



MASTERARBEIT | MASTER'S THESIS

Titel | Title

Optimierung der Probenvorbereitung für Kryoschnitte zur
Analyse mittels MALDI-MS

verfasst von | submitted by
Vanessa Struckl BSc

angestrebter akademischer Grad | in partial fulfilment of the requirements for the degree of
Magistra pharmaciae (Mag. pharm.)

Wien | Vienna, 2025

Studienkennzahl lt. Studienblatt | Degree
programme code as it appears on the
student record sheet:

UA 066 605

Studienrichtung lt. Studienblatt | Degree
programme as it appears on the student
record sheet:

Masterstudium Pharmazie

Betreut von | Supervisor:

ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Sabine Glasl-Tazreiter

Mitbetreut von | Co-Supervisor:

Mag. Dr. Elisabeth Ginko

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Zielsetzung	3
1.1	Kryoschnitt-Technik.....	3
1.2	Matrix-unterstützte Laser-Desorptions/Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-MS)	4
1.3	Bedeutung und Anwendung in der pharmazeutischen und biomedizinischen Forschung.....	5
1.4	Zielsetzung	7
2	Materialien und Methoden	9
2.1	Auswahl und Lagerung des pflanzlichen Ausgangsmaterials	9
2.2	Chemikalien und Reagenzien	11
2.3	Instrumentierung (Mikroskope und Kryotom)	11
2.4	Mikroskopische Schnitttechnik	12
2.5	Vorbereitung der Proben für das Kryostat-Mikrotom.....	14
2.6	Herstellung der Kryoschnitte	15
3	Ergebnisse	16
3.1	Optimierung der Schnitttechnik und Einbettung für das Kryotom.....	16
3.2	Einbettung und Lagerung	17
3.2.1	Einbettung und Lagerung von Wurzel- und Sprossdrogen	17
3.2.2	Einbettung und Lagerung von Blatt- und Fruchtrogen	17
3.3	Herstellung der Kryoschnitte	22
3.3.1	Blatt-Drogen	22
3.3.2	Wurzel-Drogen.....	23
3.3.3	Spross-Drogen	23
3.3.4	Frucht-Drogen.....	23
3.4	Mounting-Techniken	26
3.5	<i>Monstera deliciosa</i> Liebm.; Köstliches Fensterblatt; Luftwurzel	27
3.5.1	Anatomie	27
3.5.2	Positivkontrolle	27
3.5.3	Kryoschnitt.....	28
3.6	<i>Eucalyptus globulus</i> Labill.; Blauer Eukalyptus; Blatt	32
3.6.1	Anatomie	32
3.6.2	Positivkontrolle	32
3.6.3	Kryoschnitt.....	33
3.7	<i>Myrtus communis</i> (L.) Scop.; Duftende Myrte; Blatt.....	36
3.7.1	Anatomie	36
3.7.2	Positivkontrolle	36
3.7.3	Kryoschnitt.....	37
3.8	<i>Citrus x limon</i> (L.) Osbeck, Zitrone; Blatt	40
3.8.1	Anatomie	40
3.8.2	Positivkontrolle	40
3.8.3	Kryoschnitt.....	41
3.9	<i>Piper ornatum</i> N.E.Br.; Celebes-Pfeffer; Blatt	44
3.9.1	Anatomie	44

3.9.2	Positivkontrolle.....	44
3.9.3	Kryoschnitt.....	45
3.10	<i>Aloe vera (L.) Burm.F.; Echte Aloe; Blatt</i>	50
3.10.1	Anatomie	50
3.10.2	Positivkontrolle	50
3.10.3	Kryoschnitt.....	52
3.11	<i>Myrrhis odorata (L.) Scop.; Süßdolde; Frucht</i>	56
3.11.1	Anatomie	56
3.11.2	Positivkontrolle	56
3.11.3	Kryoschnitt	57
3.12	<i>Foeniculum vulgare Mill.; Fenchel; Frucht</i>	61
3.12.1	Anatomie	61
3.12.2	Positivkontrolle	61
3.12.3	Kryoschnitt	62
3.13	<i>Acorus calamus L.; Kalmus; Wurzel</i>	67
3.13.1	Anatomie	67
3.13.2	Positivkontrolle	67
3.13.3	Kryoschnitt	68
3.14	<i>Ruscus aculeatus L.; Stechender Mäusedorn; Wurzel</i>	71
3.14.1	Anatomie	71
3.14.2	Positivkontrolle	71
3.14.3	Kryoschnitt	72
4	Diskussion.....	77
5	Schlussfolgerung und Ausblick	84
6	Zusammenfassung	86
7	Literaturverzeichnis	90

1 Einleitung und Zielsetzung

Die Qualität analytischer Verfahren hängt maßgeblich von der Probenvorbereitung ab. Dies gilt vor allem für die Kombination mikroskopischer und massenspektrometrischer Methoden, welche in der Human- und Tierforschung eine zentrale Rolle spielen. Betreffend die Untersuchung pflanzlichen Gewebes befindet sich diese Methodenkombination noch in den Anfängen. Die Kryoschnitt-Technik ermöglicht die Herstellung feinsten Schnitte, während der natürliche Zustand des Probenmaterials weitgehend erhalten bleibt. Insbesondere in der Pflanzenforschung stellt dieser Prozess durch die stabilen pflanzlichen Zellwände und den hohen Wassergehalt jedoch eine Herausforderung dar und kann die Qualität der Ergebnisse maßgeblich beeinflussen. Die Matrix-unterstützte Laser-Desorptions/Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-MS) ergänzt diese Methode, indem sie die räumliche Verteilung von Molekülen in Geweben darstellt – ein Vorteil für die Identifikation pflanzlicher Inhaltsstoffe. Eine genaue Probenvorbereitung und sorgfältige Durchführung sind jedoch wichtig, um zuverlässige Ergebnisse zu erzielen. Aus diesem Grund widmet sich die Einleitung zunächst der Kryoschnitt-Technik, ihrer Funktionsweise und bisherigen Relevanz. Anschließend wird auf die MALDI-MS-Technik eingegangen. Daraus resultierend wird abschließend die Bedeutung dieser Methodenkombination für die pharmazeutische und biomedizinische Forschung diskutiert, um die Relevanz dieser Verfahrensoptimierung für die Pflanzenforschung zu betonen.

1.1 Kryoschnitt-Technik

Die Kryoschnitt-Technik, also das Schneiden gefrorener Proben, ist seit über einem Jahrhundert ein etabliertes Verfahren in der Histologie und wird auch heutzutage häufig in der Forschung eingesetzt. Ursprünglich wurde es im späten 19. Jahrhundert entwickelt, um Ärzten schnelle pathologische Untersuchungen ihrer Patienten zu ermöglichen. Die erste oft zitierte Arbeit, in der eine funktionierende Technik beschrieben wurde, erschien 1905 und trug den Titel „A Method For The Rapid Preparation Of Fresh Tissues For The Microscope“. Der Autor Louis B. Wilson beschrieb in dieser kurzen Veröffentlichung eine Methode, welche es erlaubte, frische Gewebeproben in kürzester Zeit zu schneiden, zu färben und einer mikroskopischen Untersuchung zu unterziehen, um die Diagnosestellung von Patienten zu beschleunigen (Wilson M.D., 1905). Im Laufe der Zeit häufte sich der Einsatz der Kryosektion und macht sie bis heute zu einem nicht wegzudenkenden Teil wissenschaftlicher Studien. Obwohl sich die

Methodik seit ihrer Erfindung weiterentwickelt hat, ist das allgemeine Konzept ähnlich geblieben. Beim Schneiden von gefrorenem Gewebe in feine Schnitte handelt es sich um eine schnelle und effektive Technik zur Charakterisierung der Gewebemorphologie. Typischerweise wird das Probenmaterial lose oder in einem Einbettungsmaterial eingefroren und anschließend geschnitten (Son et al., 2018). Die Technik ermöglicht die Anfertigung von Serienschnitten bei Minustemperaturen, wodurch die Integrität der Zellstruktur erhalten bleibt und eine genaue mikroskopische Analyse ermöglicht wird. Dabei ist zu beachten, dass die Temperatureinstellungen je nach Gewebeart leicht variieren können (Ross et al., 2022). Das verwendete Gerät, ein Kryostat-Mikrotom, besteht aus einem Mikrotom in einer tiefgekühlten Kammer, in der die Proben bei konstanten und voreingestellten Temperaturen meistens von -20 bis -30 °C bearbeitet werden (Paletzki & Gerfen, 2019). Die Gewebeschnitte können anschließend mit unterschiedlichen Methoden analysiert werden, darunter Immunhistochemie, Immunfluoreszenz, In-situ-Hybridisierung oder verschiedene andere Gegenfärbemethoden (Son et al., 2018). Zum Beispiel wird die Kryoschnitt-Technik häufig in der humanen Pathologie eingesetzt, um Zellveränderungen zu untersuchen, die im Zusammenhang mit spezifischen Krankheiten stehen. Ebenfalls ist sie ein essenzielles Tool für die Immunhistochemie, welche Antikörper zur Markierung spezifischer Proteine in Gewebeproben nutzt (Ross et al., 2022). In der Tierhistologie erlaubt diese Methode die Untersuchung von Modellen wie zum Beispiel Zebrafischen, einem der wichtigsten Wirbeltier-Modellsysteme, die zur Erforschung von Fettstoffwechselerkrankungen verwendet werden. In solchen Fällen werden sehr dünne Serienschnitte von nur einigen µm verwendet, um die Verteilung von Biomolekülen in Organen wie der Leber oder dem Gehirn zu untersuchen (Stutts et al., 2020).

1.2 Matrix-unterstützte Laser-Desorptions/Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-MS)

Die MALDI-MS ist eine analytische Methode, die die räumliche Verteilung von Biomolekülen wie Proteinen, Lipiden und Metaboliten in Gewebeproben sichtbar macht. Im Grunde kombiniert sie die Vorteile der Massenspektrometrie mit bildgebenden Verfahren (Rodig, 2021). Hierbei wird ein Ultraviolett (UV)-Laser genutzt, um Moleküle auf der Gewebeoberfläche zu ionisieren und folglich ein Massenspektrum zu erzeugen. Anschließend werden diese ionisierten Partikel nach ihrem Masse-Ladungs-Verhältnis (m/z) im Flugzeit-Detektor (TOF) getrennt, wodurch ihre räumliche Verteilung dargestellt werden kann. Ein

wesentlicher Vorteil dieser Technik ist, dass mehrere Stoffe gleichzeitig erfasst werden können, ohne dass sie vorher bereits identifiziert sein müssen (Kaspar et al., 2011). Dieses Bildgebungsverfahren wird in der biomedizinischen Forschung immer häufiger verwendet, um molekulare Merkmale zu untersuchen, unter anderem im Zusammenhang mit Lungentumoren, Gliomen oder Brustkrebs, sowie die Verteilung von Arzneistoffen (Peukert et al., 2014). Auch in der Pflanzenforschung nimmt die Bedeutung der MALDI-MS zu, da sie die Darstellung der räumlichen Verteilung von Molekülen im pflanzlichen Gewebe, unter anderem Metaboliten und Proteinen, ermöglicht (Kaspar et al., 2011). Wie bereits weiter oben erwähnt werden MALDI-MS-Systeme typischerweise mit einem Flugzeit-Detektor (TOF) kombiniert, welcher eine schnelle und empfindliche Analyse der ionisierten Moleküle zulässt, indem er die Zeit misst, die diese benötigen, um eine bestimmte Strecke zurückzulegen. In einigen Studien wird darauf hingewiesen, dass die Wahl der Matrix und die Matrixaufbringung selbst unter anderem entscheidend für die Qualität der Ergebnisse ist. Die Matrix, welche die Ionisation der Moleküle unterstützt, wird direkt auf die Schnitte aufgetragen. Anschließend erfolgt erst die Bestrahlung mit dem Laser. Es ist wesentlich, diese Schritte präzise auszuführen, um möglichst genaue Ergebnisse zu erzielen (Goodwin et al., 2008).

1.3 Bedeutung und Anwendung in der pharmazeutischen und biomedizinischen Forschung

Durch die Kombination der Kryosektion mit der MALDI-MS werden eine Vielzahl an Anwendungsmöglichkeiten in unterschiedlichen Forschungsbereichen geboten. Dadurch, dass es möglich ist Serienschnitte unterschiedlicher Dicken anzufertigen, wird die Analyse zellulärer Veränderungen im Zusammenhang mit spezifischen Krankheitsbildern oder Therapieansätzen möglich gemacht (Ross et al., 2022). Zusätzlich kann auch die räumliche Verteilung von Stoffen wie Metaboliten und Proteinen in unterschiedlichen Organen und Geweben sichtbar gemacht werden (Paletzki & Gerfen, 2019).

Während dies in der Tier- und Humanforschung bereits ein Standardverfahren ist, steht die Technik in der Pflanzenforschung noch am Anfang. Durch die besonderen strukturellen Voraussetzungen pflanzlicher Gewebe ist Vorbereitung der Proben anspruchsvoll. Unter anderem stellen die starren Zellwände, der hohe Wassergehalt und die großen Vakuolen für den Schneideprozess am Kryostat-Mikrotom eine Herausforderung dar (Schmidt et al., 2018). Ein Beitrag von Dong (2016) liefert einen guten Überblick über die verschiedenen Techniken zur Probenvorbereitung und thematisiert dabei ebenfalls die spezifischen Anforderungen und

Limitationen, die speziell bei der MS-Analyse von Pflanzengeweben auftreten. Unter anderem wird betont, dass die starre Zellwand den Zugang zu Metaboliten erschwert und der hohe Wassergehalt der Zellen beim Einfrieren zur Bildung von Eiskristallen führen kann. Dies kann nicht nur die Struktur der Gewebeproben schädigen, sondern auch die Qualität der Analysedaten beeinträchtigen. Aus diesem Grund muss auch dieser Prozess mit Sorgfalt durchgeführt und kontrolliert werden (Dong et al., 2016). Ein zusätzliches Problem ist die geringe mechanische Stabilität der Schnitte. Während Proben in der Tier- und Humanhistologie für die meisten Untersuchungen mit OCT (Optimal Cutting Temperature) Compound, eine im Handel erhältliche Mischung aus Polyvinylalkohol, Polyethylenglykol, Dimethylbenzyl und Ammoniumchlorid (Rodig, 2021) stabilisiert werden, gilt dies in der Pflanzenforschung für die MALDI-MS-Analyse als problematisch, da durch die ausgelöste Ionensuppression Analyt-Signale gestört werden. Da OCT Compound leicht ionisierbare Substanzen enthält, sollte es in der Pflanzenforschung nur zur Befestigung des Präparates am Stempel des Kryostat-Mikrotoms verwendet werden, um eine Verunreinigung der Proben zu vermeiden (Kaspar et al., 2011). In der Studie von Schmidt (2018) wird denaturiertes Albumin, welches nur wenige kleine Moleküle enthält, als alternatives Einbettungsmedium erfolgreich zur Stabilisierung sowie zur einfacheren Handhabung der Pflanzen eingesetzt. Durch die Untersuchung von sekundären Metaboliten am Beispiel von Hydroxynitrilglucosiden zeigt die Forschungsgruppe die Vorteile der Kombination von Kryosektion mit der MALDI-MS-Analyse auf. Es wird betont, dass dadurch nicht nur die Signalintensität stark erhöht werden kann, sondern auch die Bruchanfälligkeit reduziert wird. Ebenfalls wird hervorgehoben, dass die Wahl der Matrix, welche diese Arbeit aus zeitlichen Gründen nicht abdeckt, eine zentrale Rolle für das Outcome spielt. Zusammenfassend wird am Schluss noch darauf hingewiesen, dass die ideale Probenvorbereitung allgemein ein essenzieller Schritt für das Erzielen von bestmöglichen Ergebnissen bei der MALDI-MS-Analyse ist (Schmidt et al., 2018). Eine Studie von Dong (2016) betont ebenfalls, dass der Einsatz von OCT Compound in der Pflanzenforschung aufgrund seiner störenden Effekte problematisch ist. OCT kann während des Schneideprozesses die Oberfläche der Pflanzenschnitte verunreinigen oder auch in die Zellen diffundieren. Aus diesem Grund werden auch von dieser Forschungsgruppe alternative Einbettungsmedien wie Carboxymethylcellulose (CMC) bzw. Carmellose, Gelatine oder Eis empfohlen, die sich als besser geeignet für diese Forschungsarbeit erwiesen haben. Darüber hinaus ist auch die Schnittdicke ein wesentlicher Punkt, welcher bei der Probenvorbereitung

berücksichtigt werden sollte. Während in der Tier- und Humanhistologie sehr dünne Schnitte von nur wenigen Mikrometern üblich sind, erfordern Pflanzen aufgrund der Unterschiede in der Zellgröße dickere Schnitte, in der Regel zwischen 40 und 60 μm , um die Strukturhaltung zu gewährleisten. Schließlich wird sowohl die Wahl der Matrix als auch die Aufbringungsmethode diskutiert, da beide Aspekte das Analyseergebnis erheblich beeinflussen können, wobei in dieser Studie gezeigt werden konnte, dass die Sublimation im Vergleich zum herkömmlichen Sprühen bessere Ergebnisse liefert. Zusammenfassend bestätigt auch diese Arbeit, dass verschiedene Faktoren, darunter die Lagerung, die Einbettung, der Schneideprozess aber auch die Auswahl der Ionisierungsunterstützung für eine erfolgreiche Probenvorbereitung ausschlaggebend ist. Jeder der oben genannten Faktoren sollte je nach Beschaffenheit der Probe mit Sorgfalt angepasst werden (Dong et al., 2016).

1.4 Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Optimierung der Probenvorbereitung von Kryoschnitten für die MALDI-MS. Während es sich bei dieser Kombination an wissenschaftlicher Methodik in der Human- und Tierforschung bereits um ein Standardverfahren handelt, treten bei pflanzlichen Proben viele Probleme auf, die bereits in Kapitel 1.3 thematisiert wurden. Die zugrunde liegende Hypothese lautet, dass die Optimierung der Probenvorbereitung – die Auswahl geeigneter Einbettungsmedien, die Untersuchung der Schnittdicke und die Steuerung des Einfrierprozesses – es erlaubt, die Strukturen der Pflanzengewebe derart zu erhalten, dass darauffolgende weitergehende Analysen (z. B. mittels MALDI-TOF-MS) möglich sind. Dadurch könnte die Mikroskopie, die per se nicht der Identifizierung von Pflanzeninhaltsstoffen dient, als zusätzliche analytische Methode im Bereich der Phytochemie eingesetzt werden. Dies böte den Vorteil, Pflanzenmetabolite zu identifizieren und gleichzeitig Information über deren Lokalisation im pflanzlichen Gewebe zu erhalten. Um diese Frage zu beantworten, wird in der vorliegenden Masterarbeit ein mehrstufiger methodischer Ansatz verfolgt, welcher sich an bereits bekannten wissenschaftlichen Techniken orientiert und diese mit neuen Ideen kombiniert. Besonders im Fokus stehen hierbei auch die nötigen Anpassungen für unterschiedliche Pflanzenorgane. Aus zeitlichen Gründen deckt diese Arbeit weder die Matrix-Applikation noch die Vermessung in der MALDI-MS ab. Stattdessen werden „Positivkontrollen“ von gewöhnlichen Wasserpräparaten und Chloralhydrat-Präparaten unterschiedlicher Pflanzen

mit den Kryoschnitten verglichen, um das ausreichende Vorhandensein spezifischer Inhaltsstoffe z. B. ätherische Öle sowie die Erhaltung der Struktur zu überprüfen.

Die Arbeit ist derart strukturiert, dass zunächst auf die organspezifische Präparation und alles was damit in Zusammenhang steht, eingegangen wird (Kap. 3.1-3.4). In einem weiteren Kapitel werden die entwickelten Methoden an ausgewählten Beispielen veranschaulicht. Für jede Pflanzenprobe wird die Anatomie der Pflanze, die Herstellung der Positivkontrollen als auch die detaillierte Vorgehensweise am Kryostat-Mikrotom beschrieben (Kap. 3.5-3.14).

2 Materialien und Methoden

2.1 Auswahl und Lagerung des pflanzlichen Ausgangsmaterials

Für die Arbeit wurde eine Auswahl an Pflanzen verwendet, um einen möglichst großen Bereich unterschiedlicher Organe und Gewebe abzudecken. Die in Tab. 1, S. 9, gelisteten Pflanzenarten und Organe wurden untersucht.

Pflanzenart	Familie	Organ	Herkunftsort
<i>Eucalyptus globulus</i> Labill.	Myrtaceae	Blatt	Universität Wien, UZA II, Glashaus
<i>Myrtus communis</i> L.	Myrtaceae	Blatt	Kultivierung: 3702 Stranzendorf
<i>Citrus x limon</i> (L.) Osbeck	Rutaceae	Blatt	Universität Wien, UZA II, Glashaus
<i>Piper ornatum</i> N.E.Br.	Piperaceae	Blatt	Universität Wien, UZA II, Glashaus
<i>Aloe vera</i> (L.) Burm.F.	Asphodelaceae	Blatt	Universität Wien, UZA II, Raum 2G150
<i>Myrrhis odorata</i> (L.) Scop.	Apiaceae	Frucht	Kultivierung: 3702 Stranzendorf
<i>Foeniculum vulgare</i> Mill.	Apiaceae	Frucht	Universität Wien, UZA II, Depot Hersteller: Kottas Pharma GmbH Chargennummer: W22201282
<i>Acorus calamus</i> L.	Acoraceae	Wurzel	Kultivierung: 3702 Stranzendorf
<i>Monstera deliciosa</i> Liebm.	Araceae	Luftwurzel	Universität Wien, Geozentrum, Spange 2
<i>Ruscus aculeatus</i> L.	Asparagaceae	Wurzel	Kultivierung: 3702 Stranzendorf

Tabelle 1: Untersuchte Gattungen und Organe sowie Herkünfte derselben

Bei der Probenauswahl wurde auf die ganzjährige Verfügbarkeit geachtet, um während der Masterarbeit ausreichend Frischmaterial zu haben. Zusätzlich erfolgte die Auswahl auch nach der Größe und Menge der Zellinhaltsstoffe. Anfänglich wurden Pflanzen verwendet, die bereits gut charakterisiert und in der Literatur beschrieben waren, um zu überprüfen, ob die entwickelte Methode funktioniert. Es wurden bewusst unterschiedliche Organe herangezogen, um herauszufinden, ob die Präparationen organspezifisch erfolgen mussten und Anpassungen vorzunehmen sind, oder ob die Präparationen unabhängig vom Organ immer gleich durchgeführt werden können. Diese Arbeit deckt die Untersuchung von fünf Blättern, zwei Wurzeln, zwei Früchten und einer Luftwurzel ab, wobei bei der Auswahl auf

Vielfalt und Charakteristika geachtet wurde. So wurde z. B. die Luftwurzel von *Monstera deliciosa* zunächst aufgrund ihrer gut aufklärten Struktur in die Untersuchung miteinbezogen. Die fünf Blätter wurden aufgrund unterschiedlicher Dicke, Oberflächenbeschaffenheiten und Anatomie untersucht. *Eucalyptus globulus* hat dicke, ledrige Blätter, während es sich bei *Aloe vera* um eine Sukkulente mit wachsartigen und fleischigen Blättern handelt. *Myrtus communis* und *Citrus x limon* wurden aufgrund der großen Ölbehälter ausgewählt. *Piper ornatum* wurde wegen der auffälligen herzförmigen und gemusterten Blattoberfläche und der ledrigen, glatten Haptik bearbeitet. Die Auswahl der Früchte fiel wegen ihres hohen Gehalts an ätherischen Ölen und ihrer Brüchigkeit auf *Myrrhis odorata* und *Foeniculum vulgare*. Bei den Wurzeln von *Acorus calamus* und *Ruscus aculeatus* waren die Unterschiede im Härtegrad und der Oberfläche ausschlaggebend. Ein Großteil der Proben war an der Universität lagernd und konnte auch für jeden Versuch frisch geerntet und geschnitten werden. Die restlichen drei Proben wurden vom Gärtner Christof Endl aus seinem eigenen Garten in Stranzendorf (s. Tab. 1, S. 9) mitgebracht. Es wurde darauf geachtet zügig zu arbeiten oder das Pflanzenmaterial in einem großen Erlenmeyerkolben eingewässert im Kühlschrank bei ca. 6 °C zu lagern, um es frisch zu halten. Das Wasser wurde mindestens jeden zweiten Tag gewechselt, und der Zustand der Pflanzen wurde täglich kontrolliert. Ausgenommen davon waren die zwei Frucht-Drogen, da es sich hier um getrocknetes Drogenmaterial handelte.

