
- Jede Präparation, einschließlich Färbung, ist schematisch bei allen Objekten dargestellt.
- Der Text ist straff gehalten; alle für den Anfänger neuen Begriffe sind markiert und im Glossar kurz erläutert.
- Auf jeder Doppelseite wird ein Themenpunkt behandelt; deshalb kein unnötiges Umblättern beim Mikroskopieren.
- Die Anzahl der Abbildungen ist ungewöhnlich hoch, da man histologische und zytologische Informationen am besten mit Bildern vermittelt.
- Die lichtmikroskopischen Aufnahmen stammen alle von Handschnitten, die nur mit den Hilfsmitteln angefertigt wurden, die in der Anleitung angegeben sind.
- Alle lichtmikroskopischen Aufnahmen sind in Farbe. Ein Maßbalken mit Maßangabe ist in jedem Bild angegeben.
- Wesentliche Zusatzinformationen zum Text finden sich in den Legenden.
- Die Legenden sind direkt neben den jeweiligen Abbildungen platziert.
- Zahlreiche schematische Darstellungen erleichtern das Verständnis der zytologischen Strukturen. Sie sind maßstabsgetreu und im richtigen Färbeverhalten wiedergegeben.



Steckbrief

Prof. Dr. Gerhard Wanner; Diplom-Biologe. Geboren in München.

Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität in München.

Promotion 1977 über „Physiologische und ultrastrukturelle Untersuchungen zum Fettaufbau und -abbau in Pilzen und höheren Pflanzen“.

1992 Habilitation und Etablierung hochauflösender, analytischer Rasterelektronenmikroskopie.

Forschungsschwerpunkt: Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen an Chromosomen (Kondensation, Dekondensation, Lokalisation von DNA, Proteinen und Genen).



Zwei Bücher in einem

Auch bei bestem Bemühen stößt der Studierende in einem mikroskopischen Anfängerpraktikum sehr schnell an Grenzen. Es ist schwer einen guten Handschnitt anzufertigen und ihn optimal zu färben. Feine histologische und zytologische Strukturen zu erkennen und zu interpretieren, ist mit einfachen Kursmikroskopen meist nur mit Erfahrung möglich. Ich habe deshalb in den letzten Jahren elektronenmikroskopische Aufnahmen von allen Kursobjekten angefertigt. Sie sollen das Verständnis für die dreidimensionalen Zusammenhänge erleichtern und die Informationen liefern, die im Lichtmikroskop nur schwer oder – aufgrund des geringen Auflösungsvermögens – gar nicht erhalten werden.

Das Ergebnis: Der Studierende erhält außer einer Praktikumsanleitung eine anschauliche Einführung in die Zytologie der Pflanzen.

Empfohlene Literatur

Ein Praktikumsbuch ersetzt natürlich nicht ein allgemeines Lehrbuch bzw. eine Grundvorlesung der Botanik. Ich habe das „Mikroskopische Praktikum“ so konzipiert, dass es auf die Lehrinhalte des Lehrbuches „Allgemeine und molekulare Botanik“ von E. Weiler und L. Nover (ebenfalls Thieme Verlag) aufbaut. Deshalb konnte der Text straff gehalten werden, um den praktischen bzw. mikroskopischen Aspekten einen höheren Stellenwert zu verschaffen. Zum vertieften Studium der Pflanzenanatomie sei auf andere eingeführte Lehrbücher verwiesen.

Dankeschön

Zahlreichen Mitarbeitern und Kollegen, insbesondere Herrn Prof. Dr. Hans-Ulrich Koop und Herrn Prof. Dr. Hans-Jürgen Tillich, danke ich ganz herzlich für vielfältige Unterstützungen, Anregungen, konstruktive Kritiken und ständigen Ansporn.

Frau Silvia Dobler hat bei unzähligen elektronenmikroskopischen Präparationen stets das Unmögliche möglich gemacht.

Ganz besonderer Dank gebührt Frau Dr. Eva Facher, meiner langjährigen Mitarbeiterin, die mit beispiellosem Engagement mit mir zusammen alle Schnittpräparate angefertigt hat. Angefangen von den „Botanischen Steckbriefen“ bis zu endlosen Änderungen und Korrekturen war sie unermüdlich, bei stets bester Laune und mit unnachahmlichem Humor im Dauereinsatz. Ohne die hervorragende Unterstützung von Frau Dr. Facher wäre das Buch nicht in dieser Form möglich gewesen.

Aus der „Computerfeder“ von Frau Renate Reichinger-Bock stammen alle Illustrationen; sie hat sie maßstabsgetreu nach Mikrofotografien, Modellen oder Originalschnitten angefertigt. Ich bin ihr für das so hervorragend gelungene Ergebnis ganz besonders verbunden.

Aus dem Kapitel 1 (Das Lichtmikroskop) stammen zahlreiche Abbildungen und längere Textpassagen aus der Broschüre „Mikroskopie von Anfang an“ (Carl Zeiss, Oberkochen). Ich danke der Firma Carl Zeiss ganz besonders für die Genehmigung, entsprechende Textteile und die

hochwertigen Abbildungen übernehmen zu dürfen, sowie für sehr hilfreiche Verbesserungsvorschläge. Herzlich danke ich meinem jahrelangen Münchner Ansprechpartner für alle Fragen zum Thema Lichtmikroskopie, Herrn Mario Schacht (Fa. Carl Zeiss).

Ich danke Frau Elizabeth Schröder-Reiter für das Portraitfoto, Frau Lilo Klingenberg für die Abbildung der Korkeiche, Herrn Franz Höck für die Fotografie der Wiesenblumen.

Ganz besonders herzlich bedanke ich mich bei Frau Maria Spanfelner für zahlreiche Verbesserungsvorschläge, Diskussionen, unermüdliche Korrekturen, unzählige kleine und große Hilfestellungen und stets liebevollste Betreuung.

Besonders möchte ich mich bei allen den Studenten und Kollegen bedanken, die mir in zahlreichen, herzlichen Briefen, Kommentaren und Emails die Resonanz gegeben haben, die man sich als Autor wünscht.

Ein ganz herzlicher Dank gilt dem Thieme Verlag, der die großzügige Gestaltung des Buches möglich gemacht hat und den Mitarbeitern, insbesondere Frau Marianne Mauch und Rosana Erhart, die mich über die Jahre ganz herzlich und hervorragend betreut haben.

Inhalt

Mikroskopisch-botanisches Praktikum

1	Das Lichtmikroskop	3
	1.1 Auge – Lupe – Mikroskop	4
	1.2 Optik und Auflösung	6
	1.3 Kontrastverfahren	10
	1.4 Einstellung des Lichtmikroskopes	12

2	Präparation und mikroskopische Praxis	15
	2.1 Reagenzien und Zeichenmaterial	16
	2.2 Schneiden: Grundlagen und Probleme	18
	2.3 Färben: Grundlagen und Probleme	20
	2.4 Mikroskopieren: Grundlagen und Probleme	22
	2.5 Die Übersichtszeichnung	24
	2.6 Die Detailzeichnung	26

3	Elektronenmikroskopie	29
	3.1 Transmissions- und Rasterelektronenmikroskop (TEM/REM)	30
	3.2 EM-Präparation	32
	3.3 Die Zelle im elektronenmikroskopischen Bild	34
	3.4 Zellorganellen und Zellstrukturen – Steckbriefe	36

Aufbau und Funktionen des pflanzlichen Organismus

4	Die lebende Pflanzenzelle	41
	4.1 <i>Allium cepa</i> : Epidermiszellen	42
	4.2 <i>Plagiomnium spec.</i> : Chloroplasten	48

	4.3 <i>Eloдея canadensis</i> : Plasmaströmung	52
	4.4 <i>Allium cepa</i> : Plasmolyse	54

5	Das Hohlraum-System	61
	5.1 Interzellularen	62
	5.2 <i>Nuphar pumila</i> : Aerenchym	64

6	Die Plastiden	67
	6.1 Die verschiedenen Plastidentypen	68
	6.2 Chromoplasten verschiedener Pflanzengewebe	74

7	Reservestoffe	77
	7.1 <i>Elatostema repens</i> : Plastidenstärke	78
	7.2 <i>Solanum tuberosum</i> : Kartoffelstärke	80
	7.3 <i>Triticum aestivum</i> : Weizenstärke	82
	7.4 <i>Avena sativa</i> : Haferstärke	84
	7.5 <i>Helianthus annuus</i> : Aleuronkörner	86
	7.6 <i>Helianthus annuus</i> : Speicherlipide	88
	7.7 <i>Phoenix dactylifera</i> : Cellulosane	90