2.2 Chemikalien und Reagenzien

In Tab. 2, S. 11, sind die verwendeten Chemikalien und Reagenzien aufgelistet.

Substanz	Herkunftsort
Gereinigtes Wasser	Universität Wien, UZA II
Chloralhydrat (60%)	Universität Wien, UZA II
Carboxymethylcellulose (CMC) Carmellose	Duchefa Farma B.V. Chargennummer: 248509
Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound	Sakura Finetek USA, Inc. Product Code: 4583 Chargennummer: 1134700024
Safranin-Astrablau Reagenz 0.5% Astrablau in 0.5%iger Essigsäure, 0.5% wässrige Safraninlösung [5:1]	Universität Wien, UZA II
Sudan-IV-Reagenz 0,01g Sudan IV in 5 ml 96% EtOH, anschließend Zugabe von 5 ml Glycerin	Universität Wien, UZA II
KOH-Reagenz Färbelösung: 3% Kaliumhydroxid-Lösung	Universität Wien, UZA II
Methylenblau-Reagenz 0,5% Methylenblau-Lösung in Wasser	Universität Wien, UZA II

Tabelle 2: Verwendete Chemikalien und Reagenzien

2.3 Instrumentierung (Mikroskope und Kryotom)

Es wurde mit zwei unterschiedlichen Mikroskopen gearbeitet. Zu Beginn wurde das Mikroskop Leica DM750 verwendet und später auf das Mikroskop Nikon Optiphot-2 gewechselt. Für die Bildgebung wurde zuerst eine Kamera der Marke Leica verwendet. Mit dem Wechsel des Mikroskops wurde auf eine ProgRes-Kamera Jenoptik GRYPHAX umgestellt.

Für das Schneiden der gefrorenen Proben wurde das Kryostat-Mikrotom SLEE medical MNT (SN: F1 14 0001) verwendet. Die Pflanzen wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und die Lagerung erfolgte in Gefriertruhen bei -20 °C. Dazu wurde der flüssige Stickstoff in eine kleine Metallpatene überführt. Mithilfe einer Pinzette wurden die mit Carmellose gefüllten Würfel

und die Falcon Tubes vorsichtig in den Stickstoff eingetaucht und dort etwa eine Minute belassen. Dabei war es wichtig, dass das pflanzliche Probenmaterial nicht direkt mit dem Stickstoff in Kontakt kam, da sich dadurch das Risiko der Bildung von Eiskristallen erhöht.

2.4 Mikroskopische Schnitttechnik

Um das Resultat der Kryosektion zu bewerten, wurden für jede Pflanze anfangs sogenannte „Positivkontrollen“ hergestellt. Dies erfolgte in Form von Schnitten per Hand, welche unter dem Mikroskop mit den Gefrierschnitten verglichen wurden. Sowohl Wasserpräparate als auch Chloralhydrat-Präparate wurden untersucht, um die Pflanzenanatomie im Vorhinein aufzuklären. Ein Wasserpräparat war notwendig, um den natürlichen Zustand der Pflanze abzubilden und bestimmte Substanzen wie Stärke oder Inulin sichtbar zu machen. Die Präparation mit Chloralhydrat würde diese Inhaltsstoffe zerstören oder auflösen, war aber für den größeren Teil der mikroskopischen Untersuchung von entscheidender Bedeutung. Die Schnitttechniken unterschieden sich je nach Pflanzenorgan: Wurzel- und Fruchtdrogen wurden in der Hand geschnitten, während Schnittpräparate von Blatt- und Sprossdrogen direkt auf dem Objektträger angefertigt wurden. Eine ausführliche Beschreibung der Vorgehensweise erfolgt im Ergebnisteil (s. Kapitel 3.1, S. 16).

Färbemethoden

Es kamen verschiedene Färbereagentien (s. Tab. 2, S. 11) zum Einsatz. *Safranin-Astrablau* dient der differenzierten Darstellung verholzter Anteile, die als rot gefärbte Strukturen erkennbar sind, während Astrablau alle lebenden Strukturen in blauer Farbe darstellt. *Sudanrot IV* wird verwendet, um lipophile Substanzen rot anzufärben (z. B. Cuticula, Endodermis, fettes Öl etc.). Die Verwendung von *KOH*-Lösung in der Mikroskopie stellt eine nasschemische Reaktion dar und führt zu einer Rotfärbung hochoxidierter Anthrachinonderivate. *Methylenblau* wurde zur Färbung von Schleimen und Polysaccharid-Anteilen verwendet.

Safranin-Astrablau-Färbung

Färbelösung: 0.5% Astrablau in 0.5%iger Essigsäure, 0.5% wässrige Safraninlösung [5:1]

1. Herstellung eines Chloralhydrat-Präparats
2. 2 Tropfen der Färbelösung auf einen Objektträger tropfen
3. Schnitt aus dem Chloralhydrat entfernen, in Wasser gründlich waschen und in die Färbelösung einbringen
4. Färbedauer: Ca. 30 Sekunden bis maximal 1 Minute
5. Anschließend den Schnitt gründlich in EtOH 70% auswaschen und eventuell noch 5-10 Minuten in Glycerin legen
6. Erneut kurz in Wasser waschen und dann Überführung in ein Wasserpräparat

Ergebnis: Lignifizierte Zellwände färben sich rot (z.B. Tracheen, Fasern usw.). Dahingegen färben sich nicht lignifizierte Zellwände blau (z.B. Siebröhren, Parenchym usw.).

Sudanrot IV-Färbung

Färbelösung: 0,01g Sudan IV in 5 ml 96% EtOH, anschließend Zugabe von 5 ml Glycerin

1. Schnitt in Chloralhydrat aufkochen und anschließend mit Wasser gründlich waschen.
2. 1-2 Tropfen Färbelösung auf frischen Objektträger aufbringen
3. Schnitt in Färbelösung überführen und ein Deckglas aufsetzen
4. Das Präparat kurz erwärmen, aber nicht zum Kochen bringen
5. Objektträger ca. 15 Minuten zur Seite legen
6. Danach den Schnitt in 70%igem EtOH kurz waschen, bis nur noch eine schwache Rosafärbung sichtbar ist
7. Schnitt in ein Wasserpräparat überführen

Ergebnis: Rotfärbung von lipophilen Substanzen (z.B. Cutin und Suberin) → Rotfärbung der Cuticula und der Endodermis, aber auch von fetten Ölen u.a.

KOH-Färbung

Färbelösung: 3% Kaliumhydroxid-Lösung

1. Herstellung eines Wasserpräparats
2. 1 Tropfen Färbelösung auf den Objektträger tropfen
3. Deckglas aufsetzen
4. Zügige Beobachtung im Mikroskop

Ergebnis: Rotfärbung durch Bornträger-Reaktion (Nachweis von 1,8-Dihydroxyanthrachinone)

Methylenblau-Färbung

Färbelösung: Vitalfarbstoff – 0,5% Methylenblau-Lösung in Wasser

1. Herstellung eines Wasserpräparats
2. 1 Tropfen Färbelösung auf den Objektträger tropfen
3. Deckglas aufsetzen
4. Farbstoff mit einem Filterpapier am Rand durch das Präparat durchsaugen
5. Wasser nachtropfen

Ergebnis: Schleim färbt sich Cobaltblau, Umgebung türkisblau

2.5 Vorbereitung der Proben für das Kryostat-Mikrotom

Die Probenvorbereitung unterschied sich je nach Pflanzenorgan (Blätter, Wurzeln, Sprosse, Früchte) und den speziellen Anforderungen, die sich aus der Materialbeschaffenheit ergaben. Zwei verschiedene Einbettungsmedien, Eiweiß- und CMC-Gel, wurden verwendet, wobei für bestimmte Pflanzenorgane das Weglassen der Einbettung vorzuziehen war. Die Proben wurden anschließend im gefrorenen Zustand geschnitten. Eine detaillierte Beschreibung der eingesetzten Techniken erfolgt im Ergebnisteil (s. Kapitel 3.2, S. 17-22).

Einbettungsmedien

Verschiedene Medien wurden zur getestet, um das Einfrieren und Schneiden zu optimieren. Zunächst wurde mit denaturiertem Albumin gearbeitet, wobei unterschiedliche Methoden zur Präparation des flüssigen Eiweißes ausprobiert wurden, um eine stabile Grundlage für die Einbettung des Probenmaterials zu gewährleisten (s. Kapitel 3.2.2.1, S. 17-19). Daraufgehend wurden mehrere CMC-Gele mit unterschiedlichen Konzentrationen (5% und 10%) hergestellt und getestet (s. Kapitel 3.2.2.2, S. 19-22).

Schneidetechniken

Die Schneidetechnik wurde an die spezifischen Eigenschaften des Pflanzenorgans angepasst: Wurzel- und Sprossdrogen wurden häufig direkt ohne Einbettungsmedium geschnitten (s. Abbildungen 14-17, S. 25). Bei Blatt- und Fruchtorganen hingegen war ein Einbettungsmedium erforderlich (s. Abbildungen 10-13, S. 24), um den Proben eine ausreichende Stabilität während des Gefrierschnitterstellung zu bieten. Die Querschnitte lagen im Bereich von 10 bis 100 µm, wobei konstant die bestmögliche Qualität bei minimaler Schnittdicke angestrebt wurde.

Frierprozess und Lagerung

Wurzel- und Sprossdrogen wurden vor dem Schneiden lose in Falcon Tubes gelegt und mithilfe von Flüssigstickstoff (-196 °C) eingefroren. Die anschließende Lagerung erfolgte in einer Tiefkühltruhe bei -20 °C. Blätter und Früchte hingegen wurden in Einbettungsmedien wie denaturiertem Albumin oder Carmellose mithilfe von Waterdrop®-Würfeln stabilisiert. Für den Transport der gefrorenen Proben wurde eine Styroporbox mit Kühlpacks verwendet. Eine ausführliche Prozessbeschreibung für die unterschiedlichen Pflanzenorgane folgt im Ergebnisteil (s. Kapitel 3.2, S. 17-22).

2.6 Herstellung der Kryoschnitte

Für die Gefrierschnittanfertigung wurde ein Kryostat-Mikrotom verwendet. Dieses ist mit einer konstant auf -20 °C eingestellten, tiefgeköhlten Kammer ausgestattet. Die Schneidetechnik wurde je nach Pflanzenorgan kontinuierlich angepasst. Wurzel- und Sprossdrogen wurden direkt ohne Einbettungsmedium geschnitten, während Früchte entweder ohne Einbettung oder in Würfeln eingebettet geschnitten wurden. Blätter wurden vor dem Schneiden in CMC-Gel oder Albumin eingebettet. Die Schnitte wurden in Schritten von 5 µm gemacht. Begonnen wurde im höheren Mikrometerbereich bei 100 µm bis schrittweise auf bis zu 10 µm reduziert wurde. Details zur verwendeten Schneidetechnik und den spezifischen Anpassungen sind im Ergebnisteil beschrieben (s. Kapitel 3.3, S. 22-23).

Mounting-Techniken

Thaw-Mounting ist eine Technik, bei der die gefrorenen Gewebeschnitte auf einen Objektträger mit Raumtemperatur aufgebracht wurden. Es wurden verschiedenste Methoden versucht, um die Kryoschnitte auf die Objektträger überzuführen. Neben der klassischen Thaw-Mounting-Technik, welche schon aus der Literatur bekannt war, wurde auch doppelseitiges Klebeband zur Fixierung der Schnitte verwendet. Außerdem wurde die Pinselmethode eingesetzt, wobei der Objektträger vorher bei -20 °C vorgeköhlt wurde, um die Effizienz zu erhöhen. Eine detaillierte Aufschlüsselung der angewandten Techniken und deren Anpassungen sind im Ergebnisteil zu finden (s. Kapitel 3.4, S. 26).

3 Ergebnisse

Das folgende Kapitel ist in zwei Abschnitte unterteilt. Der erste Teil beschreibt die Optimierung der Schnitttechniken, wobei sowohl die klassische Mikroskopie als auch die Präparation der Kryoschnitte behandelt wird. Im zweiten Teil werden ausgewählte Pflanzenproben ausführlich beschrieben.

3.1 Optimierung der Schnitttechnik und Einbettung für das Kryotom

In diesem Kapitel werden die detaillierten Vorgehensweisen abhängig vom Pflanzenorgan beschrieben.

Mikroskopische Schnitttechnik

Die Technik für die Herstellung der Handschnitte variierte je nach Organ. Für die meisten Blätter wurden auf einem Objektträger mehrere Querschnitte mit einer Rasierklinge angefertigt, die anschließend mit einem Pinsel in Wasser oder wässrige Chloralhydrat-Lösung (60%) eingelegt wurden. Die Blätter der *Aloe vera* wurden zuerst mit einer Rasierklinge horizontal in der Hand geschnitten. Diese Methode wurde jedoch fortlaufend durch die oben bereits beschriebene Methode ersetzt. Das Schneiden auf dem Objektträger war auch für den Spross erfolgreich. Die Wurzeln und Früchte wurden zuerst in etwa zwei Zentimeter lange, flache Stücke geteilt und in die Hand genommen. Für den Schnitt wurde die Rasierklinge an einer Seite angesetzt und in einer fließenden Bewegung ein Querschnitt angefertigt. Die Schnitte wurden dann auf Objektträgern in Wasser oder Chloralhydrat eingelegt.

Vergleich der Schnittdicken

Um die Schnittdicke von Handschnitten mit jenen aus dem Kryostat-Mikrotom zu vergleichen, wurde ein Experiment zur Dickenmessung gemacht. Aufgrund fehlender Maßstabsskalen für den Feintrieb des Mikroskops konnte die Fokussierung der Ebenen nicht zur Bestimmung der Schnittdicke verwendet werden. Stattdessen wurde die Breite eines Querschnitts nachfolgend an einem Längsschnitt an drei verschiedenen Stellen vermessen. Die Schnittdicken der Handschnitte lagen je nach Pflanze und Organ ungefähr zwischen 180 und 300 μm .

3.2 Einbettung und Lagerung

Der Fokus dieses Kapitels liegt auf den verschiedenen Verfahren zur Einbettung und Lagerung der unterschiedlichen Pflanzenorgane. Zunächst wird der Prozess für Wurzel- und Sprossdrogen beschrieben, gefolgt von der Methodik für die Einbettung von Blatt- und Fruchtdrogen unter Verwendung verschiedener Einbettungsmedien wie denaturiertes Albumin, CMC und Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound. Abschließend wird die Lagerung der Proben behandelt.

3.2.1 Einbettung und Lagerung von Wurzel- und Sprossdrogen

Nach der Ernte wurden Wurzeln und Sprosse in 1 cm lange Stücke geschnitten und anfangs direkt, später jedoch in Falcon Tubes, mit Flüssigstickstoff bei -196 °C für eine Minute eingefroren. Die Falcon Tubes mit den kryogenen Proben wurden in einer mit Kühlpacks vorgekühlten Styroporbox transportiert. Die Lagerung erfolgte in einer Gefriertruhe bei -20 °C.

3.2.2 Einbettung und Lagerung von Blatt- und Fruchtdrogen

Für Blatt- und Frucht-Drogen war vor dem Einfrieren ein geeignetes Einbettungsmedium notwendig. Wie bereits in den vorherigen Kapiteln thematisiert (s. Kapitel 1.3, S. 5-7), erwies sich der Histologie-Standard OCT Compound als ungeeignet, weshalb eine Alternative gesucht wurde.

3.2.2.1 *Denaturiertes Albumin*

Um Eiweiß aus Hühnereiern als Einbettungsmedium zu nutzen, mussten zunächst verschiedenste Methoden zur Denaturierung des Albumins getestet werden.

Zuallererst wurde Wasser in einem Kochtopf zum Kochen gebracht. Es wurden 2 ml vom Eigelb getrenntes Eiweiß in eine Eprovette gefüllt und für 2 bis 3 Minuten gekocht. Dabei bildete sich jedoch Kondenswasser und das Eiweiß klebte an der Wand der Eprovette, was die Oberfläche uneben machte (s. Abbildung 1, S. 18).

Als nächstes wurde das Eiweiß in einem kleinen, mit Backpapier ausgelegten Becherglas bei Temperaturen von 70°C bis 130°C im Trockenschrank erhitzt. Nach 40 Minuten war das Eiweiß oben leicht verbrannt und unten noch flüssig (s. Abbildung 4, S. 18).

Weitere Versuche mit einem Frischhaltebeutel im kochenden Wasser, mit einer Heizpistole, in der Mikrowelle und das Kochen von Eiweiß in einem (mit Alufolie ausgelegten) Becherglas waren ebenfalls nicht zufriedenstellend (s. Abbildungen 2 und 3, S. 18). Das beste Ergebnis wurde beim Kochen von ganzen Eiern in einem Kochtopf erzielt (s. Abbildung 5, S. 19). Nach 20 Minuten Kochzeit wurden die hartgekochten Eier mit kaltem Wasser abgeschreckt, geschält und zurechtgeschnitten.



Abbildung 1: Kochversuch Epruvette



Abbildung 2: Kochversuch Becherglas in der Mikrowelle



Abbildung 3: Kochversuch Frischhaltebeutel



Abbildung 4: Kochversuch Backpapier



Abbildung 5: Kochversuch Kochtopf

Um eine Einbettung der Pflanzen zu ermöglichen, musste das Albumin mit einer Rasierklinge in 1x1 cm Würfel geschnitten werden. Hinsichtlich der variablen Lage des Eigelbs in den Eiern war das Zuschneiden herausfordernd und das Ergebnis unvorhersehbar.

Die 1x1 cm großen Eiweißwürfel wurden für die Einbettung horizontal zur Hälfte eingeschnitten. Ein kleiner Spatel oder eine Pinzette diente dazu den oberen Teil des Würfels anzuheben, sodass die Proben anschließend mit einer weiteren Pinzette im Inneren platziert werden konnten. Um Probleme beim späteren Schneideprozess zu vermeiden, durfte das Eiweiß nicht brechen oder Risse bilden. Zum Einfrieren wurden die Proben in Cellophan-Papier oder Alufolie eingewickelt und anschließend vollständig in den flüssigen Stickstoff, welcher vorher in eine Metallpatene übergeführt worden war, eingetaucht. Die Ausbildung von Eiskristallen war zu verhindern, weshalb während des Gefrierprozesses keine Flüssigkeit in den Würfel gelangen durfte. Um die Kühlkette nicht zu unterbrechen, erfolgte der Transport zum Tiefkühler in gekühlten Styroporbox innerhalb weniger Minuten.

3.2.2.2 Carboxymethylcellulose (CMC)

Im Rahmen dieser Arbeit wurde aufgrund der Komplexität der Eiweißmethode ein alternatives Einbettungsmedium, dessen Eignung für die anschließende MALDI-MS Analyse durch eine Literaturrecherche bestätigt wurde (s. Kapitel 1.3, S. 5-7), versucht: Carboxymethylcellulose. Carmellose-Natrium (Salzform der Carmellose) ist ein weißes, hygroskopisches Pulver mit ionogenem Charakter, das in Wasser quillt und ein Gel bildet, welches sich bei weiterer Wasserzugabe zu einer viskosen, anionenaktiven, kolloidalen Lösung entwickelt. Die Löslichkeit von CMC hängt vom Substitutionsgrad und der Molekülmasse ab, wobei sie bei steigendem Substitutionsgrad und abnehmender relativer Molekülmasse zunimmt (Ammon,

2010). Für die Einbettung mussten zuerst unterschiedliche Ansätze verfolgt werden, um daraus ein Gel herzustellen.

Ein halber Teelöffel CMC wurde auf etwa 140 ml kaltem Wasser aufgestreut. Die Gelbildung gestaltete sich anfangs schwierig, da sich das Pulver am Boden absetzte. Nach längerem Rühren bildete sich eine trübe Dispersion, in der einige ungelöste Partikel zurückblieben. Dieselbe Menge Carmellose wurde in etwa 140 ml heißem Wasser eingerührt. Diese Methode führte zu einer schnelleren und besseren Quellung, wobei auch diese Lösung etwas trüb blieb. Sowohl der Ansatz mit dem kalten Wasser als auch das Gefäß mit dem heißen Wasser wurden auf zwei Heizplatten unter Verwendung von Magnetrührern erwärmt und gerührt. Die Temperaturen der Heizplatte wurden langsam von 95°C auf 200°C erhöht, wobei zu beachten war, dass das Wasser nicht kochen darf. Beide Gele konnten erfolgreich hergestellt werden, erschienen aber trotzdem trüb mit kleinen Flocken. In diesem Prozess stellte sich heraus, dass die Gelbildung im warmen Wasser vorteilhaft war.

Für die Einbettung des Pflanzenmaterials wurden Plastikwürfel der Marke Waterdrop® (1x1 cm Würfel) verwendet. Hier ergab sich schnell ein Problem. Das oben angefertigte CMC-Gel war zu flüssig und das Probenmaterial konnte nicht gerade platziert werden bzw. fiel nach kurzer Zeit um. Eine Recherche im NRF/DAC sowie das Zurückgreifen auf frühere Studien ergab, dass eine CMC-Konzentration von 3-5% empfohlen wird. In dieser Arbeit wurden Gele mit Konzentrationen von 5% und 10% CMC hergestellt (s. Abbildung 6, S. 21), um deren Eignung für die Einbettung zu untersuchen.

Auf einer Heizplatte wurde eine exakte Menge Wasser auf etwa 60-70 Grad Celsius erhitzt und das Carmellose-Pulver gleichmäßig aufgestreut. Nach einer initialen Quellung von 10 bis 20 Minuten, wurde die Mischung mit einem Spatel oder Glasstab gerührt um eine homogene Gelstruktur ohne Klumpen zu erhalten. Schlussendlich wurde das Gel langsam unter gelegentlichem Rühren abgekühlt, um die Bildung von Luftblasen zu minimieren. Beide Gele (5% und 10% CMC) wurden für die Experimente verwendet, wobei sich kein wesentlicher Unterschied Ergebnisqualität ergab.

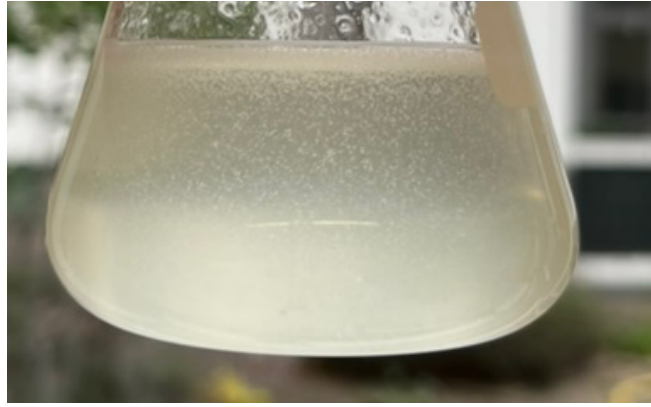


Abbildung 6: Carboxymethylcellulose-Gel (10%)

Das CMC-Gel wurde für die Einbettung bis zum Rand in die Waterdrop®-Plastikwürfel gefüllt. Bei höheren Konzentrationen war dies herausfordernd, da die Masse zäh war und zur Bildung von Luftblasen neigte, welche mit einer Pinzette entfernt werden mussten. Danach wurden die Pflanzenproben zurechtgeschnitten – Blätter in rechteckige oder quadratische Stücke und Früchte wurden an die Höhe der Plastikwürfel angepasst. Anschließend wurde das Probenmaterial mit einer Pinzette gerade und vollständig von CMC-Gel bedeckt im Würfel platziert (s. Abbildung 7, S. 21). Schlussendlich wurden die Plastikwürfel mit einer Pinzette in Flüssigstickstoff getaucht, welcher zuvor in eine Metallpatene umgefüllt wurde. Dabei durfte das CMC-Gel nicht mit der Flüssigkeit in Berührung kommen. Der Transport zum Tiefkühler erfolgte zügig in einer vorgekühlten Styroporbox.



Abbildung 7: Plastikwürfel mit Einbettung

3.2.2.3 Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound

Trotz bekannter Interaktionen mit der MALDI-MS-Analyse wurde die Frucht von *Foeniculum vulgare* MILL. zur Vervollständigung in den Goldstandard der Histologie eingebettet und im späteren Verlauf auch geschnitten (s. Kapitel 3.12, S. 61-66). Dies ermöglichte einen direkten Vergleich mit dem Eiweiß und dem CMC-Gel.

Die Proben wurden zurechtgeschnitten und in einen mit Tissue-Tek®-O.C.T.™-Compound gefüllten Würfel eingebettet. Durch die Lagerung bei -20 °C im Kryostat-Mikrotom fror der Würfel innerhalb von zehn Minuten und war damit ohne das Einfrieren in flüssigem Stickstoff schnittbereit.

3.2.2.4 Lagerung

Alle Proben wurden unabhängig vom Medium oder Pflanzenorgan in einem Tiefkühler bei -20°C für mindestens 24 Stunden gelagert, um eine gleichmäßige Temperaturverteilung innerhalb der Proben zu garantieren.

3.3 Herstellung der Kryoschnitte

Im Folgenden wird die Vorgehensweise je nach Pflanzenorgan detailliert beschrieben. Während die Kammer des Kryostat-Mikrotoms konstant auf -20 °C gehalten wurde, wurde die Gefrierschnitterstellung stetig angepasst. Da sich das Einbetten in Albumin als nicht zufriedenstellend erwies, werden im restlichen Teil der Arbeit nur die Ansätze ohne Einbettung sowie die Verwendung von CMC-Gel weiterverfolgt (s. Abbildungen 8 und 9, S. 22).



Abbildung 8: Stempel mit Wurzel ohne Einbettung



Abbildung 9: Stempel mit Blatt in CMC-Gel-Einbettung

3.3.1 Blatt-Drogen

Durch leichtes Anwärmen mit den Fingern konnten die gefrorenen Probenwürfel seitlich aus dem Plastik gelöst und anschließend mit ein paar Tropfen Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound auf dem Stempel des Kryostat-Mikrotoms befestigt werden. Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound ist bei Raumtemperatur klar und flüssig und härtet bei ca. -20°C innerhalb von 2-3 Minuten zu einer festen, weißen Substanz aus. Das Ziel war es in einem Bereich von 10 bis 100 µm zu schneiden. Die Schnitte wurden in 5-Mikrometer-Schritten ausgeführt, wobei zunächst im höheren Mikrometerbereich begonnen wurde und nach 10-20 Schnitten schrittweise auf kleinere

Dicken reduziert wurde, bis keine Schnitte mehr möglich waren (s. Abbildungen 10-13, S. 24). Verschiedenste Methoden wurden ausprobiert, um die Querschnitte auf den Objektträgern zu befestigen (s. Kapitel 3.4, S. 26), wobei sich die Verwendung eines Pinsels als die beste Methode erwiesen hat.

3.3.2 Wurzel-Drogen

Die gefrorenen Wurzeln wurden direkt ohne Einbettungsmedium mit Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound auf dem Stempel des Kryostat-Mikrotoms befestigt. Beim Schneiden durfte kein Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound auf die Schnittoberfläche gelangen. Die weiteren Arbeitsschritte können der für die Blätter beschriebenen Methode entnommen werden (s. Workflow Abbildungen 14-17, S. 25).

3.3.3 Spross-Drogen

Die Vorgehensweise für den Spross war identisch zur Methode für die Wurzeln (s. Workflow Abbildungen 14-17, S. 25).

3.3.4 Frucht-Drogen

Fruchtdrogen wurden sowohl in CMC-Gel eingebettet als auch ohne Einbettungsmedium direkt geschnitten. Die Vorgehensweise war abhängig von den Anforderungen des jeweiligen Probenmaterials (s. Workflows Abbildungen 10-17, S. 24-25).

Workflow am Beispiel eines Blattes

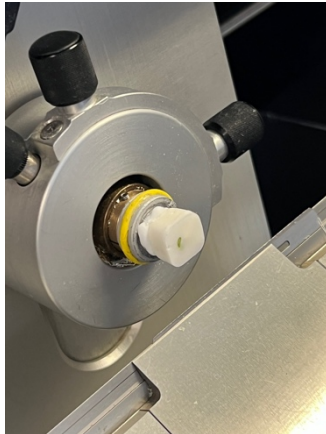


Abbildung 10: Einspannung des Stempels am Kryotom

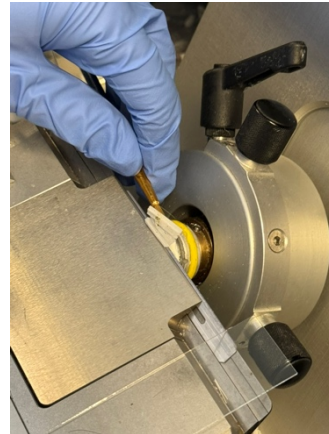


Abbildung 11: Pinseinsatz zum Abfangen der Schnitte

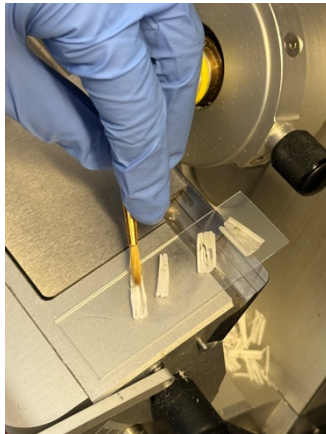


Abbildung 12: Platzierung der Schnitte

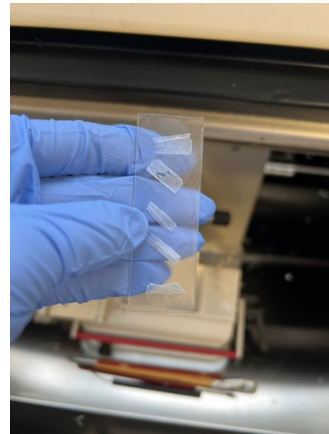


Abbildung 13: Fixierung der Schnitte

Workflow am Beispiel einer Wurzel



Abbildung 14: Einspannung des Stempels



Abbildung 15: Herstellung der Kryoschnitte

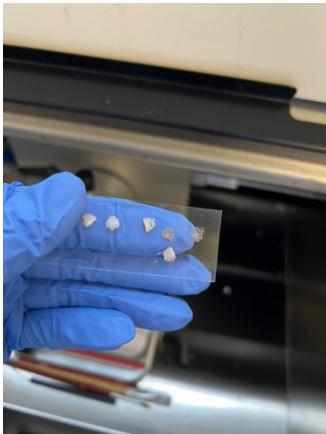


Abbildung 16: Fixierung der Schnitte



Abbildung 17: Befeuchtung der Schnitte

3.4 Mounting-Techniken

Thaw-Mounting ist eine Technik, bei der die gefrorenen Gewebeschnitte auf einen Objektträger mit Raumtemperatur fixiert wurden. Nachdem die Schnitte sich auf dem silbernen Plateau des Kryostat-Mikrotom sammelten, wurde der Objektträger 30 Sekunden lang auf den angefertigten Kryoschnitt gedrückt. Dadurch taut er leicht auf und haftet am Glas. Für diese Technik wurde der Objektträger an einer Kante angesetzt und sanft auf den Schnitt fallen gelassen. Obwohl diese Methode funktionierte, war die Reproduzierbarkeit nicht gegeben, da die Schnitte sich häufig eindrehen oder einrissen. Es handelt sich hierbei um eine etablierte Methode der Tier- und Humanhistologie, welche wahrscheinlich durch die erhöhte Klebereitschaft von Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound so erfolgreich ist.

Eine weitere Methode war die Verwendung von doppelseitigem Klebeband, welches direkt auf den gefrorenen Würfel oder der Wurzel bzw. dem Spross befestigt wurde. Es wurde versucht, die Klinge am Klebeband entlangzuführen, um den Schnitt unversehrt direkt auf dem Objektträger zu fixieren. Diese in der Literatur empfohlene Methode scheiterte, da das Klebeband nicht haftete und den Schneideprozess erschwerte.

Zusätzlich kamen auch Pinsel zum Einsatz. Die Schnitte, welche auf dem silbernen Plateau landeten, wurden vorsichtig mit ein oder zwei Pinseln aufgenommen und direkt auf dem warmen Objektträger platziert. Oft konnte der Pinsel auch in den Schneideprozess miteingebunden werden, wobei die feinen Schnitte direkt auf dem Pinsel aufgerollt und auf dem Glas abgelegt wurden. Für eine höhere Effizienz wurde eine weitere Anpassung der Methode durchgeführt. Der Objektträger wurde vorab im Mikrotom bei -20 Grad Celsius gekühlt und die Schnitte laufend darauf platziert. Sobald der Objektträger voll war, wurde er aus der Kammer entfernt und mit den Fingern an der Rückseite leicht erwärmt, wodurch die Schnitte auf dem Glas hafteten (s. Workflows Abbildungen 10-17, S. 24-25).

Da diese Arbeit ausschließlich die Präparation der Kryoschnitte abgedeckt, wurden die Schnitte für eine anschließende mikroskopische Untersuchung vorbereitet. Aus diesem Grund wurde Wasser auf die Kryoschnitte getropft und diese mit einem Deckglas abgedeckt, um das Austrocknen der Präparate zu verhindern. Liegen die Gefrierschnitte nämlich für eine längere Zeit ungeschützt auf dem Objektträger, beeinflusst dies Farbe und Struktur negativ.

3.5 *Monstera deliciosa* Liebm.; Köstliches Fensterblatt; Luftwurzel

Organ: Radix aerea, Luftwurzel

Familie: Araceae; Aronstabgewächse

Die Luftwurzeln der *Monstera deliciosa* wurden im Bereich über dem Blattknoten abgeschnitten und 20-25 cm lange Stücke mit einem Durchmesser ($\varnothing$) von ca. 0,4 cm untersucht. Positivkontrollen in Form von Wasser- und Chloralhydrat-Präparaten wurden angefertigt. Für die Kryoschnitte wurde die Luftwurzel sowohl in CMC-Gel eingebettet als auch ohne Einbettung geschnitten. Die dargestellten Abbildungen (s. Abbildungen 30-33, S. 31) zeigen ausschließlich Präparate, die ohne Einbettung geschnitten wurden.

3.5.1 Anatomie

Der Querschnitt der Luftwurzeln zeigt die charakteristischen Merkmale einer monokotylen Wurzel mit polyarcher Aktinostele. Im Zentralzylinder befindet sich das Metaxylem, wobei auch regelmäßig interxyläres Phloem sichtbar ist. Daran anschließend liegen abwechselnd Xylem und Phloem. Danach folgt das Perizykel. Der Zentralzylinder ist umgeben von einer primären Endodermis mit Caspary Streifen (s. Abbildungen 19 und 25, S. 29-30). Die Rinde enthält faserartige Strukturen bzw. innere Haare, die locker in den Interzellularräumen verteilt sind. Das Gewebe ist außen von einem mehrschichtigen Periderm umgeben (s. Abbildungen 20 und 27, S. 29-30). Die Luftwurzel enthält auch Drusen, Raphiden und einen einzellängigen sklerenchymatischen Ring (s. Abbildung 26, S. 30).

3.5.2 Positivkontrolle

3.5.2.1 Wasserpräparat

In den Wasserpräparaten erscheint die Luftwurzel aufgrund der noch vorhandenen Chloroplasten grünlich-bräunlich und dunkel (s. Abbildungen 18 und 20, S. 29). Im Längsschnitt sind die Tüpfelgefäße als Tracheen gut erkennbar (s. Abbildung 23, S. 29).

3.5.2.2 Chloralhydrat-Präparat

Die helleren Chloralhydrat-Präparate vereinfachen das Erkennen der Strukturen (s. Abbildung 25 und 26, S. 30). Das äußere mehrreihige Periderm färbt sich in einem gelblichen bis rötlichen Ton (s. Abbildung 27, S. 30). Auch die Kristalle sind hier klarer zu erkennen.

3.5.2.3 Safranin-Astrablau Färbung

In der Safranin-Astrablau-Färbung erscheint das Phloem blau, während das Xylem und andere sklerenchymatische Gewebe pink gefärbt sind (s. Abbildung 29, S. 30). Besonders auffällig ist das blau-gefärbte interxyläre Phloem sowie der pinke sklerenchymatische Ring.

3.5.3 Kryoschnitt

Um zu untersuchen, ob die Einbettung einen Einfluss auf die Qualität der Schnitte hat, wurden die Luftwurzeln sowohl in 5% und 10% Carmellose-Gel eingebettet als auch ohne Einbettung eingefroren. Die *Monstera deliciosa* ermöglichte Schnittdicken im Bereich von 40 bis 90 μm . Es wurde schnell festgestellt, dass dickere Schnitte leichter handzuhaben waren, während dünnere Schnitte bröselig wurden und die Übertragung auf den Objektträger erschwerten. Auch die Einbettung in CMC-Gel brachte keinen Vorteil und konnte den Zerfall der Schnitte unter 40 μm nicht verhindern. Ein zusätzliches Problem, welches aber häufiger bei dickeren Schnitten auftrat, war das Einrollen der angefertigten Querschnitte. Die Unterstützung eines Pinsels, welcher parallel zur Klinge gehalten wurde, konnte das Auftreten zwar minimieren, aber nicht verhindern. Im direkten Vergleich wurde festgestellt, dass eine Einbettung in 5% CMC-Gel insgesamt bessere Ergebnisse zeigte als 10% CMC-Gel. Dieser Unterschied war jedoch nur minimal und kann nicht ausschließlich auf die Konzentration des Mediums zurückgeführt werden. Schnelle Schnittbewegungen mit der Klinge verbesserten die Qualität der Schnitte gegenüber langsameren Schneideprozessen. Insgesamt erwies sich die Einbettung in CMC-Gel als ungeeignet, weshalb die Luftwurzel in weiterer Folge ohne Einbettungsmedium geschnitten wurde (s. Abbildungen 30-33, S. 31). Dies brachte eine deutliche Verbesserung der Ergebnisse, wobei auch bei dieser Methode vorsichtig gearbeitet werden musste. Insbesondere das Aufbringen auf den Objektträger und das Positionieren des Deckglases erhöhte das Risiko den Querschnitt zu beschädigen. Unter dem Mikroskop war häufig nur mehr der Zentralzylinder vollständig abgebildet, während die Rinde während der Arbeitsschritte zerstört wurde.

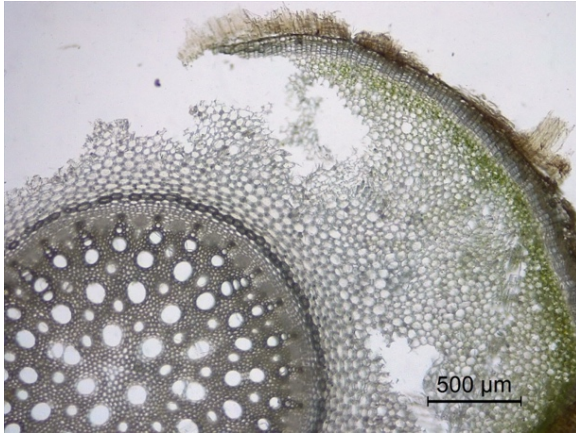


Abbildung 18: Wasserpräparat
QS Luftwurzel Übersicht

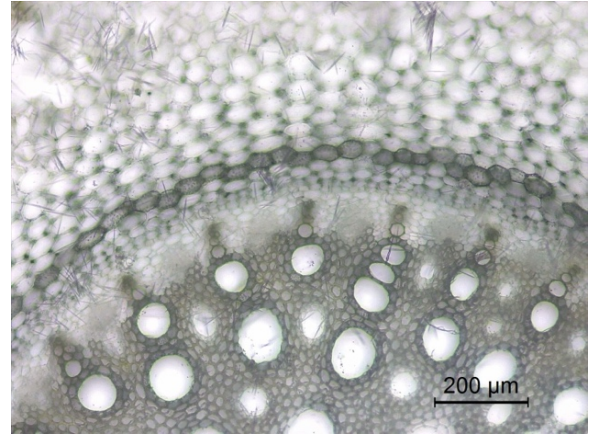


Abbildung 19: Wasserpräparat
QS Luftwurzel Zentralzylinder – Endodermis – Rinde

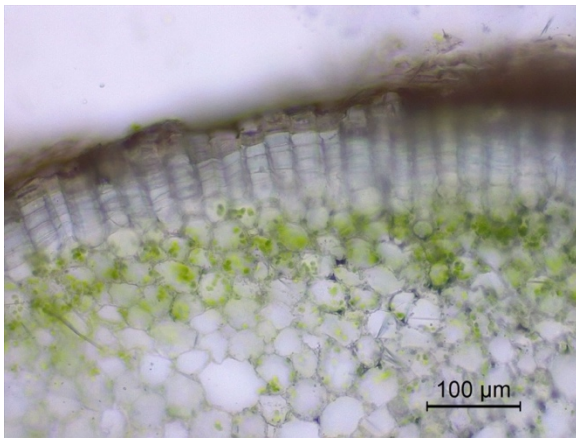


Abbildung 20: Wasserpräparat
QS Luftwurzel Mehrschichtiges ansatzweises Periderm

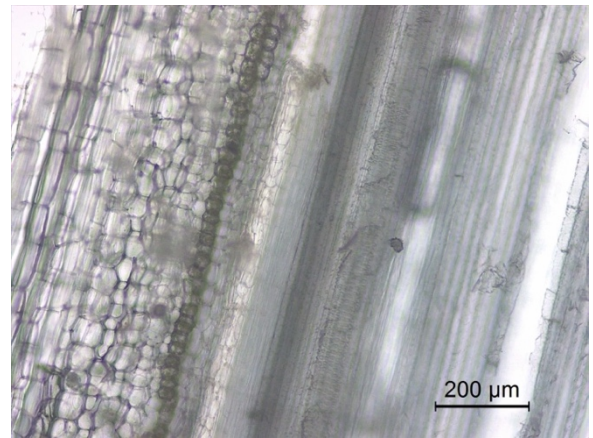


Abbildung 21: Wasserpräparat
LS Luftwurzel

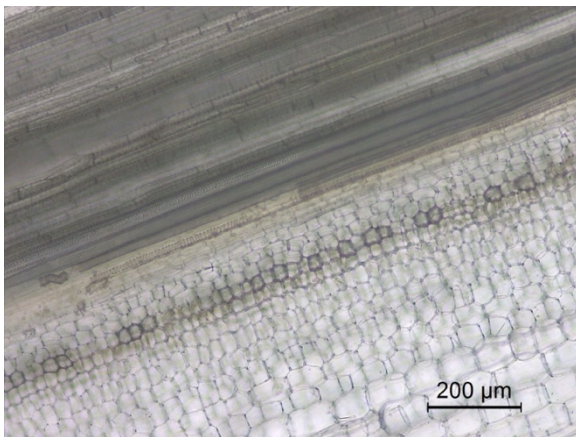


Abbildung 22: Wasserpräparat
LS Luftwurzel

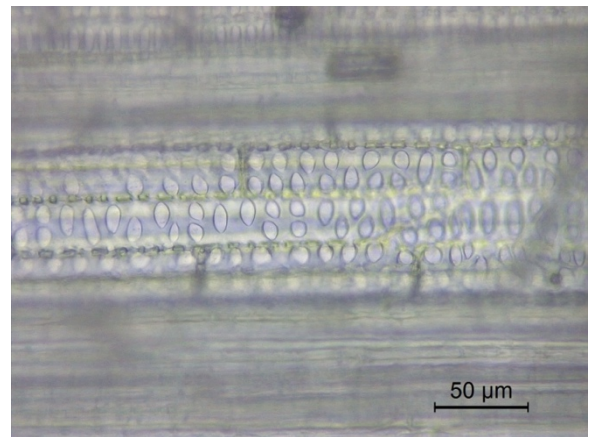


Abbildung 23: Wasserpräparat
LS Luftwurzel Tüpfelgefäß

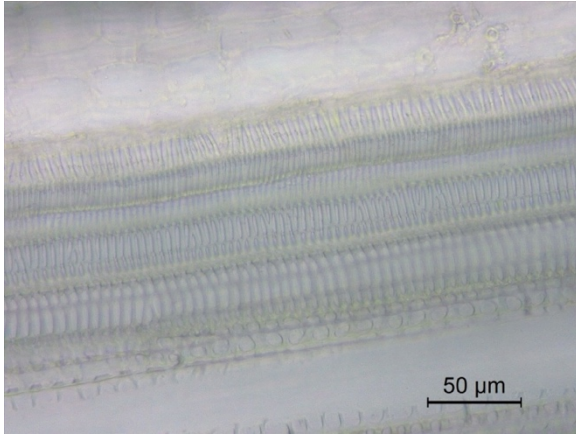


Abbildung 24: Wasserpräparat
LS Luftwurzel Spiralgefäße

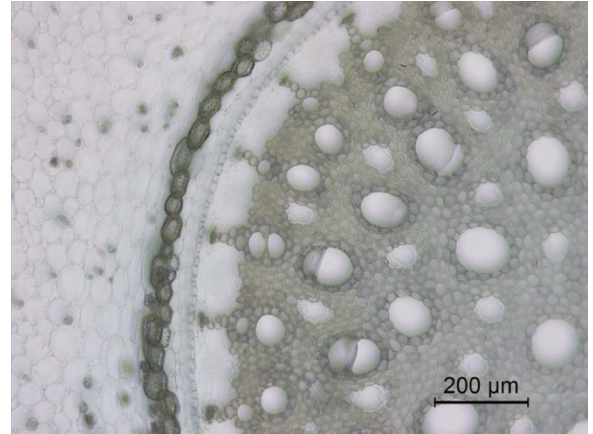


Abbildung 25: Chloralhydratpräparat
QS Luftwurzel Zentralzylinder – Endodermis – Rinde