8	Kristalle	93
	8.1 <i>Agave americana</i> : Kristallidioblasten	94
	8.2 Kristallformen	98

9	Exkretbehälter	101
	9.1 <i>Callistemon lanceolatus</i> : Lysigene Ölbehälter	102
	9.2 <i>Euphorbia milii</i> : Ungegliederte Milchrohren	104

10	Die Zellwand	107			
	10.1 <i>Clematis vitalba</i> : Bau der Zellwand	108			
	10.2 <i>Begonia rex</i> : Eckenkollenchym	110			
	10.3 <i>Lamium album</i> : Plattenkollenchym	114			
	10.4 <i>Asparagus officinalis</i> : Sklerenchym	116			
	10.5 <i>Pirus communis</i> : Steinzellen	118			
11	Epidermis und Cuticula	123			
	11.1 <i>Clivia nobilis</i> : Cuticula und Cuticularschicht	124			
	11.2 <i>Viola x wittrockiana</i> : Papillen	126			
	11.3 <i>Pelargonium zonale</i> : Drüsenhaare	130			
	11.4 <i>Urtica dioica</i> : Brennhaare	132			
	11.5 Haarformen	134			
12	Das Blatt	139			
	12.1 <i>Helleborus niger</i> : Bifaziales Laubblatt	140			
	12.2 <i>Helleborus niger</i> : Spaltöffnungsapparat	146			
	12.3 <i>Commelina coelestis</i> : Spaltöffnungsapparat	150			
	12.4 <i>Pinus silvestris</i> : Nadelblatt	152			
	12.5 <i>Callistemon lanceolatus</i> : Äquifaziales Blatt	154			
	12.6 <i>Iris barbata</i> : Unifaziales Blatt	156			
13	Die Sprossachse	159			
	13.1 <i>Zea mays</i> : Geschlossen kollaterales Leitbündel	160			
	13.2 <i>Ranunculus repens</i> : Offen kollaterales Leitbündel	162			
	13.3 <i>Cucurbita pepo</i> : Offen bikollaterales Leitbündel	168			
13.4	<i>Pteridium aquilinum</i> : Konzentrisches Leitbündel mit Innenxylem	172			
13.5	<i>Convallaria majalis</i> : Konzentrisches Leitbündel mit Außenxylem	176			
14	Holz und Bast	181			
	14.1 <i>Aristolochia durior</i> : Sekundäres Dicken- wachstum	182			
	14.2 <i>Pinus silvestris</i> : Holz	186			
	14.3 <i>Betula pendula</i> : Holz	196			
	14.4 <i>Tilia cordata</i> : Hart- und Weichbast	206			
	14.5 <i>Robinia pseudoacacia</i> : Thyllen	210			
15	Das Periderm	213			
	15.1 <i>Sambucus nigra</i> : Peridermbildung	214			
	15.2 <i>Quercus suber</i> : Flaschenkork	218			
16	Die Wurzel	221			
	16.1 <i>Lepidium sativum</i> : Wurzelhaare	222			
	16.2 <i>Clivia nobilis</i> : Primäre Endodermis	224			
	16.3 <i>Iris germanica</i> : Tertiäre Endodermis	228			
	16.4 <i>Vicia faba</i> : Sekundäres Dickenwachstum der Wurzel	232			
17	Die Zellteilung	237			
	17.1 <i>Allium cepa</i> : Mitose	238			
	Anhang				
	Glossar	240			
	Sachverzeichnis	248			





Das Lichtmikroskop

$$d = \frac{\lambda}{2n \sin \alpha}$$



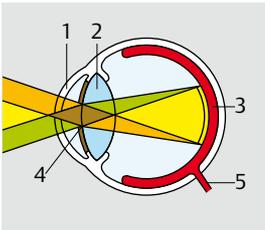


Abb. 1.1

Licht, das durch die Hornhaut (Cornea, 1) dringt, wird durch eine Linse (2) gebündelt und entwirft ein optisches Bild auf der Netzhaut (Retina, 3). Die einfallende Helligkeit wird über den veränderlichen Durchmesser der Iris (4) geregelt. Für eine scharfe Abbildung sorgt die flexible Linse, deren Brennweite durch Muskeln so angepasst wird, dass auf jedes Objekt zwischen 25 cm (= Bezugssehweite) und unendlich fokussiert werden kann. Das Bild selbst wird auf der Netzhaut von Rezeptoren (ca. 130 Millionen Stäbchen zur Erkennung von Graustufen und 7 Millionen Zapfen zur Farberkennung) erfasst, in elektrische Impulse umgewandelt und über den Sehnerv (5) zum Gehirn weitergeleitet.

1.1 Auge – Lupe – Mikroskop

Unser Auge ist selbst ein „optischer Apparat“ (Abb. 1.1). Allem Fortschritt zum Trotz ist das Auge als Sehorgan – verbunden mit dem gleich dahinterliegenden Gehirn – die leistungsfähigste Bildverarbeitung, die es heute gibt.

Auflösungsvermögen des Auges

Das Auge hat ein **Auflösungsvermögen** von ca. 50–100 μm . Zum Größenvergleich: ein menschliches Haar hat eine Dicke von 50–100 μm . Ein Blatt Schreibpapier ist ca. 100 μm dick. Ein Pantoffeltierchen (*Paramecium bursaria*) ist ca. 100 μm lang. Eines der größten Pollenkörner, der Kürbispollen (*Cucurbita pepo*), hat einen Durchmesser von ca. 200 μm . Die Pollenkörner des Vergissmeinnichts (*Myosotis palustris*) sind mit ca. 4 μm extrem klein (Abb. 1.2).

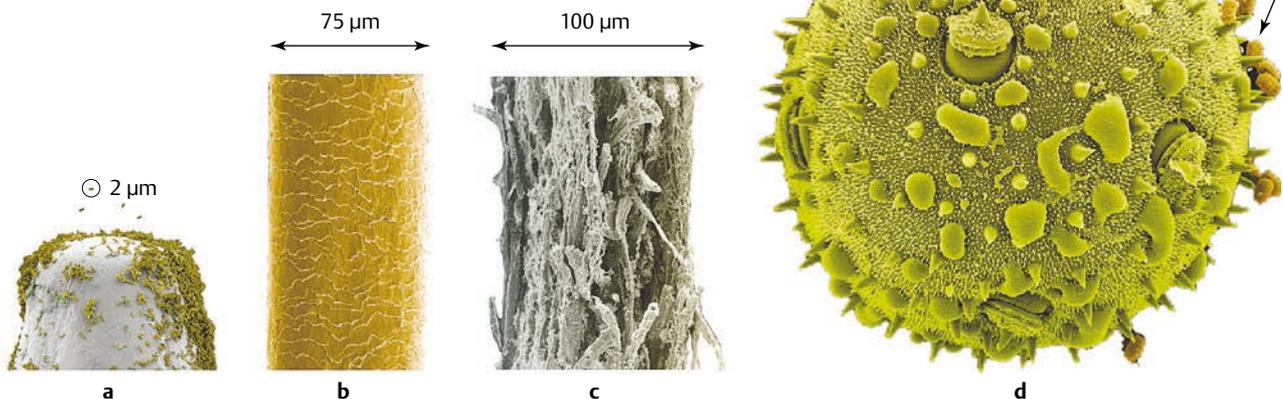
Abb. 1.2

Größenvergleich von

- A Bakterien auf einer Nadelspitze,
- B Kopfhaar,
- C Schreibpapier,
- D Kürbispollenkorn mit Pollenkörnern des Vergissmeinnichts (Pfeile).

Von der Lupe zum Mikroskop

Limitierend für die Auflösung des Auges ist – abgesehen von den anatomischen Gegebenheiten – der **Sehwinkel**; er beträgt ca. 30° (Abb. 1.3–7). Bringt man eine Sammellinse zwischen Auge und Objekt, so wird dieser Winkel vergrößert und wir sehen die Objekte ebenfalls größer: Eine Lupe 5 \times macht uns jetzt Details von 10–20 μm sichtbar. Das vergrößerte Bild bleibt dabei aufrecht (Abb. 1.5)! Große Linsen lassen sich aber nur bis zu ca. 5-facher Vergrößerung herstellen. Legt man 2 Linsen aufeinander, so addieren sich im Wesentlichen die Vergrößerungen (Abb. 1.6). Ein „Wunder“ passiert, wenn man 2 Linsen in einen passenden Abstand bringt: Die Vergrößerungen multiplizieren sich, und das Bild steht „auf dem Kopf“ (Abb. 1.7). Wir haben jetzt ein einfaches, zusammengesetztes Mikroskop mit **Objektiv** und **Okular** vor uns.