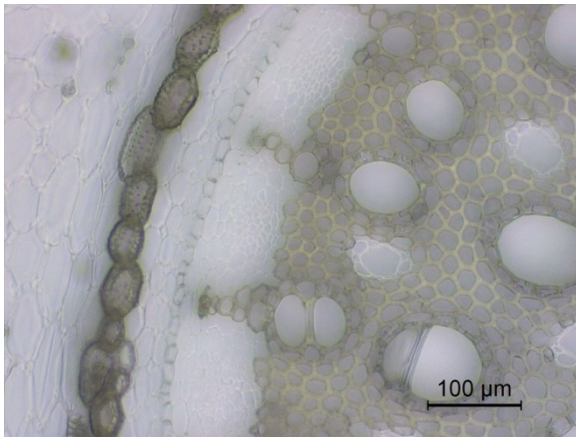


Abbildung 26: Chloralhydratpräparat
QS Luftwurzel Sklerenchymatischer Ring

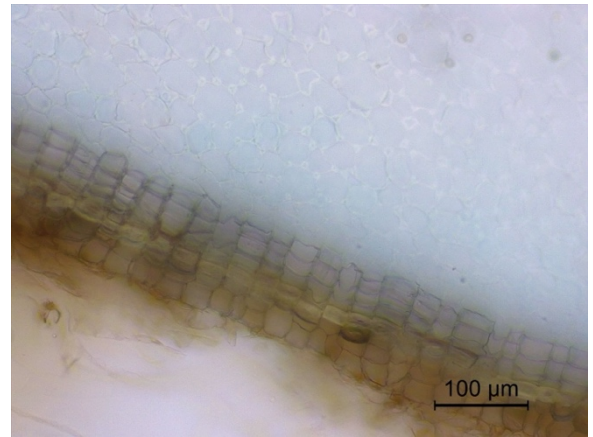


Abbildung 27: Chloralhydratpräparat
LS Luftwurzel Mehrzellreihiges ansatzweises Periderm

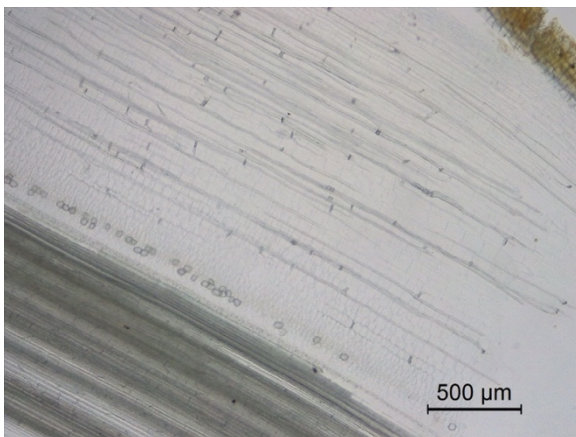


Abbildung 28: Chloralhydratpräparat
LS Luftwurzel Übersicht

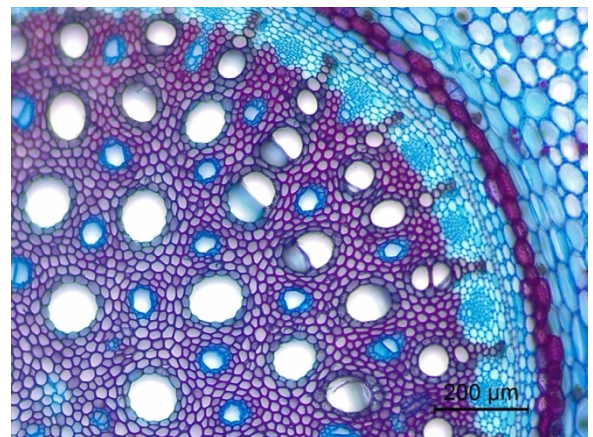


Abbildung 29: Safranin-Astrablau-Färbung
QS Luftwurzel Übersicht Zentralzylinder

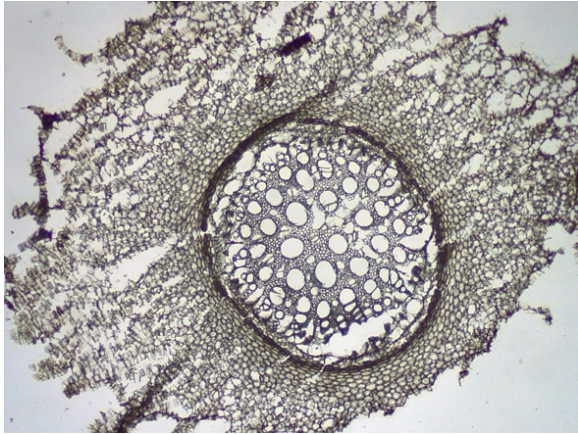


Abbildung 30: Kryoschnitt-Präparat ohne Einbettung
QS Luftwurzel Übersicht / Schnittdicke: 60 μm

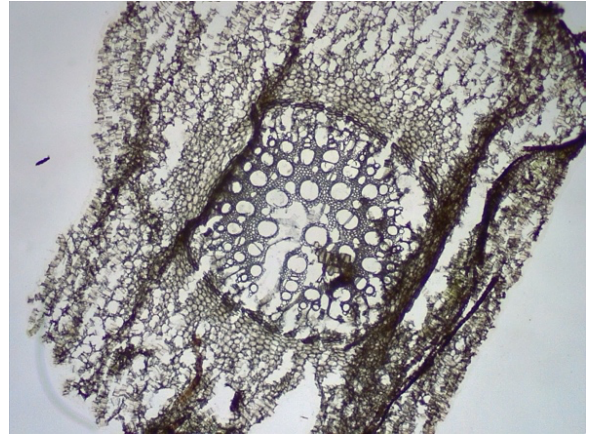


Abbildung 31: Kryoschnitt-Präparat ohne Einbettung
QS Luftwurzel Übersicht / Schnittdicke: 50 μm

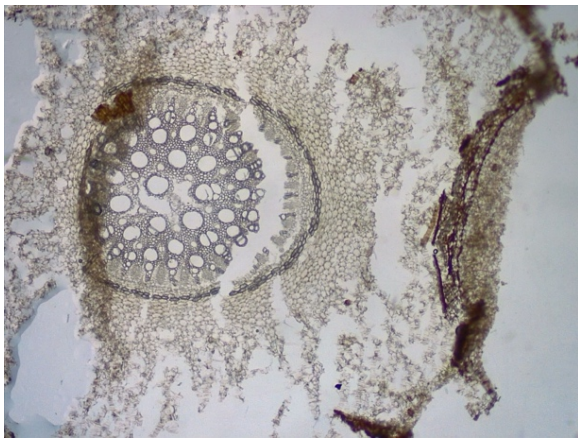


Abbildung 32: Kryoschnitt-Präparat ohne Einbettung
QS Luftwurzel Übersicht / Schnittdicke: 40 μm

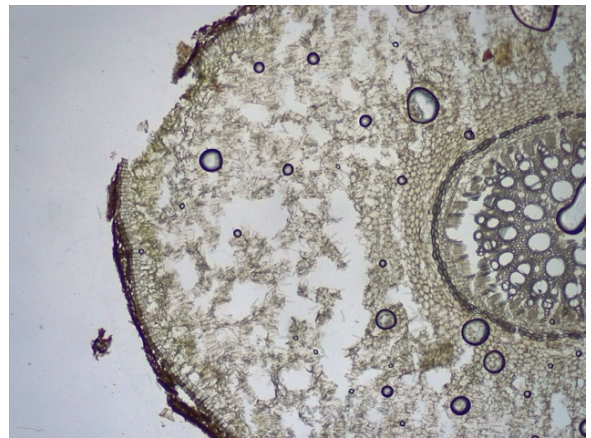


Abbildung 33: Kryoschnitt-Präparat ohne Einbettung
QS Luftwurzel Übersicht / Schnittdicke: 90 μm

3.6 *Eucalyptus globulus* Labill.; Blauer Eukalyptus; Blatt

Organ: Folium; Blatt

Familie: Myrtaceae; Myrtengewächse

Die Blätter von *Eucalyptus globulus* waren 6-13 cm lang und 1-2 cm breit. Gemessen wurde immer an der breitesten Stelle. Positivkontrollen in Form von Wasser- und Chloralhydrat-Präparaten wurden angefertigt. Für die Kryosektion wurden die Blätter in CMC-Gel eingebettet. (s. Abbildungen 38-42, S. 34-35).

3.6.1 Anatomie

Der Querschnitt des Eukalyptusblattes hat einen äquifazialen Blattaufbau (s. Abbildungen 34 und 36, S. 34). Als oberes und unteres Abschlussgewebe dient eine einreihige Epidermis mit dicker Cuticula. Das Mesophyll zeigt zwei ausgeprägte Schichten Palisadenparenchym auf beiden Seiten des Blattes, welche jeweils aus drei Zellreihen bestehen. Dazwischen liegt eine schmale Schicht Schwammparenchym, die laut Literatur palisadenähnlich sein sollte (Rahfeld, 2011), jedoch im Querschnitt nicht eindeutig erkennbar ist. Das Blatt enthält außerdem sehr große schizolysigene kugelige Ölbehälter mit Resten von Eukalyptusöl (s. Abbildung 36, S. 34). Das Leitgewebe umfasst ein nierenförmiges, bikollaterales Gefäßbündel mit Xylem und Phloem. Des Weiteren enthält das Blatt Einzelkristalle und Drusen, welche laut Literatur (Rahfeld, 2011) nur im Mesophyll auftreten. Man findet sie aber auch im Gefäßbündel sowie entlang der Blattnerven.

3.6.2 Positivkontrolle

3.6.2.1 Wasserpräparat

In den Wasserpräparaten erscheint das Eukalyptusblatt grün bis dunkelgrün (s. Abbildung 34, S. 34), wobei die Epidermiszellen und die Ölbehälter gut erkennbar sind. Die Betrachtung des Mesophylls wird durch das Chlorophyll erschwert.

3.6.2.2 Chloralhydratpräparat

Nach der Behandlung mit Chloralhydrat ist das Blatt gelblich und der Blattaufbau wird deutlich (s. Abbildung 36, S. 34). Die Blattaufsicht zeigt polygonale Epidermiszellen mit großen, ovalen, paracytischen Spaltöffnungen (s. Abbildung 35, S. 34) und einer dicken Cuticula.

3.6.3 Kryoschnitt

Das Eukalyptusblatt wurde vor dem Schneiden in 5% und 10% CMC-Würfel eingebettet, wobei die unterschiedlichen Konzentrationen keinen signifikanten Einfluss auf Qualität der Ergebnisse hatten. Die natürliche feste Beschaffenheit des Eukalyptus ermöglichte stabile Schnitte bei einer Dicke zwischen 26 und 50 μm , wobei es zu keiner erheblichen Zerstörung der Blattstruktur kam (s. Abbildungen 38-42, S. 34-35). Obwohl sich die Querschnitte während des Schneidevorgangs häufig selbst aus der Einbettung lösten, kann davon ausgegangen werden, dass das CMC-Gel erheblich zur Stabilisierung des Blattes beitrug. Bei dünneren Schnitten führte die Zerstörung der schizogenen Ölzellen (Rahfeld, 2011) oft dazu, dass kein Eukalyptusöl mehr enthalten war. Dem entgegengesetzt war das Blatt bei zu dicken Querschnitten aufgrund des Chlorophylls sehr dunkel, was die Strukturaufklärung negativ beeinflusste. Aus den Ergebnissen kann geschlossen werden, dass der Schneideprozess mit den empfohlenen Schnittdicken (ca. 26 bis 50 μm) insgesamt unkompliziert ist.



Abbildung 34: Wasserpräparat
QS Blatt Übersicht

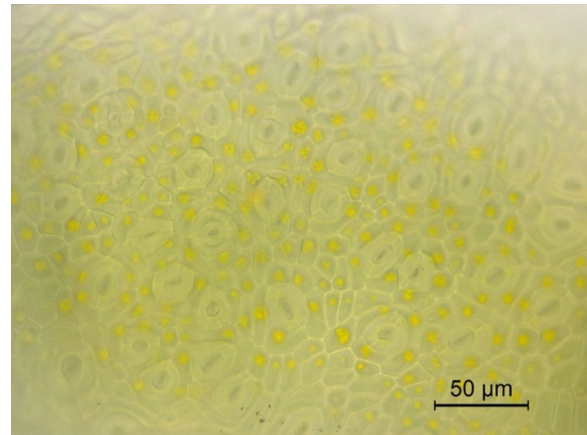


Abbildung 35: Chloralhydratpräparat
Aufsicht Blatt Paracytische Stomata

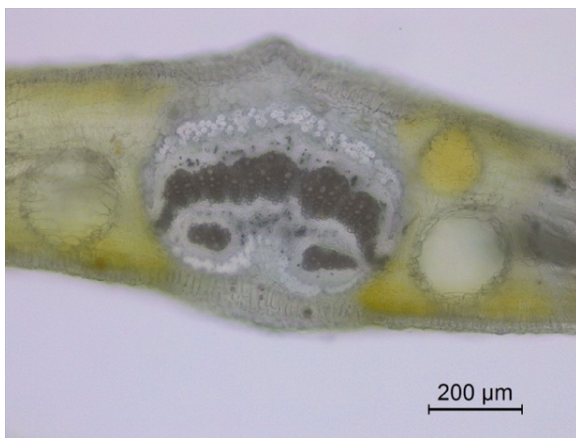


Abbildung 36: Chloralhydratpräparat
QS Blatt Übersicht

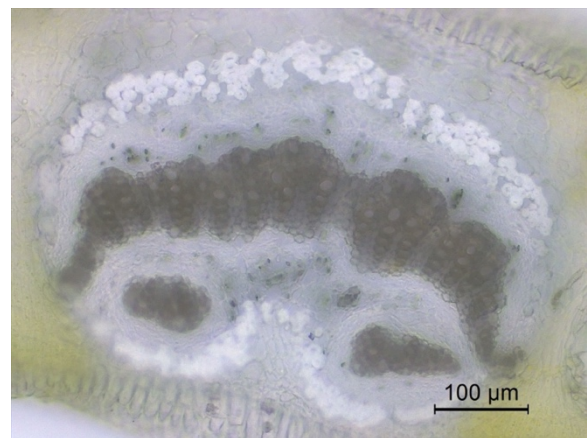


Abbildung 37: Chloralhydratpräparat
QS Blatt Zentrales Gefäßbündel



Abbildung 38: Kryoschnitt-CMC-Präparat
QS Blatt Übersicht / Schnittdicke: 40 µm



Abbildung 39: Kryoschnitt-CMC-Präparat
QS Blatt Übersicht / Schnittdicke: 40 µm

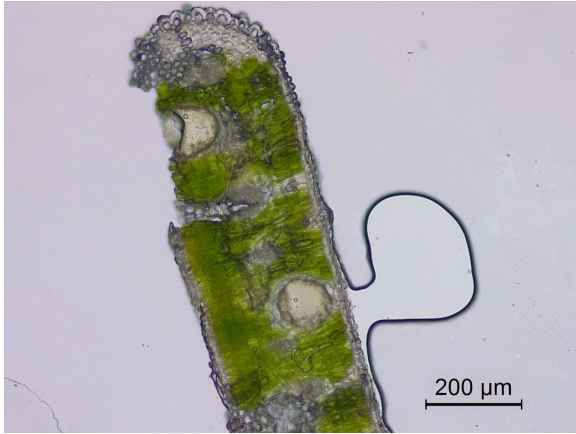


Abbildung 40: Kryoschnitt-CMC-Präparat
QS Blatt Übersicht / Schnittdicke: 36 µm

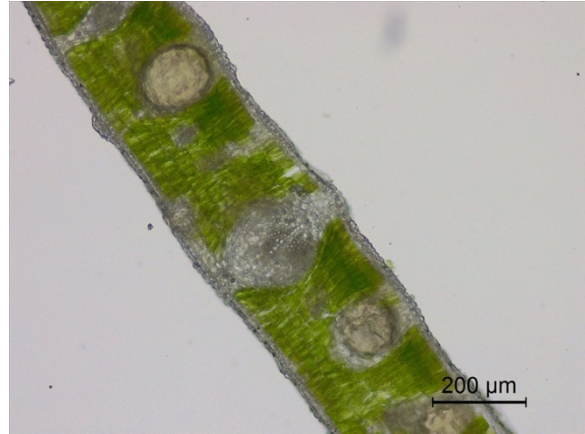


Abbildung 41: Kryoschnitt-CMC-Präparat
QS Blatt Übersicht / Schnittdicke: 42 µm

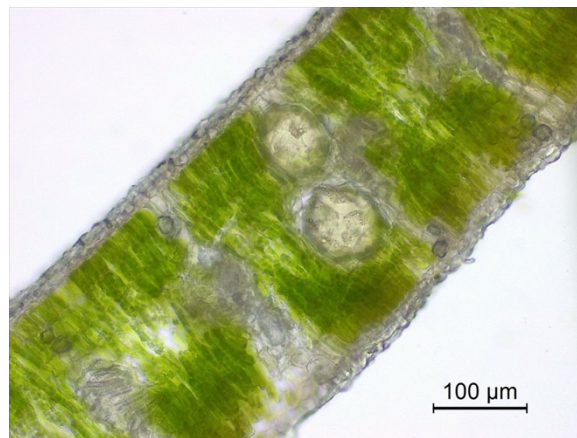


Abbildung 42: Kryoschnitt-CMC-Präparat
QS Blatt Ölzellen / Schnittdicke: 42 µm

3.7 *Myrtus communis* (L.) Scop.; Duftende Myrte; Blatt

Organ: Folium; Blatt

Familie: Myrtaceae; Myrtengewächse

Die Blätter von *Myrtus communis* waren 0,5-1 cm lang und 0,2-0,5 cm breit. Für die Positivkontrollen wurden Wasser- und Chloralhydrat-Präparate angefertigt und die Gefrierschnitterstellung (s. Abbildungen 48-52, S. 39) erfolgte nach der Einbettung in CMC-Gel.

3.7.1 Anatomie

Das Blatt hat einen typischen bifazialen Aufbau (s. Abbildungen 43 und 44, S. 38). Das beidseitige Abschlussgewebe ist die einzellreihige Epidermis aus rechteckigen und quadratischen Zellen. Darüber liegt die Cuticula, welche an der Blattoberseite etwas dicker als an der Unterseite erscheint. Unter der Epidermis liegt das längliche zweizellreihige Palisadenparenchym. Darunter befindet sich das unregelmäßig geformte mehrreihige Schwammparenchym. Im Parenchym kommen verteilt Drusen vor. Die schizogenen Ölbehälter sind oft durch ihren gelblichen Inhalt erkennbar. Im Bereich des Hauptnervs befindet sich das Leitgewebe – ein eiförmiges bikollaterales Gefäßbündel umgeben von einer schmalen Faserkappe (s. Abbildung 44, S. 38). Die Oberfläche des Blattes besitzt vereinzelt einzellige, zugespitzte Trichome (s. Abbildung 43, S. 38)

3.7.2 Positivkontrolle

3.7.2.1 Wasserpräparat

Im Wasserpräparat erscheint das Blatt dunkelgrün (s. Abbildung 43, S. 38), wobei die schizogenen Ölbehälter vereinzelt durch ihren gelblichen Inhalt erkennbar sind. Mit dem Polarisator sind die Drusen gut zu sehen.

3.7.2.2 Chloralhydrat-Präparat

Im Chloralhydrat-Präparat werden die kugelförmigen schizogenen Ölbehälter, typischerweise von fünf äußeren Zellen umgeben, deutlich (s. Abbildungen 45 und 46, S. 38). Auch die Drusen sind im Vergleich zum Wasserpräparat ohne Polarisator gut zu erkennen. Ein Nachteil dieser Präparation sind die oft umgekippten Gefäßbündel (s. Abbildungen 45 und 46, S. 38).

3.7.2.3 Sudan IV-Färbung

Bei der Sudan IV-Färbung zeigt sich eine stärkere rosa Färbung der Oberseite des Blattes im Vergleich zur Unterseite (s. Abbildung 47, S. 38), was auf eine dickere Cuticula in diesem Bereich hinweist. Die Ölbehälter bleiben farblos.

3.7.3 Kryoschnitt

Das Myrtenblattes wurde vor dem Gefriervorgang in 5% und 10% CMC-Würfel eingebettet. Es zeigte sich auch in diesem Fall, dass die Konzentration das Ergebnis nicht erheblich beeinflusste. Der Schneidevorgang deckte einen Bereich zwischen 15 und 100 µm ab und die besten Ergebnisse wurden zwischen 50 und 100 µm erzielt (s. Abbildungen 48-52, S. 39). Ähnlich wie bei *Eucalyptus globulus* lösten sich die festen Blätter während des Schneidens aus dem Gel, wodurch das Thaw-Mounting mit dem Pinsel erleichtert wurde. Bei Schnittdicken unter 50 µm wurden die Zellen zunehmend beschädigt und die Qualität der Ergebnisse nahm ab. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Probenvorbereitung des Myrtenblattes erfolgreich war, da entscheidende Blattstrukturen (z.B. schizogene Ölbehälter) im Bereich von 50 bis 100 µm erhalten blieben.



Abbildung 43: Wasserpräparat
QS Blatt Übersicht



Abbildung 44: Wasserpräparat
QS Blatt Zentrales Gefäßbündel

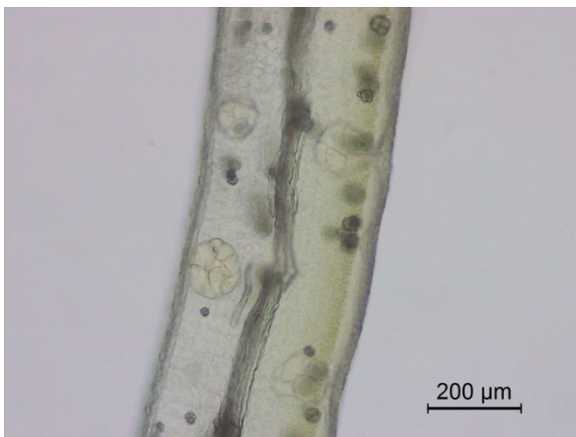


Abbildung 45: Chloralhydratpräparat
QS Blatt Übersicht

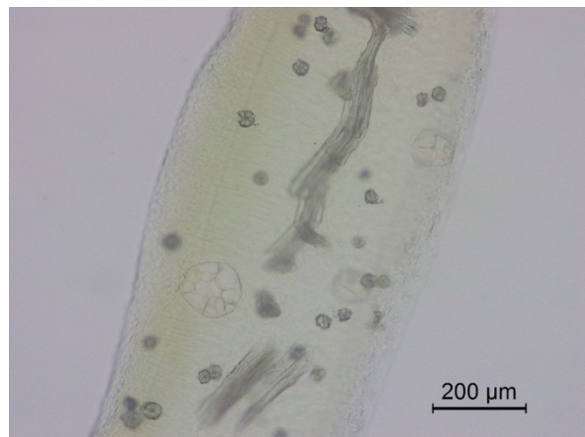


Abbildung 46: Chloralhydratpräparat
QS Blatt Übersicht

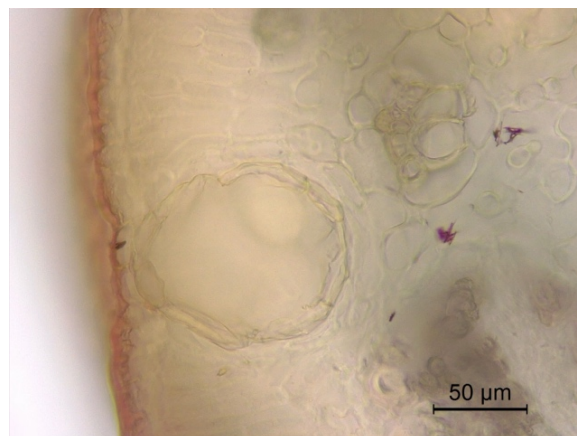


Abbildung 47: Sudan IV-Färbung
QS Blatt Ölzelle und rosa-gefärbte Cuticula

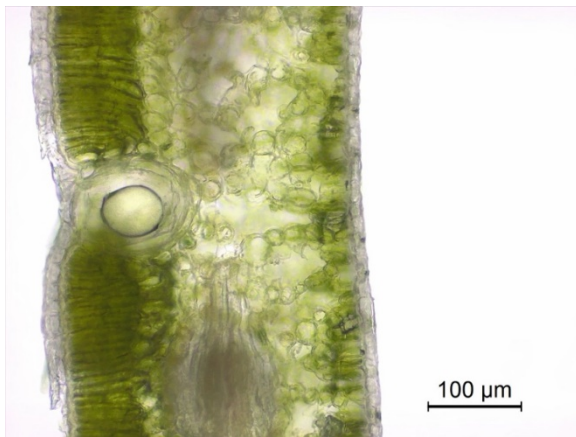


Abbildung 48: Kryoschnitt-CMC-Präparat
QS Blatt Ölzelle / Schnittdicke: 80 µm



Abbildung 49: Kryoschnitt-CMC-Präparat
QS Blatt Übersicht / Schnittdicke: 50 µm



Abbildung 50: Kryoschnitt-CMC-Präparat
QS Blatt Übersicht / Schnittdicke: 50 µm



Abbildung 51: Kryoschnitt-CMC-Präparat
QS Blatt Übersicht / Schnittdicke: 80 µm



Abbildung 52: Kryoschnitt-CMC-Präparat
QS Blatt Übersicht / Schnittdicke: 90 µm

3.8 *Citrus x limon* (L.) Osbeck, Zitrone; Blatt

Organ: Folium; Blatt

Familie: Rutaceae; Rautengewächse

Die aus der Baumkrone geernteten Blätter der Pflanze *Citrus x limon* waren ca. 13 cm lang und 6,5 cm breit. Wie bisher wurden zur Kontrolle Positivkontrollen in Form von Wasser- und Chloralhydrat-Präparaten angefertigt. Zum Schneiden am Kryostat-Mikrotom wurde eine Einbettung in CMC-Gel gewählt (s. Abbildungen 60-63, S. 43).

3.8.1 Anatomie

Das Zitronenblatt zeigt den klassischen Aufbau eines bifazialen Laubblattes, wobei sich an der Oberseite ein zweizellreihiges, langgestrecktes Palisadenparenchym und unter diesem ein lockeres Schwammparenchym befindet (s. Abbildung 57, S. 42). Die Epidermis, welche das Blatt umgibt, besteht aus einer einzelnen Schicht gleichmäßiger Zellen und ist von einer gut ausgeprägten Cuticula bedeckt. Unter der Epidermis sind auf beiden Seiten vereinzelt Einzelkristalle zu finden. Schon makroskopisch sind auf der Blattoberfläche zahlreiche gelbliche Punkte zu erkennen, wobei es sich um die großen schizogenen Ölbehälter handelt, welche unter dem Mikroskop deutlich werden (s. Abbildungen 55 und 57, S. 42). Erfolgt der Schnitt durch den Hauptnerv des Blattes, wird das zentrale bikollaterale Gefäßbündel sichtbar (s. Abbildungen 53 und 54, S. 42), welches von einem dünnen Faserring umgeben ist (s. Abbildung 53, S. 42).

3.8.2 Positivkontrolle

3.8.2.1 Wasserpräparat

Die Vielzahl an Chloroplasten lässt den Querschnitt im Wasserpräparat dunkel erscheinen, wodurch – abgesehen vom zentralen Gefäßbündel – keine Strukturaufklärung möglich ist (s. Abbildungen 53-55, S. 42).

3.8.2.2 Chloralhydrat-Präparat

Nach dem Aufkochen mit Chloralhydrat wirkt der helle Querschnitt teilweise fast durchsichtig, was die Erkennung der Strukturen erleichtert. Die schizogenen Ölbehälter sind im gesamten Parenchymbereich sichtbar und erscheinen je nach Vorhandensein von ätherischem Öl gelblich oder manchmal auch leer (s. Abbildung 57, S. 42). Einige Gefäßbündel sind bereits umgekippt, ähnlich wie es bei *Myrtus communis* beobachtet wurde (s. Abbildung 56, S. 42).

3.8.2.3 Sudan IV-Färbung

Bei der Sudan-IV-Färbung färbt sich das Abschlussgewebe, insbesondere die Cuticula, rosa (s. Abbildung 58, S. 42). Außerdem wird deutlich, dass sich die Ölzellen und deren Inhalt nicht rosa färben, sondern gelb bleiben.

3.8.3 Kryoschnitt

Zur Stabilisierung wurde das Zitronenblatt in 5% und 10% CMC-Medium eingebettet. Ähnlich wie in den vorherigen Experimenten (s. Kapitel 3.6.3 und 3.7.3, S. 33 und 37) lösten sich die ganzen Querschnitte beim Schneiden häufig aus der Einbettung. Dadurch wurde die Übertragung mit dem Pinsel auf den Objektträger erheblich verbessert. Die saubersten Querschnitte wurden bei Schnittdicken von 40 bis 60 µm erreicht, da die Struktur erhalten werden konnte und die Ölbehälter in den meisten Fällen gefüllt waren (s. Abbildungen 60-63, S. 43). Bei dünneren Schnitten diffundierte das ätherische Öl häufig aus den Zellen, was die spätere MALDI-MS Analyse behindern würde. Dickere Schnitte waren zu dunkel. Insgesamt zeigte sich, dass die Blätter von *Citrus x limon* aufgrund ihrer festen Natur für die Kryosektion geeignet sind.



Abbildung 53: Wasserpräparat
QS Blatt Zentrales Gefäßbündel



Abbildung 54: Wasserpräparat
QS Blatt Übersicht

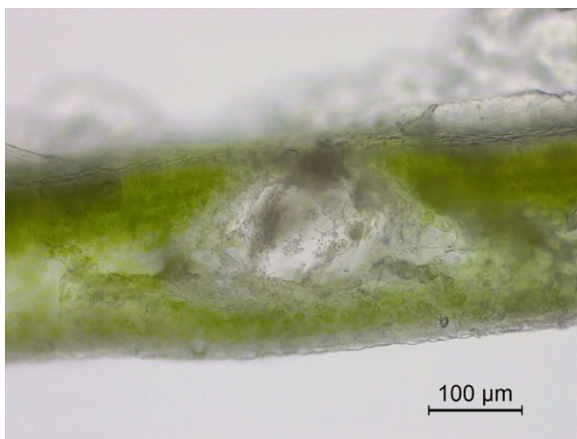


Abbildung 55: Wasserpräparat
QS Blatt Schizogener Ölbehälter

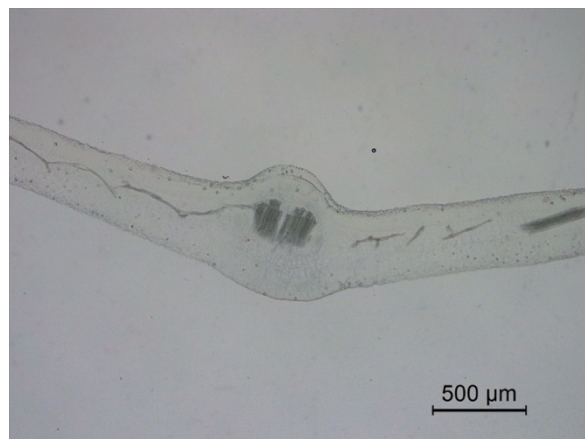


Abbildung 56: Chloralhydratpräparat
QS Blatt Übersicht

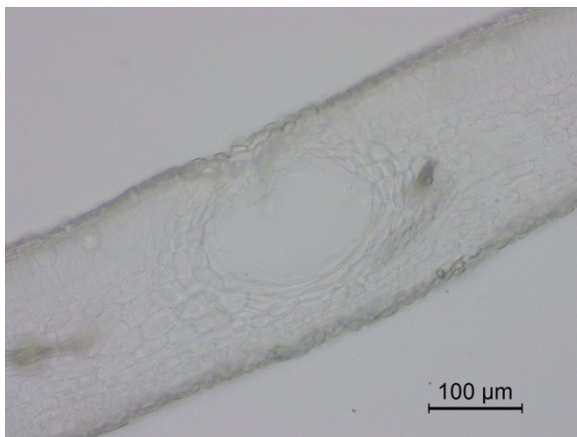


Abbildung 57: Chloralhydratpräparat
QS Blatt Schizogener Ölbehälter

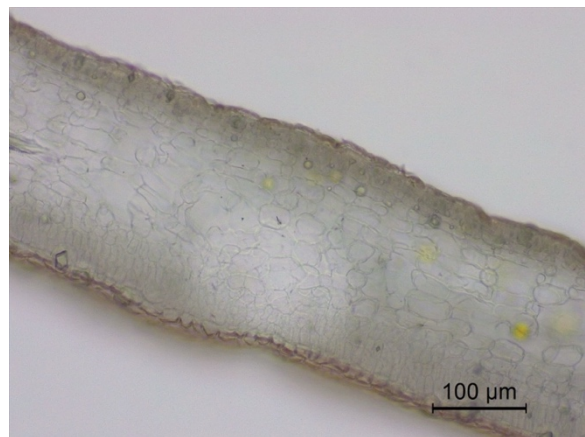


Abbildung 58: Sudan IV-Färbung
QS Blatt Rosa gefärbte Cuticula

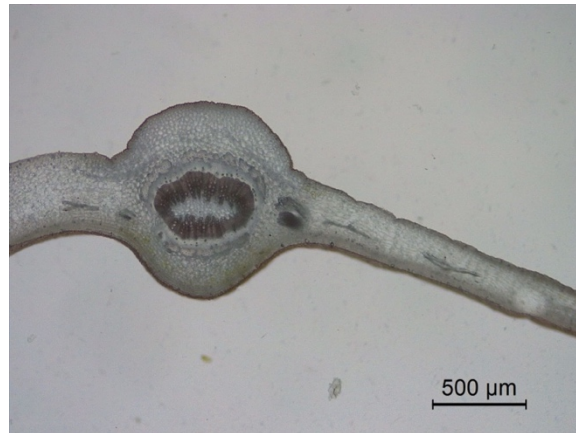


Abbildung 59: Sudan IV-Färbung
QS Blatt Übersicht

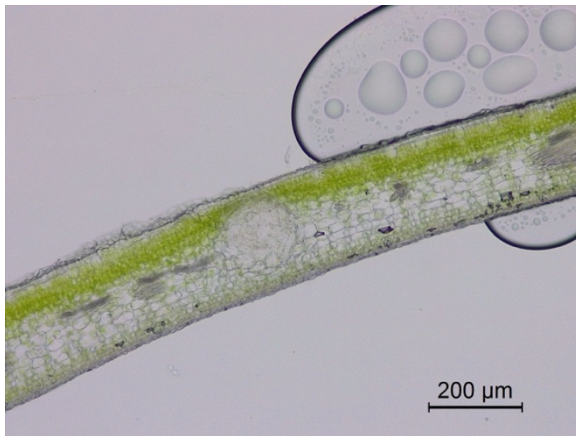


Abbildung 60: Kryoschnitt-CMC-Präparat
QS Blatt Übersicht / Schnittdicke: 40 µm



Abbildung 61: Kryoschnitt-CMC-Präparat
QS Blatt Leerer Ölbehälter / Schnittdicke: 40 µm



Abbildung 62: Kryoschnitt-CMC-Präparat
QS Blatt Gefüllter Ölbehälter / Schnittdicke: 60 µm



Abbildung 63: Kryoschnitt-CMC-Präparat
QS Blatt Ölbehälter / Schnittdicke: 60 µm

3.9 *Piper ornatum* N.E.Br.; Celebes-Pfeffer; Blatt

Organ: Folium; Blatt

Familie: Piperaceae; Pfeffergewächse

Weiters wurden die Blätter von *Piper ornatum* geschnitten. Diese waren ca. 7-8 cm lang und ca. 4-6 cm breit. Nach der Herstellung von Positivkontrollen mit Wasser und Chloralhydrat wurde ausschließlich in CMC-Gel eingebettet und geschnitten (s. Abbildungen 74 und 75, S. 47).

3.9.1 Anatomie

Im Querschnitt fällt zuallererst der pinke Farbstoff auf, der besonders an der Unterseite des Blattes in der Hypodermis vorkommt (s. Abbildungen 64-68, S. 46). Dieser wird durch Chloralhydrat offenbar gelöst und führt somit zu einer zarten Rosafärbung der gesamten Umgebung (s. Abbildungen 69-73, S. 46-47). Bei den Kryoschnitten verschwand dieser Farbstoff, weshalb dazu eingehendere Untersuchungen angestellt wurden (s. Abschnitt „Untersuchungen hinsichtlich des Farbstoffes“, S. 48). Das Blatt weist außen an beiden Seiten eine dünne Cuticula auf. Darunter liegt die Epidermis, welche sich an der Oberseite aus großen, rechteckigen Zellen zusammensetzt. An der Unterseite ist sie schmaler. Unter dem Abschlussgewebe liegt beidseitig eine großzellige und dünnwandige Hypodermis aus isodiametrischen Zellen. Obwohl die Struktur schlecht erkennbar ist, wird im Bereich mit der höchsten Chloroplastenkonzentration ein einschichtiges Palisadenparenchym vermutet. Daraufgehend zeigt sich locker angeordnete Schwammparenchym. An der Oberseite des Blattes, unterhalb des Gefäßbündels, befindet sich ein großer Gang (ca. 100 µm Ø). Darüber liegt ein bikollaterales Gefäßbündel. Zusätzlich findet man im Parenchym, besonders an den Außenseiten des Blattes, eine große Anzahl nadelartiger Einzelkristalle (s. Abbildungen 69 und 72, S. 46-47). Der gesamte Blattaufbau ist in den Abbildungen 64-73, S. 46-47, deutlich sichtbar.

3.9.2 Positivkontrolle

Durch die filigrane Struktur des Blattes von *Piper ornatum* war die Herstellung der Handschnitte komplex. Das Aufkochen in Chloralhydrat und das Überführen der Handschnitte auf den Objektträger führte oft zu Rissen oder zur Zerstörung der Querschnitte.

3.9.2.1 Wasserpräparat

Das dunkelgrüne Wasserpräparat erfordert zur Strukturaufklärung sehr dünne Schnitte. Sowohl am Blattrand als auch in der Mitte zeigen sich nicht-identifizierbare, kleine, kugelförmige Strukturen vor allem in Bereichen mit hoher Chloroplastenkonzentration.

3.9.2.2 Chloralhydrat-Präparat

Während das Chloralhydrat den pinken Farbstoff in der Hypodermis vermutlich auflöst, sind die kugelförmigen Strukturen auch hier zu erkennen. Außerdem zeigt sich eine ausgetretene orangefarbene Flüssigkeit entlang der Parenchymzellen (s. Abbildung 71, S. 47). Zudem sind nadelartigen Einzelkristalle ohne Polarisator zu erkennen (s. Abbildungen 69 und 72, S. 46-47).

3.9.3 Kryoschnitt

Das Pfefferblatt wurde in 5% und 10% CMC-Gel eingebettet. Trotz der Stabilisierung war die Herstellung dünner Blattquerschnitte anspruchsvoll. Ein anfänglicher Grund dafür könnte die groß bemessene Länge des Ausgangsmaterials gewesen sein, weshalb die Blätter folglich bereits vor dem Einfrieren kleiner geschnitten wurden. Die Schnitte wurden zwischen 40 und 100 µm angefertigt und die optimale Schnittdicke lag bei 70 µm (s. Abbildungen 74 und 75, S. 47). Präparate unter 40 µm waren oft rissig und zu dünn, um charakteristische Zellstrukturen zu erkennen. Auch die Aufbringung auf den Objektträger und die Platzierung des Deckglases war schwierig. Demgegenüber waren dickere Schnitte bei 100 µm anfälliger für Brüche und erlaubten kein Erkennen der relevanten Ölzellen. Hier muss ergänzt werden, dass auch der Einfallswinkel der Klinge einen nennenswerten Einfluss auf die Qualität hatte. Ein flacherer Winkel führte zu glatteren Schnitten, wohingegen steilere Winkel die Querschnitte porös machten. Alles in allem zeigt sich, dass die Kryosektion von *Piper ornatum* aufwendig ist. Es gilt, einen Kompromiss zwischen der Dünne der Querschnitte und der Strukturhaltung zu finden.



Abbildung 64: Wasserpräparat
QS Blatt Übersicht

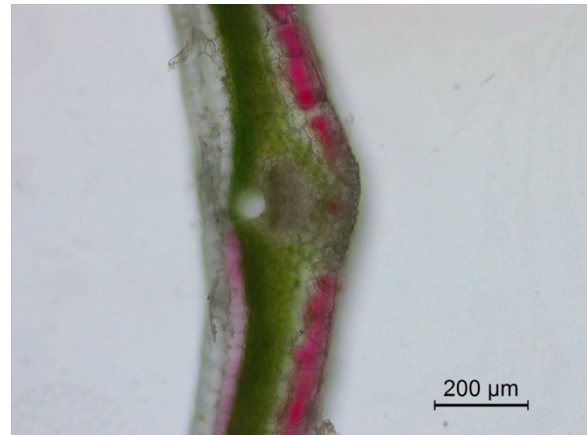


Abbildung 65: Wasserpräparat
QS Blatt Zentrales Gefäßbündel



Abbildung 66: Wasserpräparat
QS Blatt Übersicht



Abbildung 67: Wasserpräparat
QS Blatt Mesophyll



Abbildung 68: Wasserpräparat
QS Blatt Zentrales Gefäßbündel

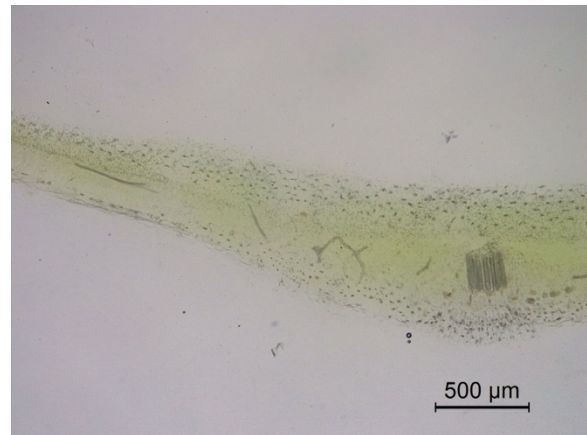


Abbildung 69: Chloralhydratpräparat
QS Blatt Übersicht

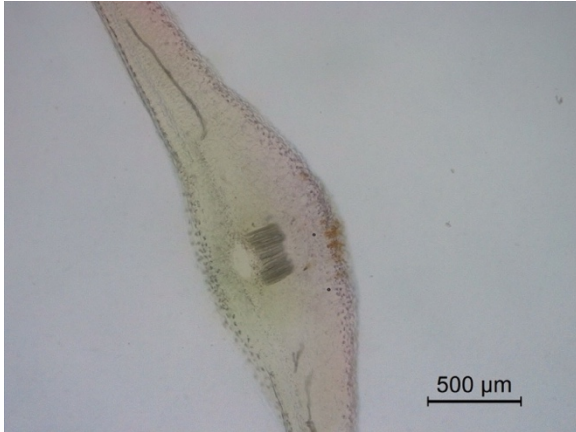


Abbildung 70: Chloralhydratpräparat
QS Blatt Übersicht

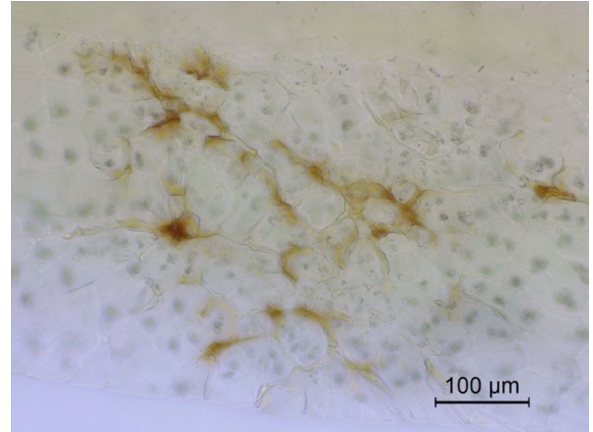


Abbildung 71: Chloralhydratpräparat
QS Blatt Parenchymzellen

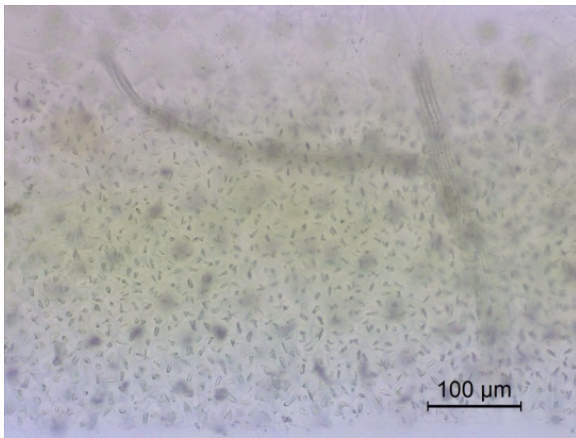


Abbildung 72: Chloralhydratpräparat
QS Blatt Nadelförmige Einzelkristalle

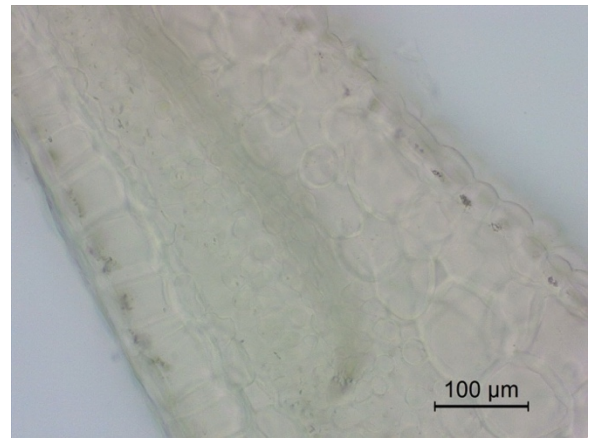


Abbildung 73: Chloralhydratpräparat
QS Bifazialer Blattaufbau

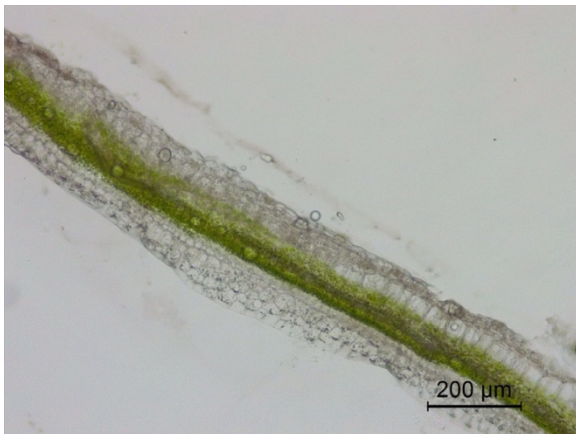


Abbildung 74: Kryoschnitt-CMC-Präparat
QS Blatt Übersicht / Schnittdicke: 70 µm



Abbildung 75: Kryoschnitt-CMC-Präparat
QS Blatt Übersicht / Schnittdicke: 70 µm

Untersuchungen hinsichtlich des Farbstoffes

Bei den mikroskopischen Untersuchungen der Kryoschnitte fiel auf, dass der charakteristische pinke Farbstoff, der in den Positivkontrollen deutlich sichtbar war, nach dem Schneiden am Kryostat-Mikrotom verschwand, sobald die Kühlkette unterbrochen wurde. Diese Beobachtung führte zu der Frage, ob der Farbstoff durch den abrupten Temperaturwechsel oder den Trocknungsprozess an der Raumtemperatur verloren geht. Um die Ursache zu klären, wurden zwei Versuche durchgeführt.