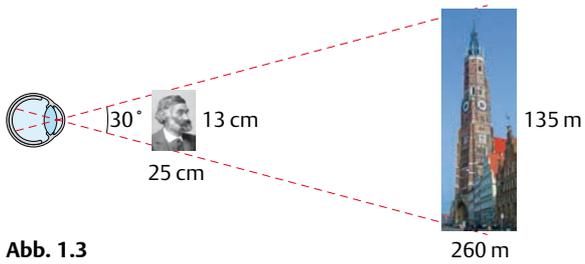


Abb. 1.3
Der Sehwinkel des Auges von 30° zeigt uns ein Foto von Ernst Abbe und die Landshuter Martinikirche in gleicher Größe auf der Netzhaut.



Abb. 1.4
Kleinbildia 24×36 mm.

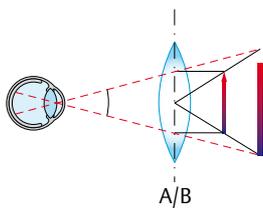


Abb. 1.5
Ein Dia wird nacheinander mit zwei verschiedenen Linsen (A oder B) betrachtet. Die Vergrößerungen sind unterschiedlich, die Bilder stehen aufrecht.

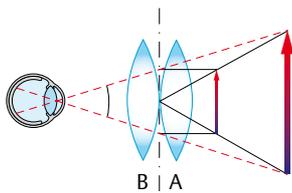
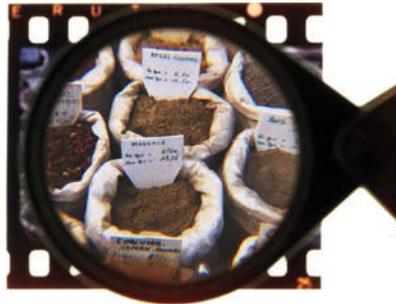


Abb. 1.6
Ein Dia wird mit zwei aufeinanderliegenden Linsen (A + B) betrachtet. Die Vergrößerungen addieren sich, das Bild steht aufrecht.

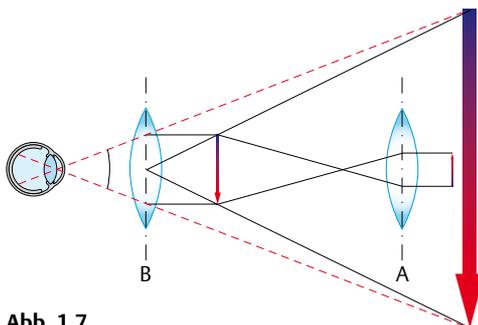
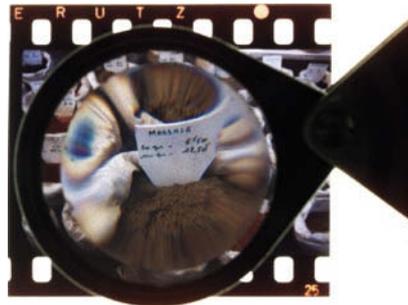
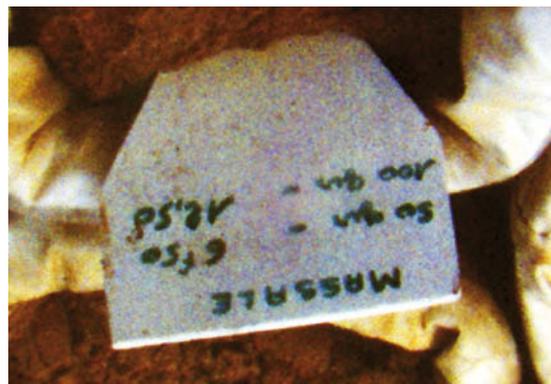


Abb. 1.7
Ein Dia wird mit zwei voneinander entfernten Linsen (A + B) betrachtet. Die Vergrößerungen multiplizieren sich, das Bild steht „auf dem Kopf“.





$$d = \frac{\lambda}{2n \sin \alpha}$$

Abb. 1.8
Ernst Abbe (1840–1905) mit seiner Originalformel für das theoretisch mögliche Auflösungsvermögen des Lichtmikroskopes von 1872. Er konstruierte erstmals für Carl Zeiss Lichtmikroskope nach fundierten theoretischen Berechnungen.

1.2 Optik und Auflösung

Mikroskope vergrößern schrittweise

Das klassische Mikroskop vergrößert in zwei Schritten: Das Objektiv entwirft ein vergrößertes Bild des Objekts in der sogenannten Zwischenbildebene, und das Okular (lat. *oculus* = Auge) vergrößert wie eine Lupe das Zwischenbild. Bei modernen Mikroskopen gibt es eine Zwischenstufe: Zur Unterstützung des Objektivs kommt eine Tubuslinse hinzu. Das Objektiv entwirft ein Abbild in eine „unendliche“ Entfernung, die Tubuslinse mit ihrer **Brennweite** (hier: $f = 164,5 \text{ mm}$) formt aus diesen parallelen Strahlen dann das Zwischenbild.

Das Okular dient wiederum als Betrachtungslupe, um dieses kleine Zwischenbild dem Auge noch stärker vergrößert erscheinen zu lassen.

Gesamtvergrößerung =
Maßstabszahl des Objektivs
× Okularvergrößerung

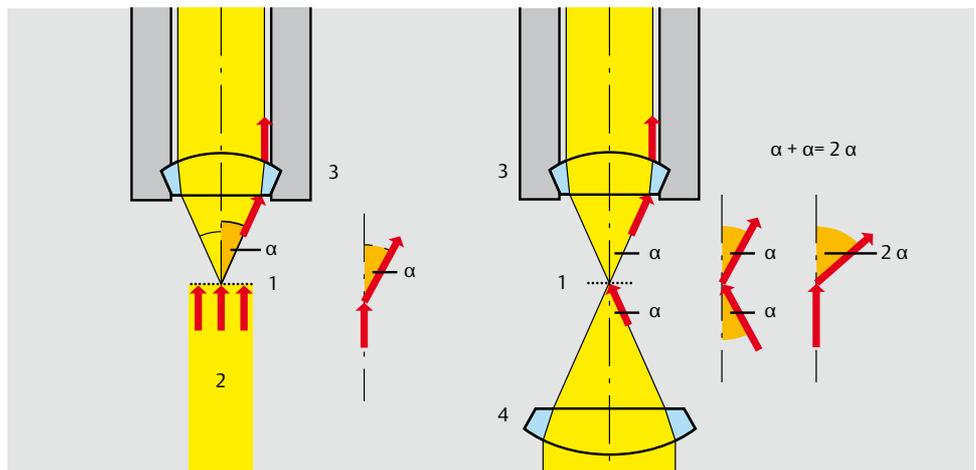
Die Auflösung bestimmt, was sichtbar wird

Weißes Licht besteht aus elektromagnetischen Wellen, deren Periodenlängen 400 bis 700 nm betragen. Licht von grüner Farbe hat eine Wellenlänge von 550 nm.

Beobachtet man im Mikroskop kleine Objekte, so wird das einfallende Licht von solchen Objekten aus der ursprünglichen Richtung abgelenkt (gebeugt). Diese Ablenkung wird immer stärker, je kleiner die Strukturen werden. Um von kleinen Strukturen scharfe Bilder zu bekommen, muss das Objektiv möglichst viel von diesem gebeugten Licht „einsammeln“. Dies geht dann besonders gut, wenn das Objektiv einen großen Raumwinkel erfasst. Der Begriff Apertur („Öffnung“) beschreibt diese Eigenschaft. Der fundamentale Zusammenhang zwischen Auflösung, Wellenlänge und Öffnungswinkel wurde in bahnbrechenden Arbeiten von Ernst Abbe erstmals beschrieben (**Abb. 1.8**).

Abb. 1.9

Von kleinen Objekten (1) wird im Mikroskop das einfallende Licht (2) aus der ursprünglichen Richtung abgelenkt (gebeugt). Das Objektiv (3) im Mikroskop muss möglichst viel von diesem gebeugten Licht „einsammeln“. Der Begriff Apertur („Öffnung“) beschreibt diese Eigenschaft. Der Kondensator (4) erhöht das optische Auflösungsvermögen. Seine numerische Apertur entspricht der des Objektivs. Dadurch wird der Öffnungswinkel verdoppelt (2α).



Die „numerische Apertur“ ist ein Maß für den Raumwinkel, den ein Objektiv überblickt (Abb. 1.9). Diese Formel gilt, wenn sich Luft (Brechungsindex $n \approx 1$) zwischen Objektiv und Objekt befindet.

Numerische Apertur = $n \times \sin \alpha$

α = halber Öffnungswinkel des Objektivs

n = Brechungsindex des verwendeten Immersionsmittels

Für eine optimale Beleuchtung des Präparats wird ein **Kondensator** eingesetzt, dessen numerische Apertur der des Objektivs entspricht (Abb. 1.9). Dadurch wird der wirksame Öffnungswinkel verdoppelt. So können vom Objektiv noch stärker gebeugte Lichtstrahlen eingefangen werden. Diese stärker abgelenkten Strahlen stammen von noch feineren Strukturen.

Eine weitere Möglichkeit den Öffnungswinkel zu vergrößern, ist zwischen der Frontlinse des Objektivs und dem Deck-

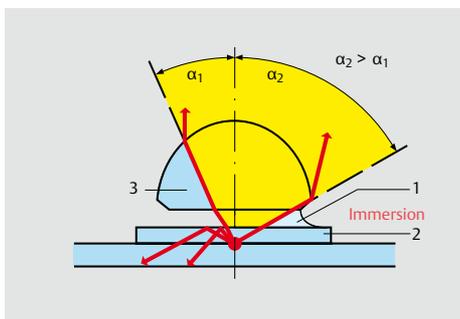


Abb. 1.10

Schematische Darstellung des Strahlenganges mit und ohne Immersionsöl (1) zwischen Deckglas (2) und Objektiv (3). Die nutzbare Apertur des Objektivs ist ohne Immersionsöl durch Reflexionen zwischen Deckglas und Luftschicht verringert, das Auflösungsvermögen dadurch vermindert.

glas **Immersions**flüssigkeiten einzubringen (Abb. 1.10).

Bewährt hat sich ein bestimmtes Öl mit dem Brechungsindex $n = 1,51$, das genau an den Brechungsindex von Glas angepasst ist. Auf diese Weise werden alle Lichtreflexe auf dem Weg vom Objekt zum Objektiv beseitigt. Ohne diesen „Trick“ ginge bei größeren Winkeln immer Licht im Deckglas oder an der Frontlinse durch Reflexionen verloren. Die nutzbare Apertur des Objektivs würde durch diese Reflexionen verringert und das Auflösungsvermögen dadurch vermindert.

$$d_0 = 1,22\lambda / N.A._{Ob} + N.A._{Cond}$$

$$\text{vereinfacht: } d_0 = \lambda/2 N.A.$$

d_0 = kleinster Abstand von zwei Bildpunkten

$N.A.$ = numerische Apertur

λ = Wellenlänge, z. B. 550 nm (grün)

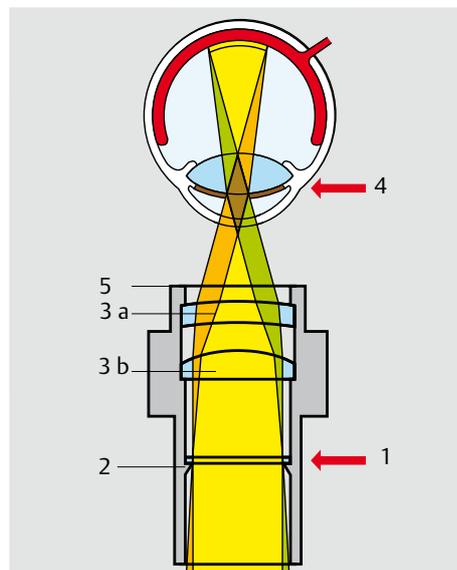


Abb. 1.11

Schematischer Schnitt durch ein Okular:

- 1 Zwischenbildlage – gleichzeitig Lage einer Strichplatte
- 2 Begrenzung des nutzbaren Sehfeldes: Hier entsteht der „schwarze Rand“ des Mikroskopbildes
- 3 Okularoptik (3a = Augenlinse; 3b = Feldlinse)
- 4 Lage der „Okularpupille“ = Pupille des Beobachtersauges
- 5 Fokussiering für den Dioptrienausgleich

Okulare sind die Lupen, mit denen das mikroskopische Zwischenbild betrachtet wird (Abb. 1.11). Dieses wurde von Objektiv und Tubuslinse erzeugt und hat einen nutzbaren „Sehfeld“-Durchmesser von 18 bis zu 32 mm. Okulare sind keine einfachen Linsen, sondern ebenfalls korrigierte Optiken, die aus mehreren Linsen bestehen.

„Viel hilft viel“ – dieser Satz gilt nicht für die Wahl der nützlichen, auch „förderlich“ genannten Vergrößerung. Gemeint ist damit, dass man die Gesamtvergrößerung eines Mikroskops nicht dadurch zu steigern versuchen sollte, indem man stark nachvergrößernde Okulare (z. B. 16×) oder andere „optische Nachbrenner“ einsetzt, wenn das Objektiv bei kleiner numerischer Apertur nicht genügend Bildpunkte liefert. Umgekehrt gehen Feinheiten verloren, wenn ein Objektiv (z. B. **Planapochromat** 10×) ganz kleine Details im Zwischenbild bringt, aber ein Okular mit geringer Vergrößerung benutzt wird.

Die Gesamtvergrößerung eines Mikroskops soll höher als das 500-fache, aber kleiner als das 1000-fache der jeweiligen Objektivapertur sein. Dann ist man im Bereich der förderlichen Vergrößerung.

Auflösungsvermögen:

Hinweise für die Praxis

Moderne Mikroskopobjektive ermöglichen es, das theoretische Auflösungsvermögen – gute Präparate vorausgesetzt – in der Praxis zu erreichen.

▪ **Sind Objektiv und Präparat sauber?**

Schon ein Fingerabdruck auf der Frontlinse eines Luftobjektivs kann die kontrastreiche Wiedergabe eines Präparates stören, weil Streulicht erzeugt wird. Ähnliches gilt für Immersionsobjektive, die mit verharzten Resten oder Emulsionen (z. B. Öl mit Wasser) verschmutzt sind. In solchen Fällen ist eine gründliche Reinigung mit einem Wattestäbchen und Wundbenzin nötig.

▪ **Haben die Deckgläser die richtige Dicke?**

Bei Objektiven hoher Apertur, die ohne Immersionsöl benutzt werden, ist es sehr wichtig, dass die verwendeten Deckgläschen die Normdicke von 0,17 mm einhalten. In diesen Fällen geht das Deckgläschen bereits in die komplizierte Berechnung der Objektive ein. Erfahrungsgemäß sind die folgenden Abweichungen gerade noch vertretbar:

± 0,01 mm bei N.A. > 0,7

± 0,03 mm bei 0,3 < N.A. < 0,7

▪ **Verwenden Sie das richtige Immersionsöl?**

Das richtige Öl hat den Brechungsindex ($n = 1,51$). Starke „Bildstörungen“ treten auf, wenn Luftblasen in der Immersionsschicht sind. Diese Fälle gilt es durch blasenfreies Aufbringen zu vermeiden.

Alles geregelt: Der Weg der Lichtstrahlen – von der Leuchte bis zum Auge

Bei der Konstruktion eines Mikroskops wird darauf geachtet, dass die Lichtstrahlen sauber durch das Instrument geführt werden. Nur so ist es möglich, auch mit Leuchten geringer Wattzahl, ein helles Bild zu erzeugen.

Ein wichtiger Grund für die Existenz von Blenden und Filtern am Mikroskop ist, dass nach jedem Objektivwechsel eigentlich die Beleuchtung neu eingestellt werden müsste. Dies hat zwei Ursachen: Einmal verändert sich beim Objektivwechsel die Größe des Präparatausschnittes, der gerade beobachtet wird. Bei einem Objektiv mit niedriger Maßstabszahl, z.B. 4, ist das beobachtete Feld groß (ca. 5 mm im Durchmesser). Schaltet man nun zum Objektiv 40× um, so schrumpft der Durchmesser des eingesehenen Feldes im Präparat um den Faktor zehn (auf nur noch 0,5 mm); die beobachtete Fläche wird damit hundertmal kleiner. Der andere Grund ist, dass sich die numerische Apertur von 0,12 auf 0,65 erhöht. In Öffnungswinkeln ausgedrückt: von 15° auf 80°.

Die Regeln nach Köhler (Abb. 1.12) verlangen, dass immer nur das beobachtete Feld im Präparat beleuchtet wird und nicht mehr, weil „überflüssiges“ Licht als

störendes Streulicht wirken kann. Gleichzeitig sollte aber stets der Lichtkegel der Beleuchtung dem Öffnungskegel des Objektivs angepasst sein, damit die numerische Apertur der Optik genutzt wird. Nur so erreicht das Auflösungsvermögen sein Optimum.