Im ersten Experiment wurden die Blätter von *Piper ornatum* in CMC eingebettet, eingefroren und schließlich am Kryostat-Mikrotom dünn geschnitten. Nach einer 24-stündigen Lagerung im Tiefkühler erfolgte der Transport zum Exsikkator mithilfe einer vorgekühlten Styroporbox, um die Kühlkette möglichst nicht zu unterbrechen. Die Blattquerschnitte wurden dann im Exsikkator 24 Stunden unter Vakuum getrocknet und schlussendlich unter dem Mikroskop untersucht. Der Farbstoff in der Hypodermis war nicht mehr nachweisbar und das vertrocknete Blatt zeigte eine dunkle Färbung.

Im zweiten Experiment wurden Teile des Blattes (ca. 0,5 × 0,5 cm) untersucht, wobei der Versuchsaufbau ähnlich war. Es bestand die Vermutung, dass der Farbstoff in größeren Stücken länger detektierbar ist, da der Tauprozess mehr Zeit in Anspruch nimmt. Anstatt der Kryosektion wurden die Blätter mithilfe von Falcon-Tubes in flüssigem Stickstoff eingefroren, für 24 Stunden bei -20 °C gelagert und ebenfalls unter durchgängiger Kühlung direkt in den Exsikkator übergeführt. Nach 24 Stunden im Exsikkator wurde das Probenmaterial ebenfalls untersucht. Schon makroskopisch war eine pinke Färbung entlang der Blattnervatur zu erkennen, die unter dem Mikroskop bestätigt wurde. Die Zellen waren geplatzt und der Farbstoff sammelte sich entlang der Nerven (s. Abbildungen 76 und 77, S. 49).

Angesichts dieser Ergebnisse liegt die Schlussfolgerung nahe, dass der Farbstoff durch den Temperaturwechsel verloren geht oder/und an der Luft sehr oxidationsempfindlich ist. Die Grundlage hierfür bildet, dass die Blattquerschnitte möglicherweise zu dünn waren, um sie im gefrorenen Zustand in den Exsikkator zu überführen. Demgegenüber ist der Auftauprozess größerer Proben zeitintensiver, weshalb sie höchstwahrscheinlich im gefrorenen Zustand in den Exsikkator eingebracht und durch Sublimation getrocknet werden konnten.

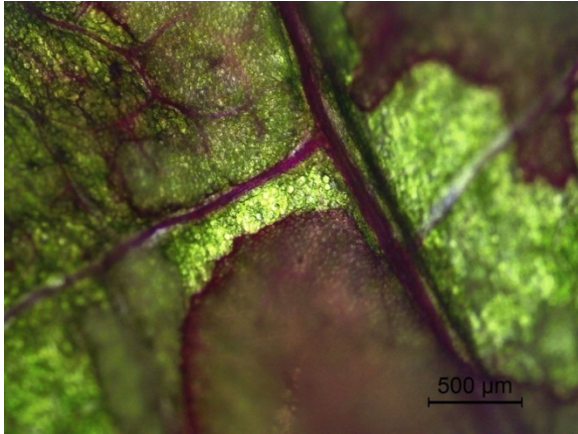


Abbildung 76: Okular 4x / Exsikkator-Präparat
Aufsicht Blatt Pinker Farbstoff

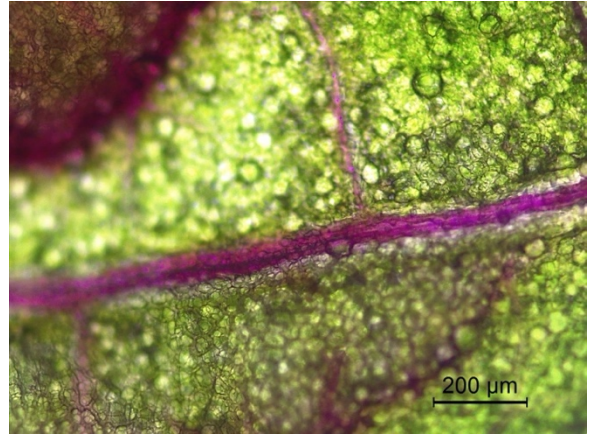


Abbildung 77: Okular 10x / Exsikkator-Präparat
Aufsicht Blatt Pinker Farbstoff

3.10 *Aloe vera* (L.) Burm.F.; Echte Aloe; Blatt

Organ: Folium; Blatt

Familie: Asphodelaceae; Affodillgewächse

Die Blätter der *Aloe vera* waren 6 cm lang 0,2 cm breit. Für die Positivkontrollen wurden Wasser- und Chloralhydrat-Präparate hergestellt. Die Kryosektion setzte eine Einbettung in CMC-Gel voraus. (s. Abbildung 94, S. 55).

3.10.1 Anatomie

Das Abschlussgewebe des Blattes – die Epidermis – wird außen von beiden Seiten mit einer ausgeprägten Cuticula begrenzt. Direkt darunter befindet sich eine mehrreihige, dunkelgrüne Zellschicht mit einem hohen Anteil an Chlorophyll. Darauf folgen mehrschichtige großzellige Parenchymzellen mit Raphidenbündeln. An der Innenseite des Parenchyms befinden sich in regelmäßigen Abständen kugelförmige und ovale kollateral geschlossene Gefäßbündel. Den größten Teil des Blattes macht der innere fleischige Teil aus bei welchem es sich um das schleimige farblose Gel handelt. Die Gefäßbündel sind zur Außenseite von dünnwandigen, kleinen Scheidenzellen umgeben, in denen das Aloin synthetisiert wird, welches für das Blatt charakteristisch ist. Die Speicherung des Aloins erfolgt in größeren Parenchymzellen (Alagukannan & Ganesh, 2014). Der gesamte Blattaufbau wird in den Abbildungen 78-83, S. 53, verdeutlicht.

3.10.2 Positivkontrolle

Die weiche Blattstruktur und die Absonderung des Aloe-Gels machte die Herstellung vollständiger Querschnitte der *Aloe vera* schwierig, weshalb primär kleinere Stücke ohne Schleim mikroskopiert wurden.

3.10.2.1 Wasserpräparat

Durch die hohe Chloroplastenkonzentration hatte das Blatt im Wasser eine dunkelgrüne Farbe (s. Abbildung 78-81, S. 53). Raphiden waren in diesem Präparationsmedium nur mit dem Polarisator zu erkennen

3.10.2.2 Chloralhydrat-Präparat

Die Präparation in Chloralhydrat färbte die *Aloe vera* hellgrün bis weiß und löste das Gel auf, wodurch die Strukturaufklärung erleichtert wurde (s. Abbildungen 82 und 83, S. 53). Zudem waren die Raphidenbündel ohne Polarisator erkennbar.

3.10.2.3 Methylenblau-Färbung

Die Methylenblau-Färbung wird verwendet, um den Schleim innerhalb des Blattes sichtbar zu machen (s. Abbildungen 84 und 85, S. 54).

3.10.2.4 KOH-Färbung

Bei dieser Präparationsmethode tritt eine markante gelbliche Färbung des Blattes auf. Die Reaktion ist auf das Aloin zurückzuführen und erstreckt sich über den ganzen Schnitt, färbt aber vor allem die Gefäßbündel braun-rot (s. Abbildung 86, S. 54).

3.10.2.5 Safranin-Astrablau-Färbung

Das Safranin-Astrablau-Reagenz sorgt für eine typische hellblaue Färbung des nicht-verholzten Blattgewebes. Auffällig sind jedoch die kleinen, rundlichen, rötlich gefärbten Zellinhalte, welche in den bisherigen Untersuchungen nicht erkennbar sind (s. Abbildungen 88 und 89, S. 54). Diese Strukturen sind zu Beginn sehr deutlich sichtbar, beginnen jedoch nach etwa 30 Minuten zu verblassen (s. Abbildung 87, S. 54). Um die Herkunft abzuklären, wurde eine eingehendere Untersuchung durchgeführt. Mithilfe eines Polarisators konnte kein Leuchten, wie es durch kristalline Strukturen auftritt, festgestellt werden. Somit waren Ca-Oxalat-Kristalle auszuschließen. Auch in den Chloralhydrat-Präparaten waren diese Strukturen zunächst nicht sichtbar. Erst der Spülvorgang mit Wasser vor der Zugabe von Glycerin oder Ethanol beziehungsweise die alleinige Untersuchung mit alkoholischen Lösungsmitteln macht sie in fast jeder Zelle sichtbar (s. Abbildung 90, S. 55). Ein ähnliches Verhalten wurde auch bei den von *Taraxaci officinalis radix* beschriebenen Inulin-Strukturen beobachtet (EDQM, 1974). Im Fall dieser Arbeit kann jedoch keine eindeutige Identifikation vorgenommen werden und es müssten weitere Untersuchungen durchgeführt werden, um die genaue Herkunft der gefärbten Zellinhalte abzuklären.

3.10.2.6 Sudan IV-Färbung

Die Sudan IV-Färbung zeigt eine rosa gefärbte Cuticula des Blattes (s. Abbildungen 91 und 93, S. 55). Bemerkenswert ist jedoch die leichte rosa Färbung der Zellen, die Raphidenbündel enthalten (s. Abbildung 92, S. 55). Die Kristallbildung von Pflanzen erfolgt teilweise in Idioblasten, wobei es sich um zartwandige, schlauchförmige oder runde Zellen handelt, welche oft eine Suberinlamelle besitzen (Braune et al., 1994). In der Literatur wird beschrieben, dass Sudan IV genutzt werden kann, um Suberin zu färben (Dean & Sybil Jr, 1942). Dies führt zu der Hypothese, dass sich in diesen Zellen Suberin anreichern könnte, was die rosa Färbung der Strukturen erklären würde.

3.10.3 Kryoschnitt

Die Blätter der *Aloe vera* wurden überwiegend klein gewählt, da die Stabilität mit dem Durchmesser des Blattes und der Menge des Gels signifikant abnimmt. Für die Einbettung wurde 5% und 10% CMC-Gel gewählt. Die besten Ergebnisse lieferte der Schnittbereich von 90 bis 100 μm (s. Abbildung 94, S. 55). Im Gegensatz zu den zuvor behandelten Blättern waren auch diese Schnitte unter dem Mikroskop sehr dünn und zerbrechlich. Ein Schneidevorgang unter 80 μm führte zu keinem zufriedenstellenden Ergebnis. Aus den Experimenten geht hervor, dass die Kryosektion der *Aloe vera* ein komplexer, zeitaufwendiger Prozess ist. Die weiche Konsistenz und der große Anteil an Gel fordern Stabilität, welche das CMC-Gel nicht ausreichend liefern konnte. Mit großer Sorgfalt war die Untersuchung weniger erfolgreicher Querschnitte (90 bis 100 μm) unter dem Mikroskop jedoch möglich.

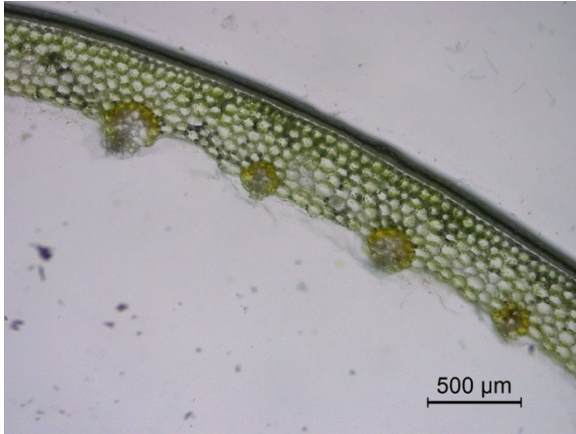


Abbildung 78: Wasserpräparat
QS Blatt Übersicht

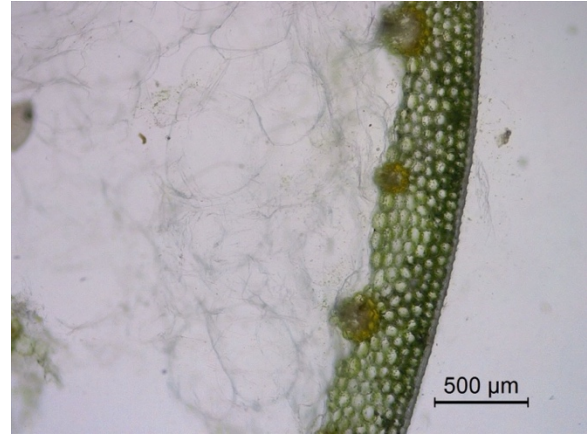


Abbildung 79: Wasserpräparat
QS Blatt Übersicht

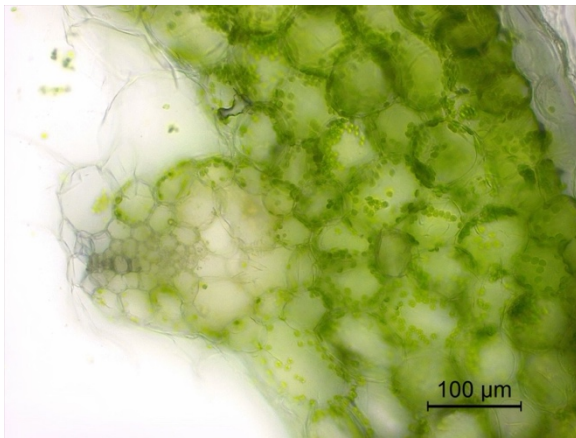


Abbildung 80: Wasserpräparat
QS Blatt Gefäßbündel

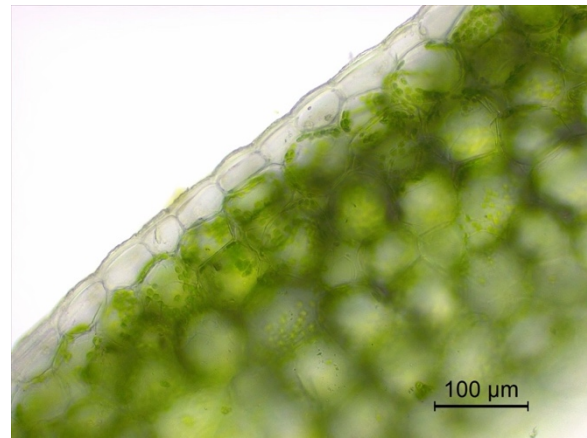


Abbildung 81: Wasserpräparat
QS Blatt Cuticula und Epidermis

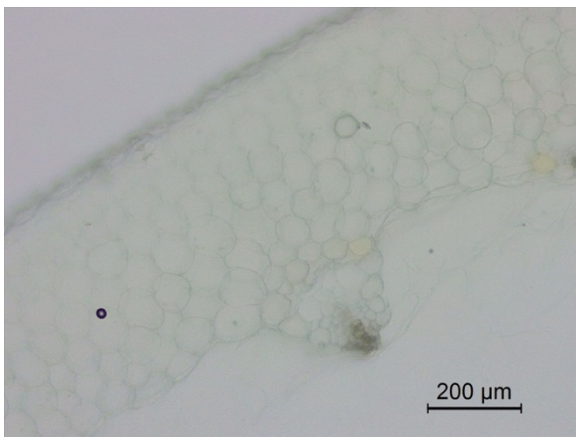


Abbildung 82: Chloralhydrat-Präparat
QS Blatt Gefäßbündel

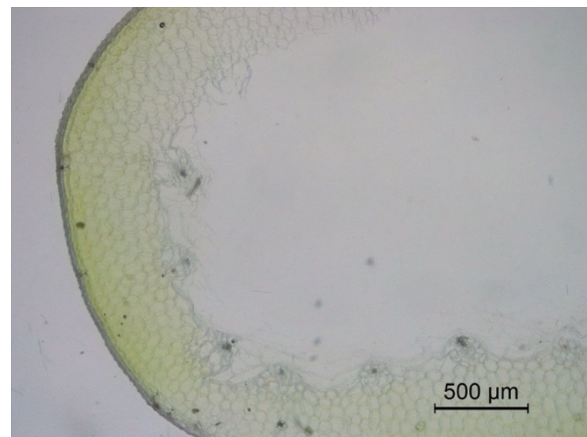


Abbildung 83: Chloralhydrat-Präparat
QS Blatt Übersicht

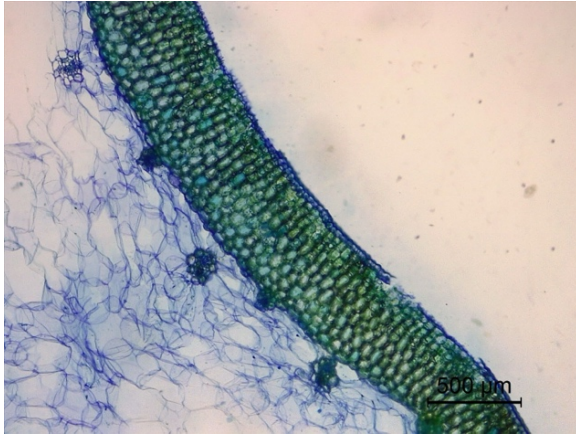


Abbildung 84: Methylenblau-Färbung
QS Blatt Übersicht

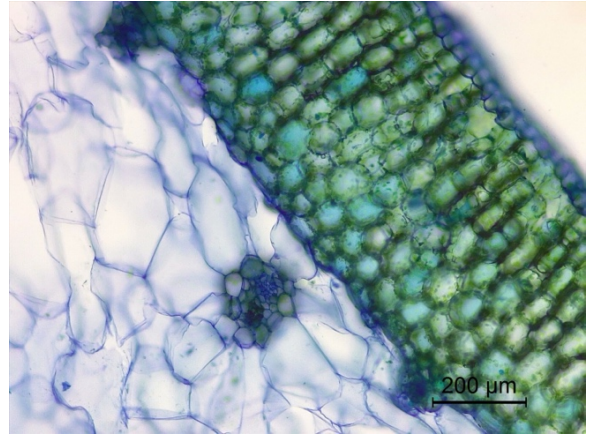


Abbildung 85: Methylenblau-Färbung
QS Blatt Gefäßbündel und Aloe-Gel

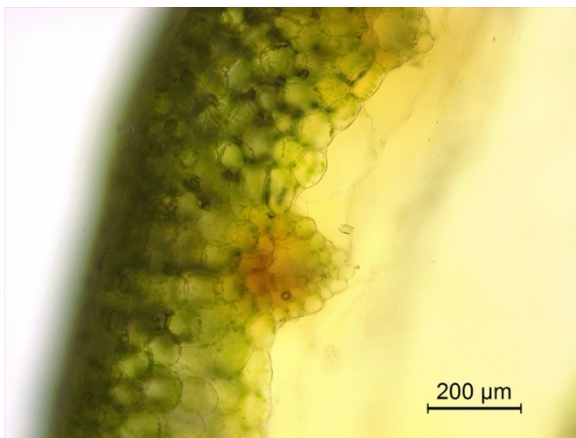


Abbildung 86: KOH-Färbung
QS Blatt Gefäßbündel mit gefärbtem Aloid

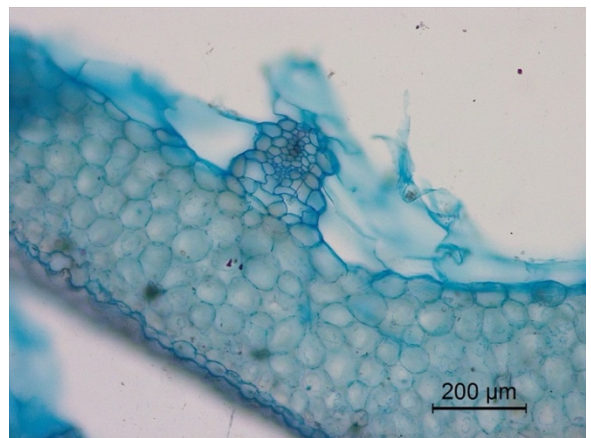


Abbildung 87: Safranin-Astrablau-Färbung
QS Blatt Gefäßbündel und Aloe-Gel

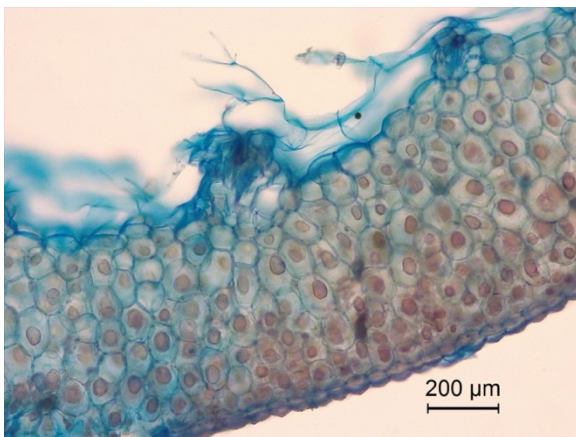


Abbildung 88: Safranin-Astrablau-Färbung
QS Blatt Rosa gefärbte Inulin-Kristalle

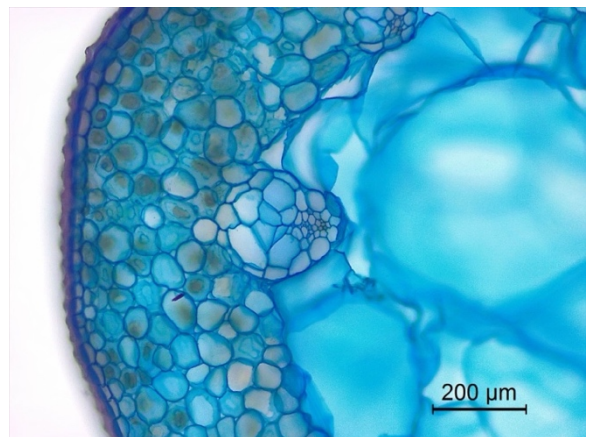


Abbildung 89: Safranin-Astrablau-Färbung
QS Blatt Übersicht

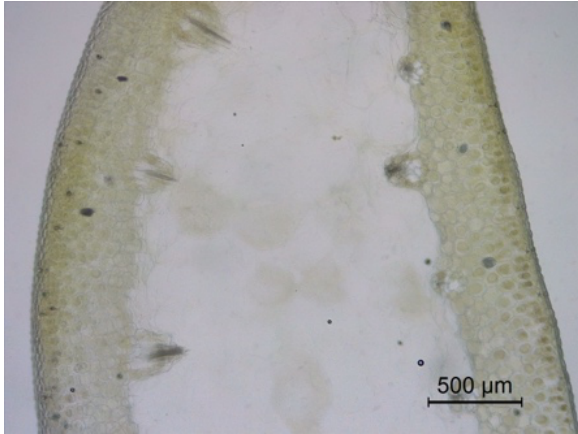


Abbildung 90: Wasserpräparat – Glycerin-Zugabe
QS Blatt Übersicht mit Inulin-Kristalle

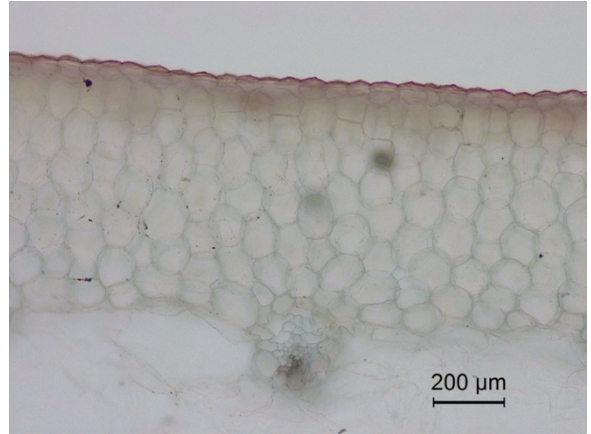


Abbildung 91: Sudan IV-Färbung
QS Blatt Rosa gefärbte Cuticula

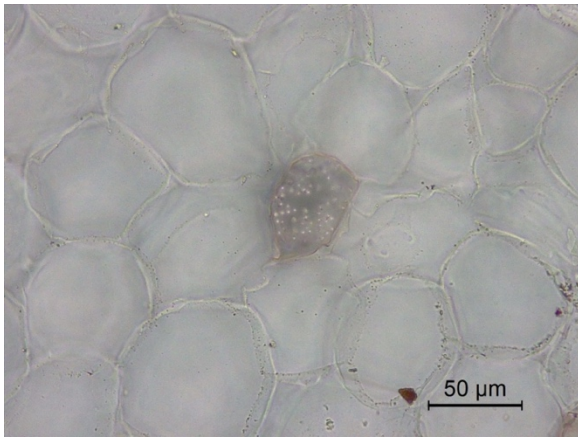


Abbildung 92: Sudan IV-Färbung
QS Blatt Raphidenbündel

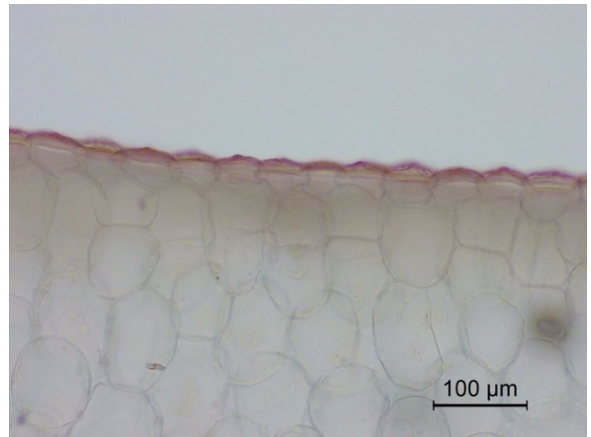


Abbildung 93: Sudan IV-Färbung
QS Blatt Rosa gefärbte Cuticula



Abbildung 94 Kryoschnitt-CMC-Präparat
QS Blatt Übersicht / Schnittdicke: 90 µm

3.11 *Myrrhis odorata* (L.) Scop.; Süßdolde; Frucht

Organ: Fructus; Frucht

Familie: Apiaceae; Doldenblütler

Für die Untersuchung wurden die 1-2 cm langen getrockneten Früchte von *Myrrhis odorata* verwendet, die zuerst als Positivkontrollen in Wasser und Chloralhydrat präpariert wurden. Darauf folgte die Einbettung in CMC-Gel und die Kryosektion (s. Abbildungen 104-107, S. 60).

3.11.1 Anatomie

Es handelt sich um eine sichelförmige Frucht mit einer vierkantigen Form (s. Abbildungen 96 und 97, S. 58). Im Zentrum befindet sich das Endosperm (s. Abbildungen 98 und 99, S. 58), welches große Mengen an fettem Öl, Aleuron und Ca-Oxalat-Drusen enthält. Das Perikarp umhüllt die Testa, die Samenschale des Endosperms. In der Fruchtwand (s. Abbildungen 100-103, S. 58-59), insbesondere im Mesokarp, sind vereinzelt noch bräunlich verharzte Ölgänge erkennbar. Die Leitbündel der Frucht sind entlang der vier Rippen verteilt, wobei besonders das Xylem gut zu erkennen ist (s. Abbildungen 97 und 102, S. 58-59). Die äußere braune Zellschicht, die Epidermis, ist eher dünn. Zu Beginn wurde die Frucht ausgewählt, da davon ausgegangen wurde, dass sie große Mengen an ätherischem Öl enthält, welches für eine potenzielle anschließende MALDI-MS-Analyse interessant wäre. Bei der Untersuchung wurde aber schnell klar, dass die Sichtbarkeit dieser Ölgänge sehr eingeschränkt war, da die Fruchtwand häufig nicht mehr intakt war.

3.11.2 Positivkontrolle

Durch die spröde Natur der Süßdolde war es notwendig, die Frucht vor der Präparation für einige Minuten in Wasser einzuweichen. Dies erleichterte zwar den Schneidevorgang, jedoch war der äußere Teil in den meisten Fällen trotzdem nicht intakt.

3.11.2.1 Wasserpräparat

Aufgrund der Vielzahl an Luftblasen unter dem Deckglas und der dunklen Farbe des Querschnitts war in diesem Fall keine Strukturaufklärung möglich.

3.11.2.2 Chloralhydrat-Präparat

Durch das Aufkochen in Chloralhydrat färbte sich das Endosperm weiß-durchsichtig, während die Außenseite orange erschien (s. Abbildungen 102 und 103, S. 59). Die beschädigte Fruchtwand erschwerte das Erkennen der Ölgänge.

3.11.3 Kryoschnitt

Nachdem sich das Schneiden der Süßdolde ohne Einbettung als ineffektiv erwies, wurde eine Einbettung in 5% und 10% CMC-Gel gewählt. Ein breites Spektrum an Schnittdicken zwischen 20 und 90 µm wurde getestet. Bei dickeren Schnitten war die Anatomie der Frucht schwer erkennbar und bei zu dünnen Schnitten war das Thaw-Mounting nicht umsetzbar. Darüber hinaus war die Fruchtwand instabil und in vielen Fällen kaum sichtbar. Das beste Ergebnis erzielte man in einem Bereich zwischen 30 und 60 µm (s. Abbildungen 104-107, S. 60). Insbesondere die Schnittdicke von 30 µm lieferte Erkenntnisse über den Aufbau der Fruchtwand und der Lage der ätherischen Ölgänge. Die Ergebnisse weisen jedoch darauf hin, dass die Gewebestruktur der Süßdolde für die Kryosektion nicht optimal ist. Während eine Einbettung in CMC-Gel die Präparation effizienter gestaltete, erforderte die Herstellung der Querschnitte eine präzise Arbeitsweise und lieferte inkonsistente Ergebnisse.

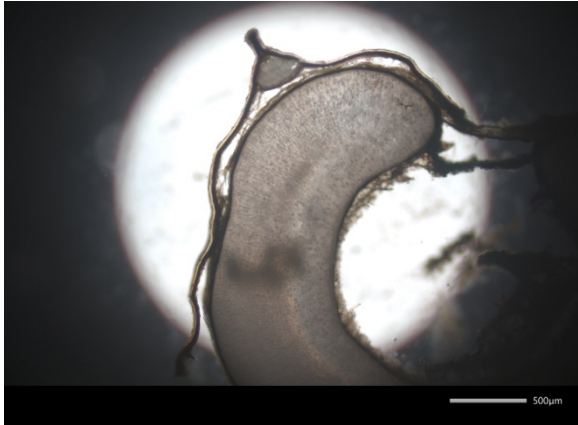


Abbildung 95: Wasserpräparat
QS Frucht Übersicht

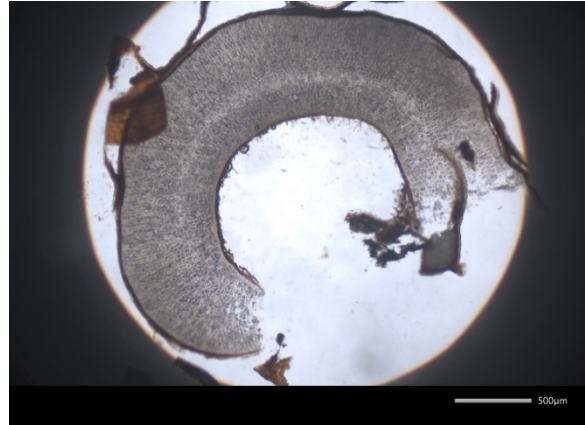


Abbildung 96: Wasserpräparat
QS Sichelförmige Frucht



Abbildung 97: Wasserpräparat
QS Frucht Leitbündel

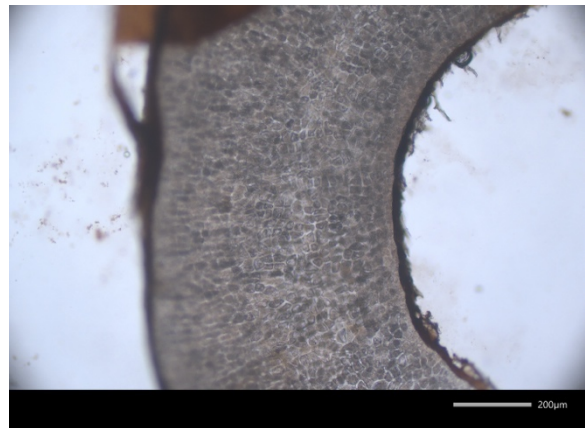


Abbildung 98: Wasserpräparat
QS Frucht Endosperm

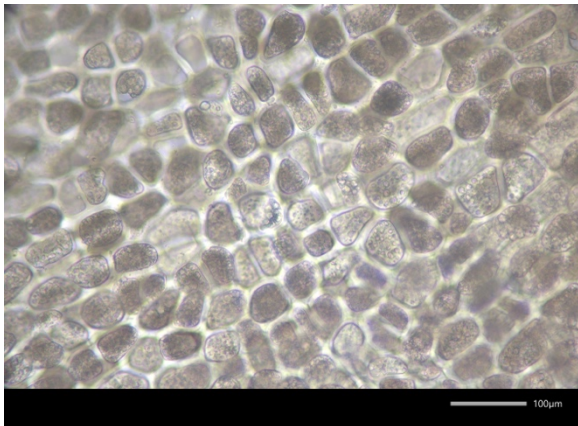


Abbildung 99: Wasserpräparat
QS Frucht Endosperm

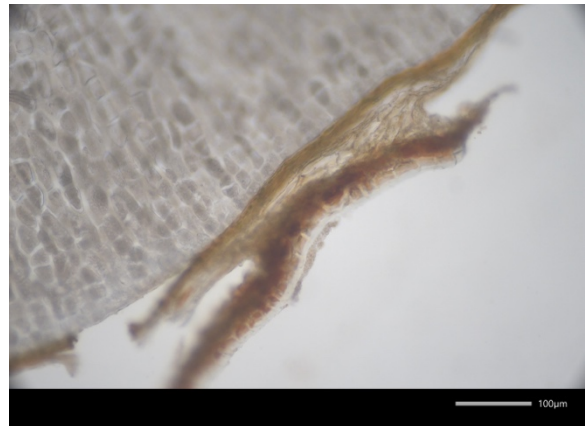


Abbildung 100: Wasserpräparat
QS Frucht Fruchtwand

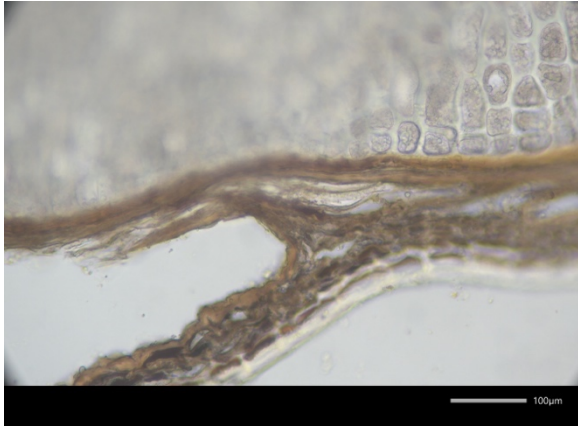


Abbildung 101: Wasserpräparat
QS Frucht Fruchtwand mit Ölgängen

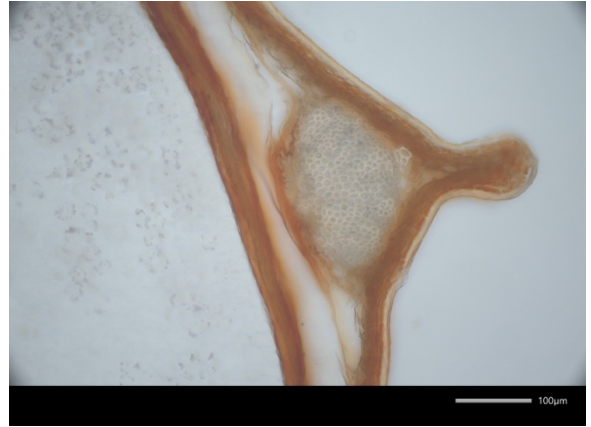


Abbildung 102: Chloralhydrat-Präparat
QS Frucht Leitbündel



Abbildung 103: Chloralhydrat-Präparat
QS Frucht Fruchtwand



Abbildung 104: Kryoschnitt-CMC-Präparat
QS Frucht Übersicht / Schnittdicke: 30 μm

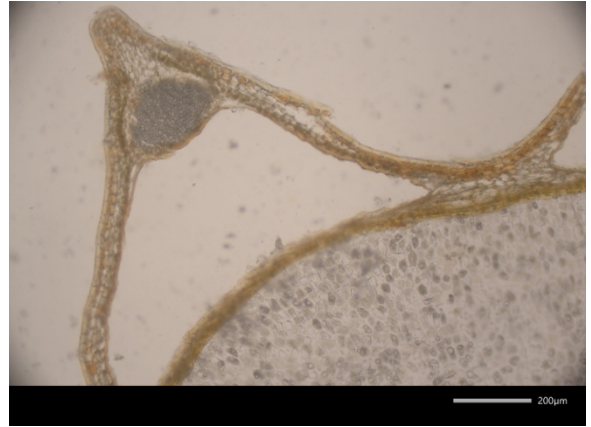


Abbildung 105: Kryoschnitt-CMC-Präparat
QS Frucht Leitbündel / Schnittdicke: 30 μm

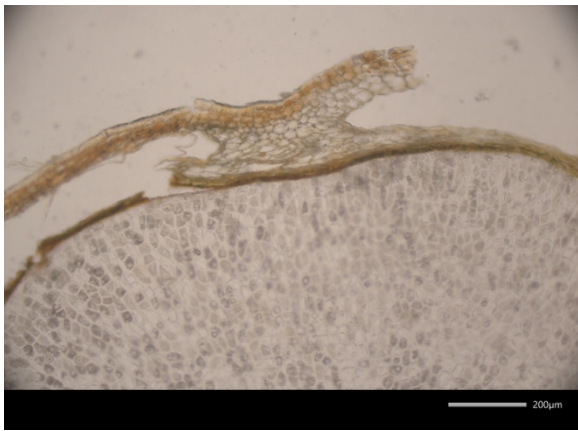


Abbildung 106: Kryoschnitt-CMC-Präparat
QS Frucht Fruchtwand / Schnittdicke: 30 μm

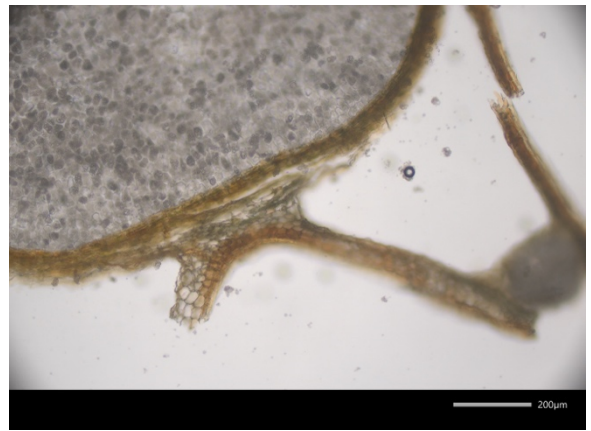


Abbildung 107: Kryoschnitt-CMC-Präparat
QS Frucht Fruchtwand / Schnittdicke: 60 μm

3.12 Foeniculum vulgare Mill.; Fenchel; Frucht

Organ: Fructus; Frucht

Familie: Apiaceae; Doldenblütler

Die getrockneten Früchte des Fenchels wurden zuerst als Positivkontrolle in Form von Wasser- und Chloralhydrat-Präparaten untersucht. Darauffolgend wurden die Kryoschnitte angefertigt, wobei die Früchte am Anfang ohne Einbettung und darauffolgend in CMC-Gel-Würfel (s. Abbildungen 120-123, S. 65) geschnitten wurden. Ebenfalls wurden auch Schnitte unter der Verwendung von Tissue-Tek®-O.C.T.TM-Compound hergestellt (s. Abbildungen 124-129, S. 66).

3.12.1 Anatomie

Die Frucht besteht aus zwei Teilfrüchten mit jeweils vier Exkretgängen in den Tälern und zwei an der Fugenseite beidseitig der Raphe, d. h. jede Teilfrucht hat sechs Exkretgänge. Mittig liegt in beiden Teilfrüchten ein zentraler Embryo (s. Abbildung 109, S. 63). Die schizogenen braun-gefärbten Exkretgänge, auch Ölstriemen genannt, liegen im Tal der Fruchtwand. Die Leitbündel befinden sich in den Rippen und bestehen aus Xylem und Phloem (s. Abbildung 119, S. 65). Fasern und ein Mesokarp mit Fensterzellen umgeben das Gefäßbündel. Im Inneren befindet sich in beiden Teilhälften ein braun-graues, dickwandiges Endosperm. Die Fruchtwand teilt sich in Exokarp, Mesokarp und Endokarp. Der gesamte Fruchtaufbau ist in den Abbildungen 108-119, S. 63-65, zu sehen.

3.12.2 Positivkontrolle

Während der Präparation stellte sich heraus, dass der Fenchel ähnlich zu *Myrrhis odorata* (s. Kapitel 3.11, S. 56-60) eine Probenvorbereitung erfordert. Die trockenen Früchte wurden beim Schneiden mit der Rasierklinge brüchig. Durch das Einlegen in Wasser für 20 Minuten waren die spröden Proben jedoch zu weich und gequetscht. Es wurde festgestellt, dass das Einweichen in Wasser für 5 Minuten die Frucht optimal auf die mikroskopische Untersuchung vorbereitet.

3.12.2.1 Wasserpräparat

In den Wasserpräparaten waren zahlreiche Luftblasen sichtbar. Diese Problematik konnte durch das Nachtropfen von Wasser und das Erwärmen des Objektträgers nicht vollständig behoben werden. Erst das Überführen auf einen frischen Objektträger entfernte die Luftblasen weitgehend. Bei ausreichend dünnen Querschnitten waren die Wasserpräparate eine gute Grundlage zur Beschreibung der Anatomie (s. Abbildungen 108-112, S. 63).

3.12.2.2 Chloralhydrat-Präparat

Im Chloralhydrat-Präparat konnten keine Luftblasen festgestellt werden und das Aufkochen färbte die Früchte zum größten Teil weißlich-transparent. Diese Präparationstechnik erlaubte eine detaillierte Strukturaufklärung (s. Abbildungen 113-119, S. 64-65). Auffällig sind die orangen Ölstriemen und das hellbraune Endokarp.

3.12.3 Kryoschnitt

Für den Schneidevorgang der spröden Frucht wurden unterschiedliche Methoden getestet. Zunächst wurde der Fenchel ohne Einbettung mit Tissue-Tek®-O.C.T.TM-Compound auf dem Stempel des Mikrotoms fixiert und bei Schnittdicken zwischen 50 und 80 µm geschnitten. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Querschnitte mangelhaft waren, da die Frucht der Schneidkraft der Klinge ohne Stabilisierung nicht standhielt. Ein wesentliches Hindernis war die fragile zentrale Verbindungsstelle der beiden Teilfrüchte, welche oft zur Zweiteilung führte. Darüber hinaus wurde der Fenchel in 5% und 10% CMC-Gel eingebettet. Die Schnitte wurden von 20 bis 90 µm gefertigt, wobei die besten Ergebnisse zwischen 30 und 60 µm erreicht wurden (s. Abbildungen 120-122, S. 65). Dünnere Querschnitte unter 30 µm waren nicht umsetzbar, wohingegen Schnittdicken über 60 µm zu dunkel waren (s. Abbildung 123, S. 65). Zudem erforderte auch die Übertragung der Querschnitte mit dem Pinsel auf die Objektträger besondere Sorgfalt. Insgesamt zeigte sich, dass die Kryosektion des Fenchels komplex ist. Trotz der verbesserten Ergebnisse im Vergleich zur Methode ohne Einbettung war die Stabilisierung der Frucht nicht ausreichend, um eine konsistente hohe Schnittqualität zu erreichen und erfordert weitere Experimente. Schlussendlich wurde der Fenchel in Tissue-Tek® O.C.T.TM Compound eingebettet, um die Ergebnisse mit dem anderen Einbettungsmedium zu vergleichen (s. Abbildungen 124-129, S. 66). Die Schnitte erstreckten sich zwischen 10 und 80 µm, wobei die besten Ergebnisse bei 20 bis 40 µm erzielt wurden. Dickere Schnitte erschwerten die Strukturaufklärung, während dünnere Schnitte Risse aufwiesen. Problematisch bei dieser Methode war das Einrollen der Schnitte, was ein vorsichtiges Handling mit dem Pinsel erforderte. Da OCT die mikroskopische Untersuchung störte, mussten die Schnitte in Wasser gewaschen und mit einem Pinsel auf einen neuen Objektträger überführt werden. Angesichts dieser Ergebnisse liegt die Schlussfolgerung nahe, dass der Histologie-Standard ideal ist, da er gleichmäßigere Querschnitte ermöglichte. Dem muss entgegengehalten werden, dass dieses Medium aufgrund seiner Wechselwirkung mit der MALDI-MS nicht verwendet werden kann.