Die Hilfsmittel, mit denen all dies erreicht wird, sind der Kondensator, der auch die **Aperturblende** enthält, und die **Leuchtfeldblende**, die sich normalerweise im Stativfuß befindet. Die Leuchtfeldblende wird mit Hilfe des Kondensators in das Präparat abgebildet. Sie bestimmt, welcher Teil des Präparats beleuchtet wird. Die Aperturblende hingegen wird in die „Pupille“ des Objektivs abgebildet und regelt die Ausleuchtung dieser Pupille. Die gesamte Optik ist so berechnet, dass mit der Aperturblende auch die Öffnungswinkel der Lichtkegel richtig eingestellt werden.

Fast die ganze Kunst des Mikroskopierens besteht im richtigen Gebrauch der Leuchtfeld- und Aperturblenden!

Der Kondensator – der den beleuchtenden Lichtstrahl in das Präparat hinein „verdichtet“ – spielt eine große Rolle in der Mikroskopie. Er ist so wichtig wie Objektive und Okulare. Mit Hilfe des Kondensators wird das Präparat „ins rechte Licht gerückt“.

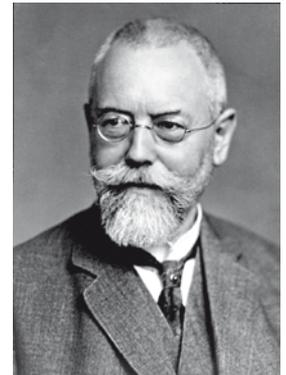
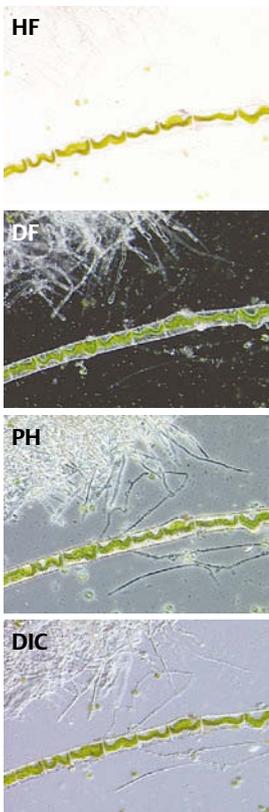


Abb. 1.12
Prof. August Köhler (1866–1948) veröffentlichte schon 1893 Regeln für die richtige Beleuchtung mikroskopischer Präparate. Er entwickelte eine ausgeklügelte Beleuchtung, die es ermöglichte, das volle Auflösungsvermögen der Abbe'schen Objektive in der Praxis zu nutzen.

Abb. 1.13

Lichtmikroskopische Aufnahmen einer Wasserprobe mit einer fädigen Grünalge und Pilzhyphen im Hellfeld (HF), Dunkelfeld (DF), Phasenkontrast (PH) und Interferenzkontrast (DIC). Im Hellfeld sind die Pilzhyphen fast unsichtbar. Im Dunkelfeld treten auch kleinste, farblose Partikel gut hervor. Die Darstellung der Pilzhyphen ist im Phasenkontrast besonders gut. Der dicke Algenfaden wird am besten im Interferenzkontrast abgebildet.



1.3 Kontrastverfahren

Hellfeldmikroskopie (HF)

Die klassische Hellfeldmikroskopie ist für alle Amplitudenobjekte geeignet, d.h. für Objekte, die Licht absorbieren. Das menschliche Auge benötigt bei hellem Hintergrund örtliche Intensitätsschwankungen von 10–20%, um Objekte zu erkennen. In der Praxis hat man häufig „farblose“ Präparate, die sich nicht leicht im Hellfeld mikroskopieren lassen; deshalb werden Gewebeschnitte meist gefärbt. Ungefärbte Lebendpräparate wie Bakterien oder Zellkulturen absorbieren kaum Licht und sind daher schlecht oder gar nicht zu erkennen (Abb. 1.13). Die nachfolgend dargestellten Kontrastierungsmethoden sind Möglichkeiten, mit denen optische Effekte im Präparat in (für das Auge erkennbare) Intensitätsveränderungen übersetzt werden.

Dunkelfeldmikroskopie (DF)

Feine, helle Strukturen können bei schräger Beleuchtung und vor dunklem Hintergrund besser betrachtet werden: sie „leuchten auf“. Im Mikroskop wird ein dunkler Hintergrund durch eine Ringblende im Kondensor geschaffen. Die Kondensoroptik beleuchtet dann das Präparat mit einem Hohlkegel von Lichtstrahlen. Das Licht trifft nicht auf das Objektiv, sondern geht seitlich vorbei. Befinden sich kleine Partikel wie Bakterien in der Objektebene, so wird das Licht gestreut und vom Objektiv nun eingefangen. Das Objekt wird hell leuchtend vor dunklem Hintergrund sichtbar (Abb. 1.13).

Phasenkontrast (PH)

Der Phasenkontrast ist für sehr dünne (wenige μm), ungefärbte Objekte ideal. Verschiedene biologische Zellstrukturen haben meist auch unterschiedliche Brechungsindices, die die Lichtphase unterschiedlich verschieben. Unser Auge kann diese Phasenverschiebungen nicht erkennen. Die Anordnung einer Ringblende anstelle der Aperturiris im Kondensor, sowie eines Phasenkontrastobjektives mit „Phasenring“, führt zur Umsetzung des Phasen-Gangunterschiedes in eine Amplitudendifferenz. Die Phasenunterschiede werden jetzt als Kontrastunterschiede sichtbar (Prinzip der Addition bzw. Subtraktion von Wellen) (Abb. 1.13–15). Bei dicken Präparaten ist diese Methode aufgrund der zu großen und wechselnden Phasenunterschiede ungeeignet.

Differentialinterferenzkontrast (DIC)

Der Differentialinterferenzkontrast baut auf dem physikalischen Prinzip des „Polarisationskontrastes“ auf. Es wird ein doppelbrechendes Prisma in den Kondensor eingesetzt, das den polarisierten Lichtstrahl auf dem „Hinweg“ in zwei Teilstrahlen aufspaltet. Sie gehen seitlich gegeneinander versetzt durch die Probe. Zeigt das Präparat keine Brechzahlunterschiede, passiert nichts. Gehen die zwei Teilstrahlen jedoch durch Präparatstrukturen mit unterschiedlichen Brechzahlen, so wird der eine der beiden Teilstrahlen in Präparatstrukturen mit der höheren Brechzahl stärker abgebremst als in den anderen und erhält dadurch einen Gangunterschied. Nachdem die Teilstrahlen über ein zweites Prisma hinter dem

Objektiv (= DIC-Prisma) und dem Analysator zurückgelaufen sind, haben sie wieder – bedingt durch den Analysator – die gleiche Schwingungsrichtung und können deshalb im Zwischenbild miteinander interferieren. Die an der Oberfläche erfahrenen Gangunterschiede setzen sich nun in Grauwerte um, die das Auge erkennen kann: kleinste Stufen werden als „Pseudoreliefs“ abgebildet (Abb. 1.13–14). Im Allgemeinen erzielt man mit Interferenzkontrast eine Auflösungssteigerung.

Fluoreszenzmikroskopie (FL)

Einige Stoffe können bei „Anregung“ mit Licht einer bestimmten Wellenlänge (z. B. UV) charakteristisches (immer längerwelliges!) Fluoreszenzlicht emittieren. Von einer starken zweiten Lichtquelle gelangt das Licht über ein Anregungsfilter durch das Objektiv auf das Präparat. Das entstehende Fluoreszenzlicht wird vom Objektiv gesammelt und – weil es größere Wellenlängen als das Anregungslicht aufweist – vom (dichromatischen) Strahlenteiler durchgelassen. Tubuslinse und Okular erzeugen wie gewohnt das mikroskopische Bild, das jetzt nur noch aus Fluoreszenzlicht besteht (Abb. 1.16).

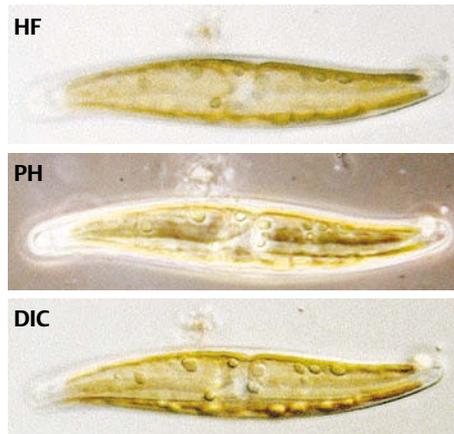


Abb. 1.14

Aufnahmen einer lebenden Kieselalge im Hellfeld (HF), Phasenkontrast (PH) und Interferenzkontrast (DIC). Die Alge ist zu dick für den Phasenkontrast. Die Darstellung ist nur im Interferenzkontrast sehr gut.

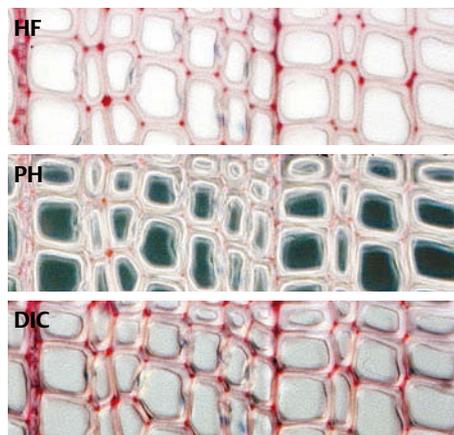


Abb. 1.15

Aufnahmen eines Sprossquerschnittes der Kiefer (*Pinus nigra*; Färbung mit As-trablau + Safranin) im Hellfeld (HF), Phasenkontrast (PH) und Interferenzkontrast (DIC). Der Schnitt ist zu dick für den Phasenkontrast und aufgrund der parakristallinen Zellwand weniger geeignet für den Interferenzkontrast. Die Darstellung ist nur im Hellfeld sehr gut.

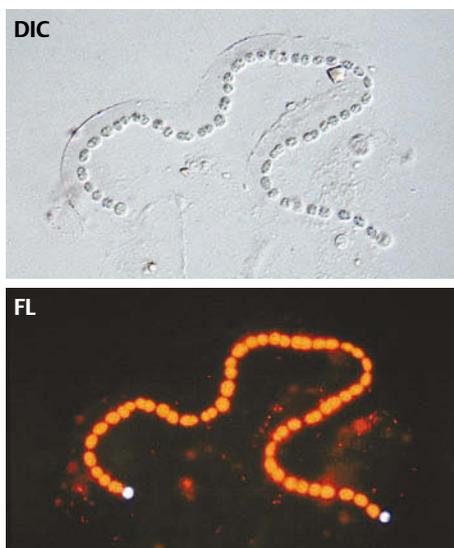


Abb. 1.16

Aufnahmen eines fädigen Cyanobacteriums im Interferenzkontrast (DIC) und in Aufsichtfluoreszenz (FL). Die chlorophyllreichen Zellen zeigen eine starke rote Eigenfluoreszenz. Die terminalen Heterocysten fluoreszieren bläulich.



Abb. 1.17

1.4 Einstellung des Lichtmikroskopes

Vorbereitung

- Das Mikroskop ist vollständig zusammengebaut. Der Kondensator steht, falls er einen Kontrastrevolver besitzt, auf Stellung „HF“ für Hellfeld.
- Zum Einstellen brauchen Sie ein Präparat. Sehr geeignet sind dünne, angefärbte Schnitte (Pflanzenstängel).
- Zum Einstellen verwenden Sie das Objektiv 10 ×.

Einstellung des Mikroskopes

1. Schalten Sie die Lichtquelle ein und prüfen Sie, ob Licht sichtbar wird (Abb. 1.17).
2. Öffnen Sie die Leuchtfeldblende bis zum Anschlag: Der Lichtfleck hat nun den größtmöglichen Durchmesser (Abb. 1.18).
3. Wenn Sie einen Kondensator mit schwenkbarer Frontlinse verwenden, muss diese bis zum Anschlag in den Strahlengang gebracht werden.
4. Stellen Sie die Höhe des Kondensators so ein, dass seine Frontlinse von unten etwa 1–3 mm vom Präparat entfernt ist. Berühren Sie dabei das Präparat nicht mit der Frontlinse.
5. Wenn es sehr hell aussieht, reduzieren Sie die Helligkeit, bis Sie diese als angenehm empfinden. Dann stellen Sie an der Knickbrücke des Binokulartubus den für Sie richtigen Augenabstand

ein (Abb. 1.17). Beim entspannten Sehen erkennen Sie nur einen statt zwei Lichtkreise. Brillenträger lassen die Brille auf.

6. Bewegen Sie mit dem Fokussiertrieb den Mikroskoptisch samt Präparat vorsichtig auf und ab, bis Sie Details so scharf wie möglich erkennen (Abb. 1.19). Es kann sein, dass die Ausleuchtung noch nicht stimmt.

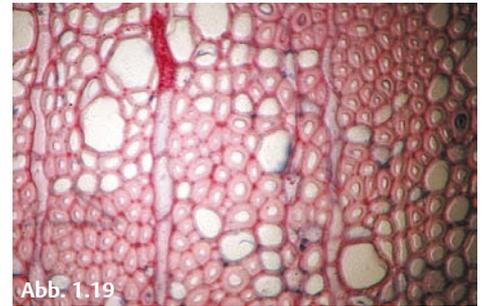


Abb. 1.19

7. Jetzt beginnt das „Köhlern“: Sie verkleinern nun die Leuchtfeldblende und bewegen mit dem Kondensortrieb den Kondensator vorsichtig auf und ab, bis Sie ein scharfes Bild der Leuchtfeldblende sehen (Abb. 1.20).

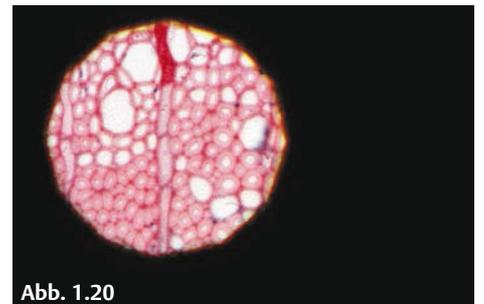
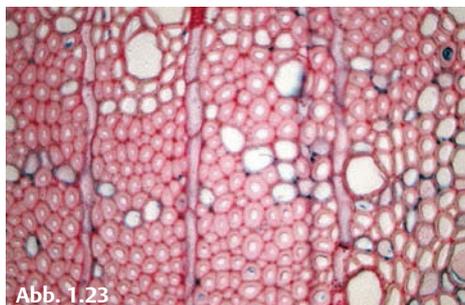
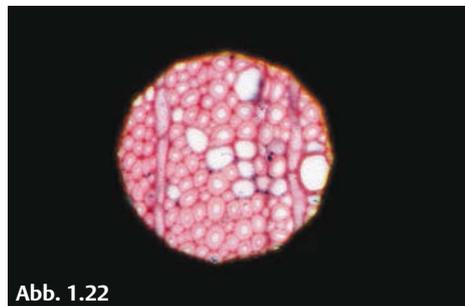


Abb. 1.20

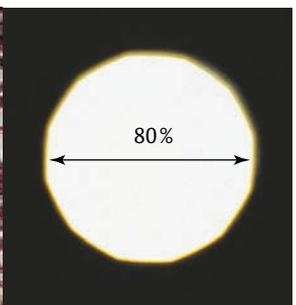
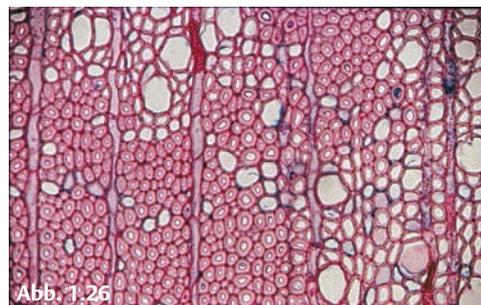
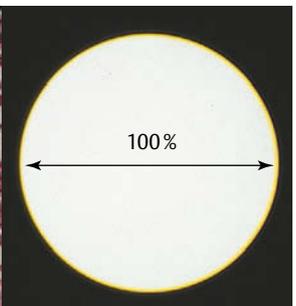
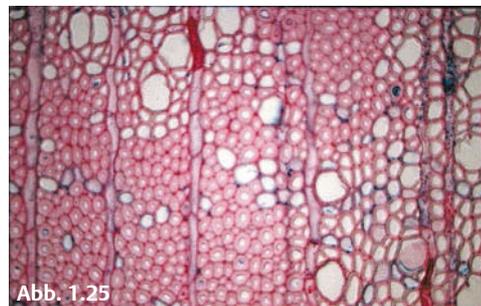


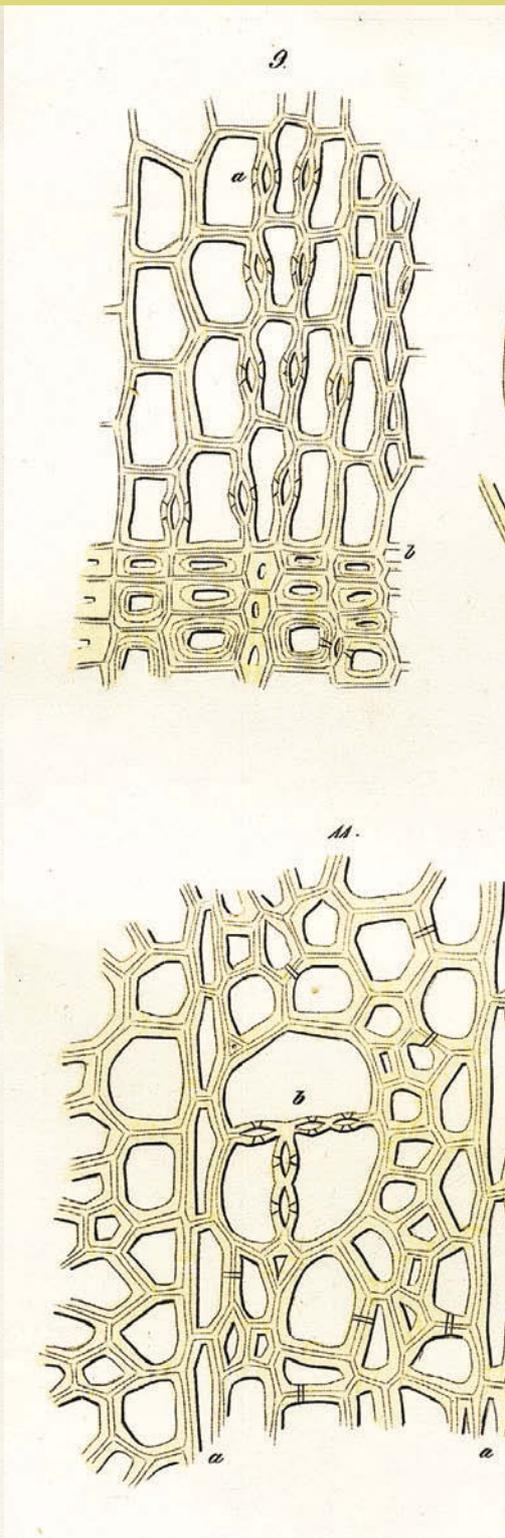
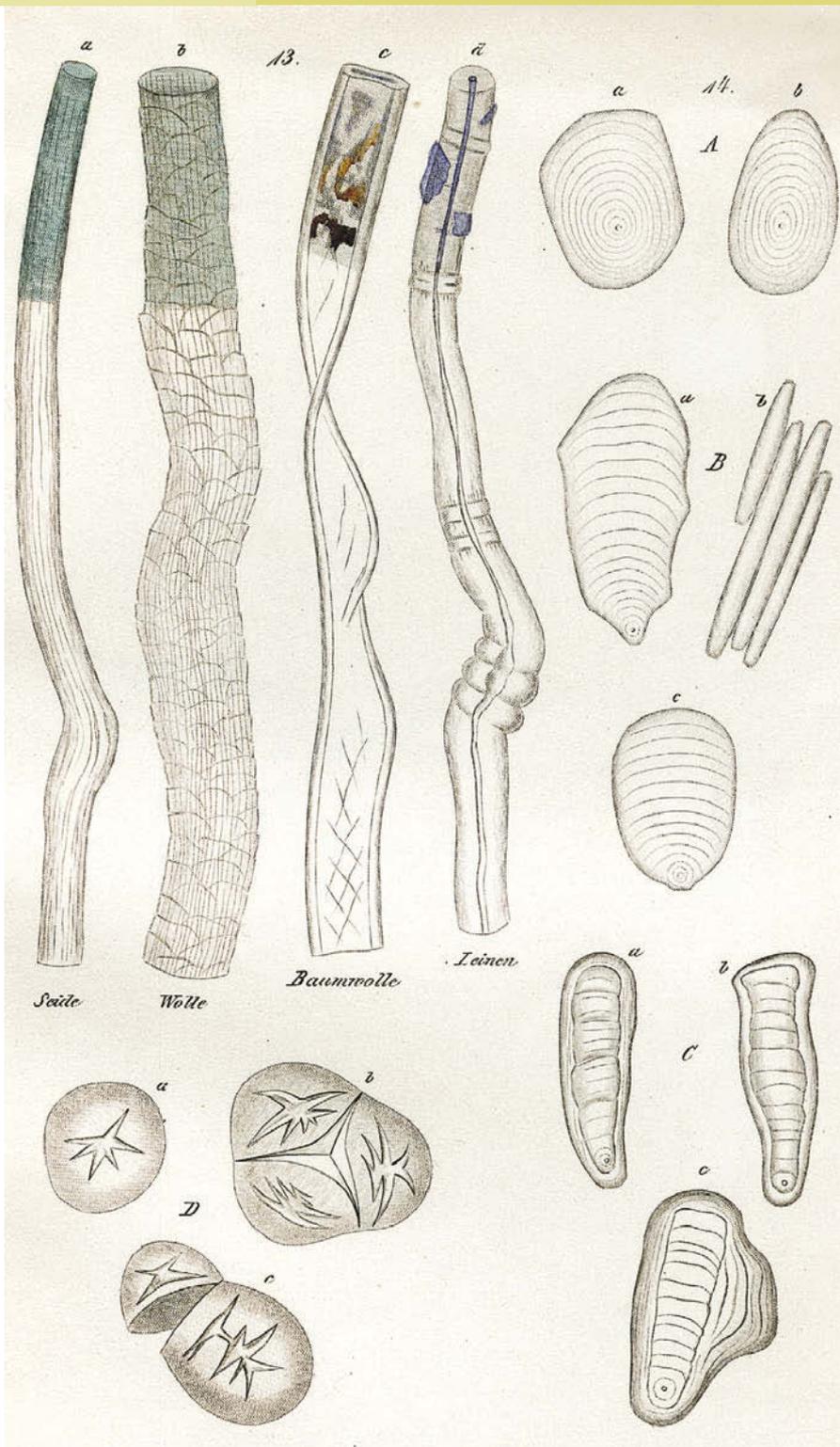
Abb. 1.18

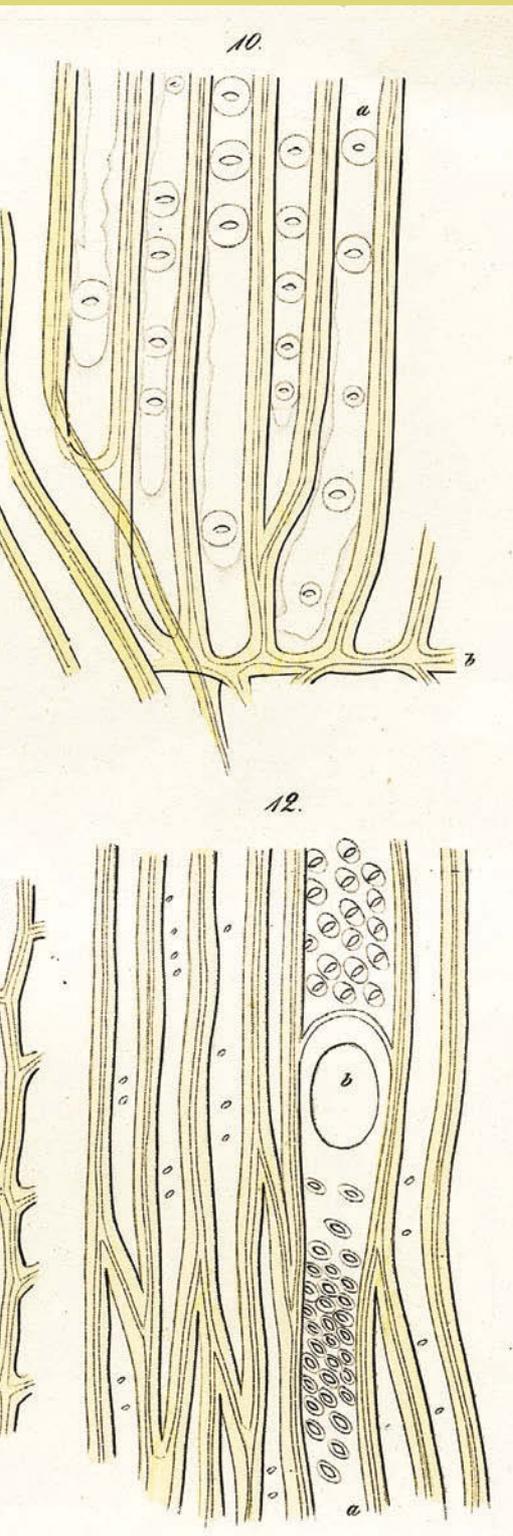
8. Sie sehen nun das Bild der Leuchtfeldblende scharf abgebildet, aber es ist noch nicht zentriert. Mit Hilfe der Zentrierschrauben (Abb. 1.21) am Kondensator stellen Sie die Leuchtfeldblende auf Mitte (Abb. 1.22). Öffnen Sie nun die Leuchtfeldblende gerade soweit, bis ihr Rand das Sehfeld gerade nach außen verlässt (Abb. 1.23).



9. Zur Kontrastverbesserung muss die noch voll geöffnete Aperturblende verkleinert werden. Sie darf aber nicht zu stark geschlossen werden, um die Auflösung nicht zu vermindern. Sie sehen die Aperturblende, wenn Sie ein Okular herausziehen und direkt in den Tubus blicken (Abb. 1.24). Nun öffnen und schließen Sie die Aperturblende im Kondensator, bis Sie das Bild in der Pupille des Objektivs klar erkennen. Stellen Sie den Durchmesser der Aperturblende so ein, dass sie etwa $4/5$ (80%) bis $2/3$ (66%) des Pupillendurchmessers ausleuchtet (Abb. 1.25–26). Bei dieser Einstellung haben Sie fast die volle Auflösung und den besten Kontrast. Setzen Sie Ihr Okular wieder ein – ihr Mikroskop ist jetzt „geköhlet“.



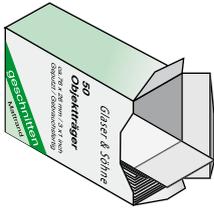




Präparation und mikroskopische Praxis

M.J. Schleiden: Die Pflanze und ihr Leben (1864)

2.1 Reagenzien und Zeichenmaterial



50 Objektträger

76 × 26 mm, Mattrand (zur Beschriftung mit Bleistift); **geputzt** (sind sie leider manchmal trotzdem nicht – dann beim Händler umtauschen).



Taschenmesser

Braucht ein Biologe immer!



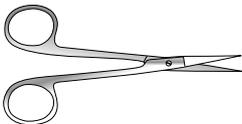
Papiertaschentücher

Beim Schneiden der Zwiebel, zum Halten von Brennnessel, Aufwischen usw.



Filterpapier

Mit Schere in \pm rechteckige Stücke schneiden. Absaugen mit der glatten Schnittkante.



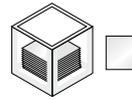
Schere

Zum Abschneiden von Blüten, Blättern, Stängeln, aber auch zum Schneiden von Filterpapier.



Lupe

Braucht ein Biologe immer!



100 Deckgläser

18 × 18 mm



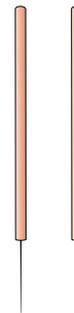
20 Rasierklingen

Hier nicht sparen:
schlechte Klinge
= schlechter Schnitt
= schlechtes Bild
= schlechte Zeichnung
= Frustration
= schade um die Zeit!



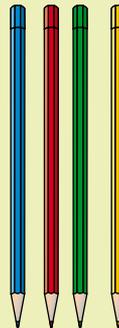
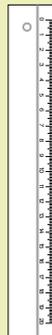
Skalpelle und sehr feine Pinzette

Für feinere „Zuricht arbeiten“:
z.B. um Abziehen von Epidermis und zum Abnehmen von Schnitten.



2 Präpariernadeln

Unentbehrlich! Zum Übertragen der Schnitte ins Wasser, zur Orientierung der Schnitte.



Block (DIN A4, 50 Blatt)

Druckbleistift (0,5 mm, HB)

Lineal

Radiergummi

Buntstifte



Iod-Iod-Kalium

Zum Nachweis von Stärke (Blauviolett-Färbung). 6,7% KJ, 3,3% J₂ in Wasser.

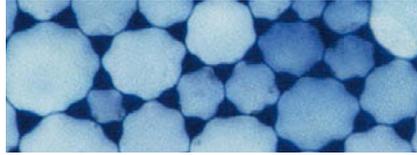


Stärkenachweis
siehe S. 79



Astrablau

Zum Nachweis von nicht verholzten Zellwänden (Blaufärbung). 0,1% Astrablau + 2% Weinsäure in Wasser.

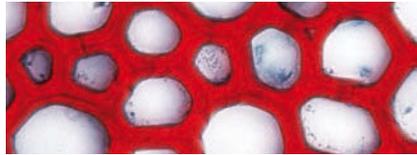


Eckenkollenchym;
siehe S. 110



Safranin

Zum Nachweis von verholzten Zellwänden (Rotfärbung). 1% Safranin in Wasser.



Sklerenchymfasern;
siehe S. 116



Ethanol (50%ig)

Zur Differenzierung der Färbungen mit Astrablau und Safranin; zum Entfernen von Luftblasen.

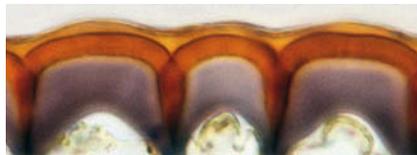


Differenzierung;
siehe S. 21



Chlorzinkiod

Zum Nachweis von Cellulose (Blaufärbung). 60 g ZnCl₂ + 30 g H₂O + 20 g KJ + 4 g J₂ rühren, sedimentieren, filtrieren.

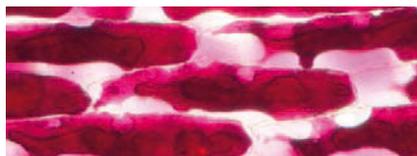


Cutikularschicht;
siehe S. 124



Kaliumnitrat

In hypertotonischer Lösung für die Plasmolyse. 10% KNO₃ in Wasser.



Plasmolyse;
siehe S. 54



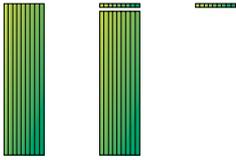
Sudan-III-Glycerin

Zum Nachweis von Cutin, Suberin, Fetten, ätherischen Ölen und Wachsen. 0,1% Sudan-III in Ethanol/Glycerin (1 : 1).



Cuticula;
siehe S. 124



**Abb. 2.1**

Die (Quer-)Schnitte sollen so dünn wie möglich sein und genau senkrecht zur Längsachse des Organs geführt werden. Den Schnitt vorsichtig in einen Tropfen Wasser überführen; überschüssiges Wasser absaugen, so dass das Deckglas plan auf dem Schnitt liegt.

2.2 Schneiden: Grundlagen und Probleme

Warum ein dünner Schnitt?

Da pflanzliche Zellen nur einen Durchmesser von ca. 50 µm haben, liegen z. B. in einem Schnitt mit 1 mm Dicke 20 Zellen übereinander; erst ein entsprechend dünner Schnitt ermöglicht den ungehinderten Blick in einzelne Zellen.

Warum eine gute Schnittführung?

Leitelemente, wie z. B. Tracheen und Siebröhren, sind nur dann als Röhren erkennbar, wenn sie genau senkrecht zur Längsachse geschnitten sind (Abb. 2.1) und man senkrecht auf die Röhren blickt.

Abb. 2.2

Es ist meist notwendig, mehrere Schnitte anzufertigen. Sind neben dicken auch dünne Schnitte unter dem Deckglas, liegen diese nicht „plan“. Bei unterschiedlicher Qualität der Schnitte: Die schlechten „Schrägschnitte“ (1) verwerfen. Die dünnen (2 + 3) und die dickeren Schnitte (4) separat mit Deckgläschen versehen, dabei gleich richtig orientiert platzieren. So haben sie jeweils optimale optische Bedingungen.



Orientierung der Schnitte

Es ist viel einfacher, den Schnitt richtig auf dem Objektträger zu platzieren, als mit „gedrehtem Mikroskop“ zu zeichnen (Abb. 2.2).

Der Goldene Schnitt

- Schneiden ist eine handwerkliche Fähigkeit, die erst erlernt sein will. Wer es mit einem einzigen Schnitt schafft, ist ein Künstler oder ein Glückspilz.
- Ein optimaler, dünner Schnitt erfordert:
 - eine scharfe Klinge (eine unbenutzte Stelle einer Rasierklinge ist also immer von Vorteil),
 - ein hartes Objekt (ggf. Gewebe in Alkohol einlegen; Entwässerung führt zur Härtung),
 - eine kleine Schnittfläche (immer nur so viel Fläche schneiden, wie nötig).
- Ein Schnitt über den ganzen Sprossquerschnitt ist für die Übersichtszeichnung u. U. gut geeignet, aber für die Detailzeichnung meist zu dick. Deshalb immer mehrere Schnitte anfertigen und die geeigneten auswählen (Abb. 2.2). Auch kleinste „Schnitzelchen“ können hervorragend für Detailbeobachtungen geeignet sein (Abb. 2.3).
- Richtige Schnittführung (z. B. quer, radial, tangential).
- Richtige Behandlung des Schnittes: Blasenfrei „eindeckeln“, „Wasserstand“ optimieren, nicht quetschen (Abb. 2.4).