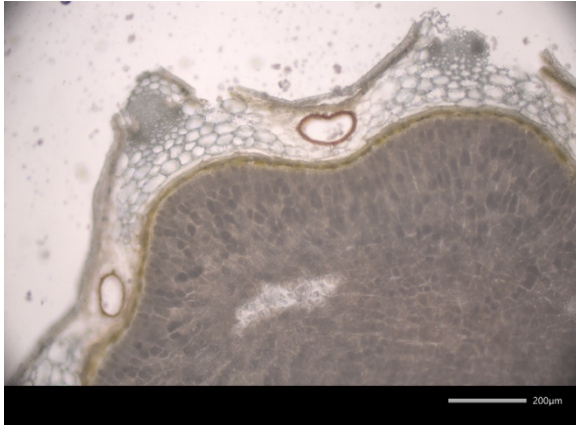


Abbildung 108: Wasserpräparat
QS Frucht Übersicht

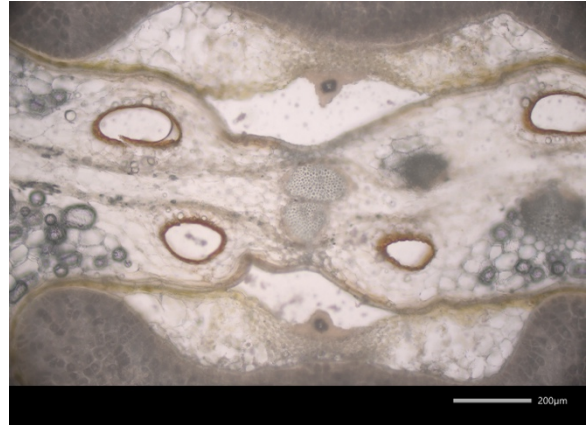


Abbildung 109: Wasserpräparat
QS Frucht Übersicht nahe der Raphe

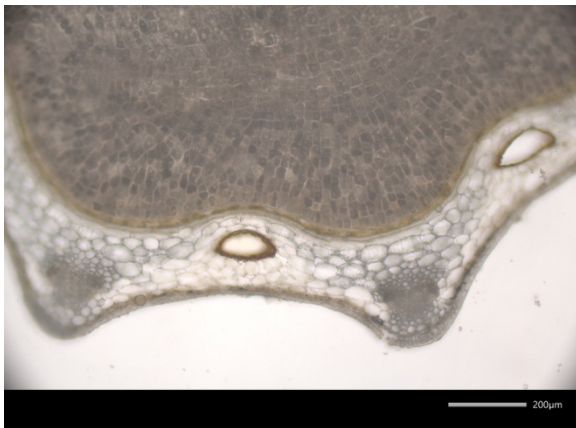


Abbildung 110: Wasserpräparat
QS Frucht Exkretgänge und Leitbündel

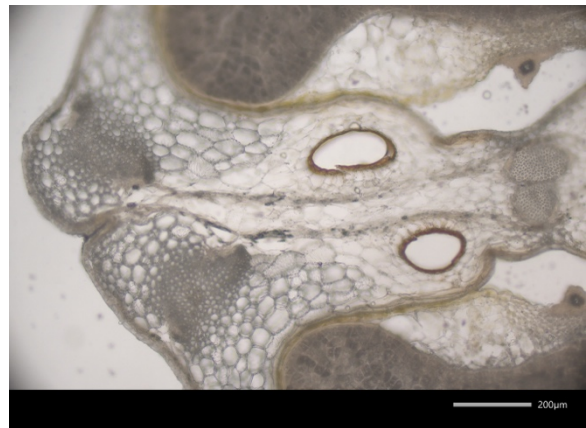


Abbildung 111: Wasserpräparat
QS Frucht Exkretgänge und Leitbündel

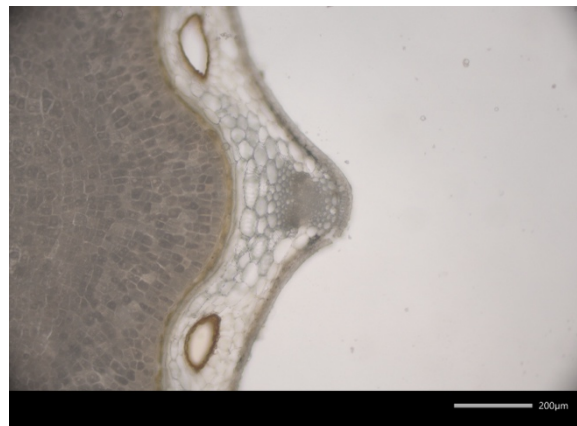


Abbildung 112: Wasserpräparat
QS Frucht Exkretgänge und Leitbündel

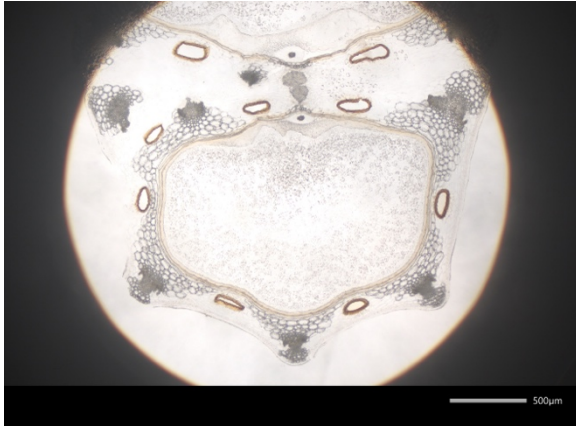


Abbildung 113: Chloralhydrat-Präparat
QS Frucht Übersicht

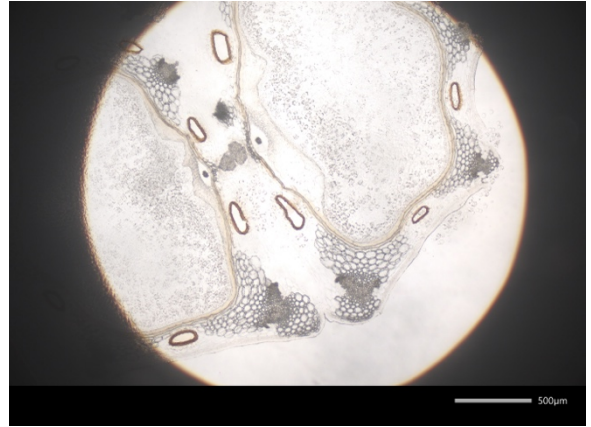


Abbildung 114: Chloralhydrat-Präparat
QS Frucht Übersicht

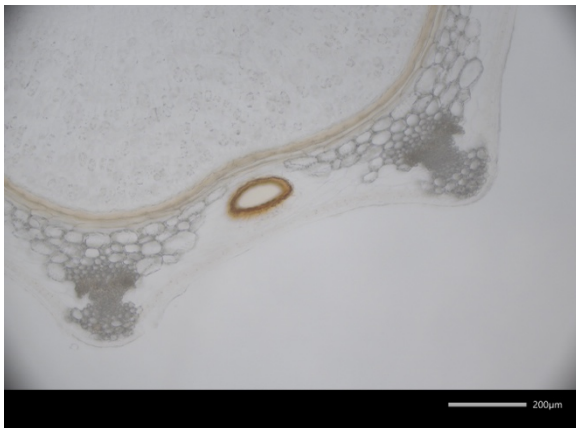


Abbildung 115: Chloralhydrat-Präparat
QS Frucht Exkretgang und Leitbündel

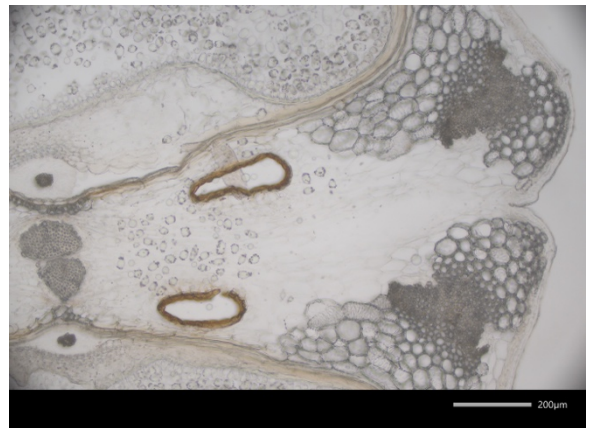


Abbildung 116: Chloralhydrat-Präparat
QS Frucht Exkretgänge und Leitbündel

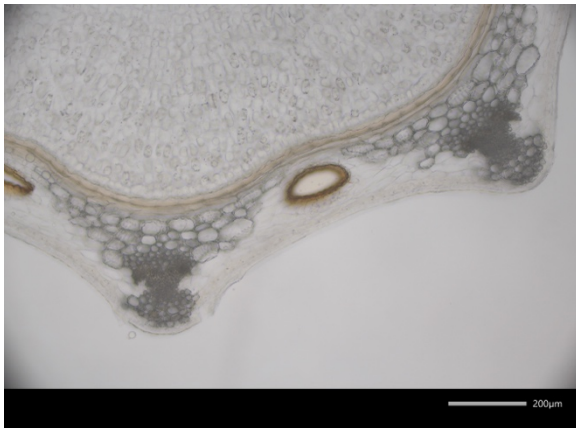


Abbildung 117: Chloralhydrat-Präparat
QS Frucht Exkretgang und Leitbündel

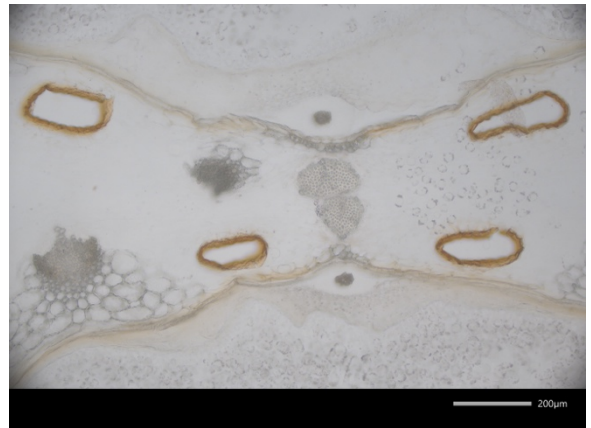


Abbildung 118: Chloralhydrat-Präparat
QS Frucht Übersicht nahe Raphe

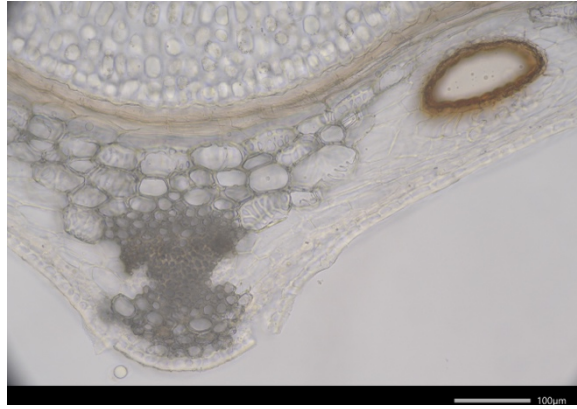


Abbildung 119: Chloralhydrat-Präparat
QS Frucht Exkretgang und Leitbündel

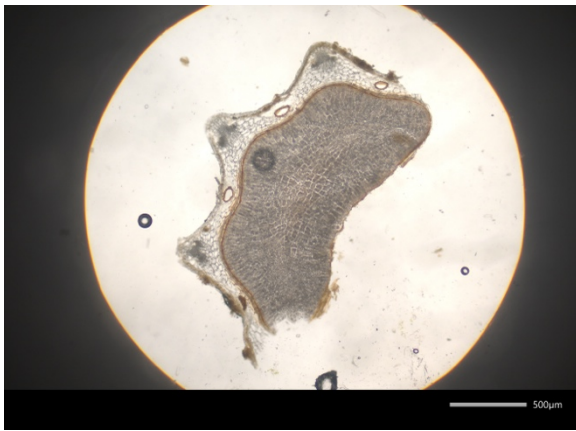


Abbildung 120: Kryoschnitt-CMC-Präparat
QS Frucht Übersicht / Schnittdicke: 50 µm

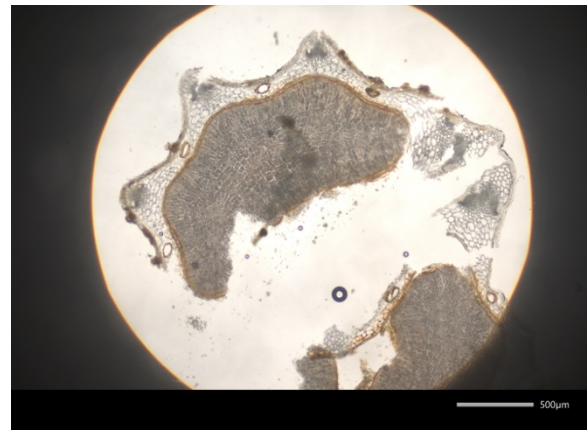


Abbildung 121: Kryoschnitt-CMC-Präparat
QS Frucht Übersicht / Schnittdicke: 60 µm

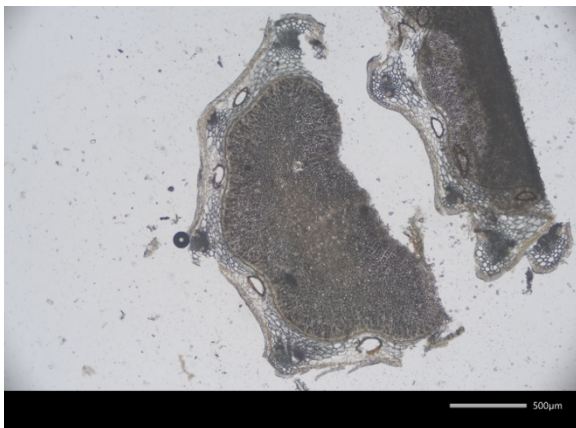


Abbildung 122: Kryoschnitt-CMC-Präparat
QS Frucht Übersicht / Schnittdicke: 30 µm

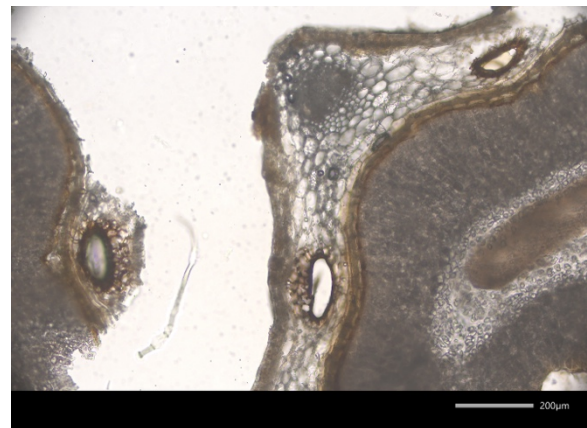


Abbildung 123: Kryoschnitt-CMC-Präparat
QS Frucht Übersicht / Schnittdicke: 70 µm

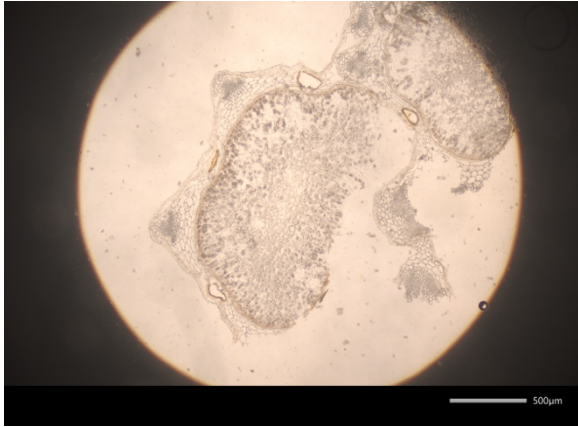


Abbildung 124: Kryoschnitt-TissueTec®-Präparat
QS Frucht Übersicht / Schnittdicke: 10 μm

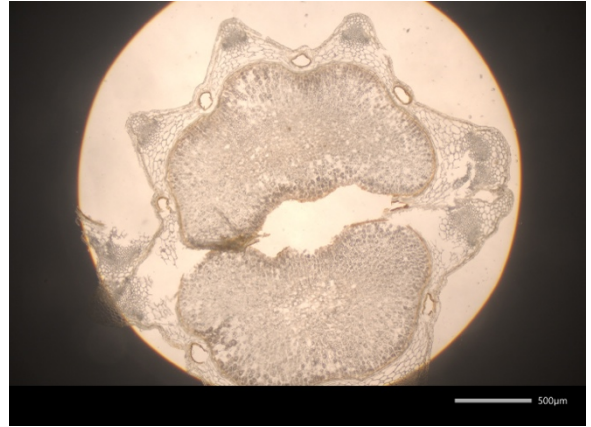


Abbildung 125: Kryoschnitt-TissueTec®-Präparat
QS Frucht Übersicht / Schnittdicke: 20 μm

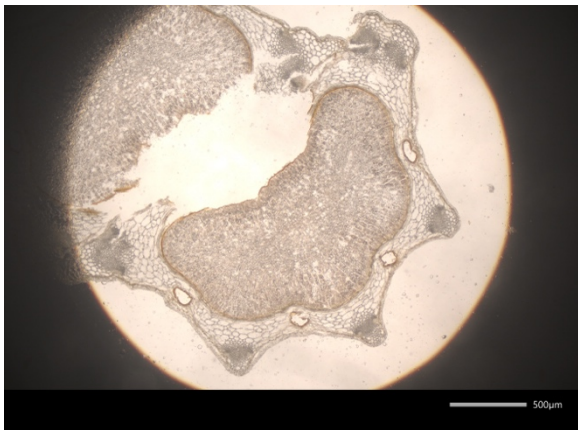


Abbildung 126: Kryoschnitt-TissueTec®-Präparat
QS Frucht Übersicht / Schnittdicke: 30 μm

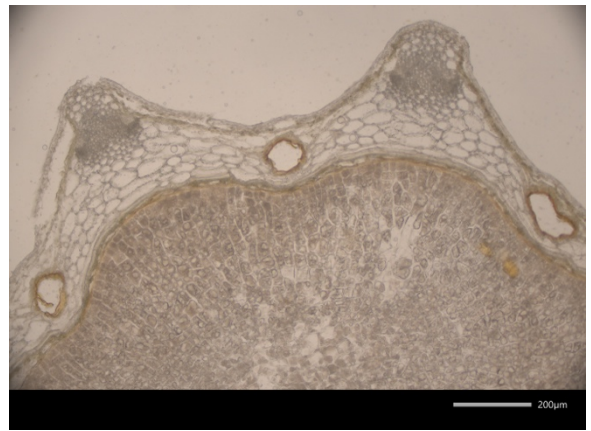


Abbildung 127: Kryoschnitt-TissueTec®-Präparat
QS Frucht Übersicht / Schnittdicke: 30 μm

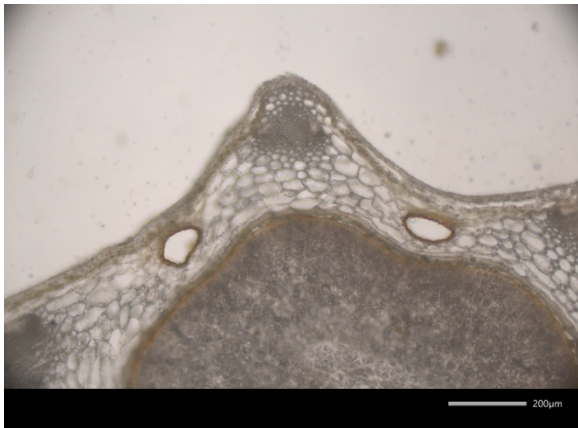


Abbildung 128: Kryoschnitt-TissueTec®-Präparat
QS Frucht Leitbündel / Schnittdicke: 60 μm

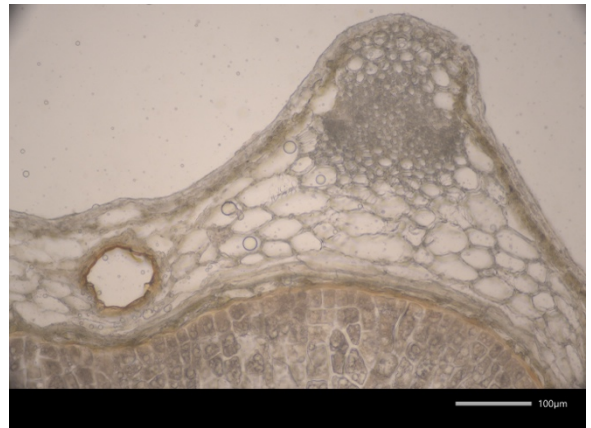


Abbildung 129: Kryoschnitt-TissueTec®-Präparat
QS Frucht Leitbündel / Schnittdicke: 30 μm

3.13 *Acorus calamus* L.; Kalmus; Wurzel

Organ: Radix; Wurzel

Familie: Acoraceae; Kalmusgewächse

Die untersuchten Wurzeln von *Acorus calamus* waren 1,5 cm lang mit einem Durchmesser von 0,5 cm $\varnothing$. Positivkontrollen in Form von Wasser- und Chloralhydrat-Präparaten wurden angefertigt. Für die Kryosektion wurde die Wurzel sowohl in CMC-Gel (s. Abbildung 137, S. 70) eingebettet als auch ohne Einbettung (s. Abbildungen 138 und 139, S. 70) geschnitten.

3.13.1 Anatomie

Im Wasserpräparat ist die Stärke gleichmäßig in der Wurzel verteilt und gibt dem Querschnitt seine graue Farbe (s. Abbildungen 130-133, S. 69). Die einzelnen Körner erscheinen rundlich-oval und sind selten zu zwei bis vier zusammengesetzt. In den Zellen selbst sind sie zu größeren Aggregaten zusammengelagert (s. Abbildung 133, S. 69). An der Außenseite findet sich eine einzellreihige Epidermis (s. Abbildung 131, S. 69), welche von einer dünnen Kollenchym-Schicht (Rahfeld, 2011) gefolgt wird. Direkt darunter liegt das getüpfelte Aerenchym (s. Abbildung 133, S. 69), welches den Großteil des Querschnitts ausmacht und durch seine großen Interzellularräume gekennzeichnet ist. Die Interzellularen erscheinen klein und dreieckig. Innerhalb dieses Gewebes sind vereinzelt hell schimmernde, braun gefüllte Zellen zu sehen, bei denen es sich um große Ölioblasten handelt. Um den Zentralzylinder erkennt man die einzellreihige Endodermis gefolgt vom Perizykel (s. Abbildung 136, S. 70).

3.13.2 Positivkontrolle

3.13.2.1 Wasserpräparat

Der hohe Stärkeanteil lässt die Wurzel im Wasserpräparat dunkel erscheinen und erschwert die mikroskopische Beschreibung. Außerdem bilden sich unter dem Deckglas zahlreiche Luftblasen, welche ähnlich wie beim Fenchel (s. Kapitel 3.12.2.1, S. 61) entfernt werden.

3.13.2.2 Chloralhydrat-Präparat

Die Auflösung der Stärke durch Chloralhydrat lässt den gesamten Wurzelquerschnitt verblassen und vereinfacht die Beschreibung der Anatomie. Das Abschlussgewebe und der Zentralzylinder erscheinen braun-grünlich (s. Abbildungen 134-136, S. 69-70).

3.13.3 Kryoschnitt

Für die Wurzeln von *Acorus calamus* wurden zwei unterschiedliche Präparationsansätze verfolgt. Zum einen erfolgte vor dem Schneiden eine Einbettung in 5% und 10% CMC-Gel (s. Abbildungen 138 und 139, S. 70). Es stellte sich heraus, dass die hellen Querschnitte durch die Einbettung auf dem silbernen Plateau des Kryostat-Mikrotoms kaum erkennbar sind. Dem ist hinzuzufügen, dass die Schnitte instabil und porös waren. Zum anderen wurden die Pflanzenproben ohne Einbettung mit Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound auf dem Stempel des Kryotoms befestigt und geschnitten (s. Abbildung 137, S. 70). Hierbei zeigte sich, dass ein Schnittbereich zwischen 20 und 80 µm möglich war, wobei positive Resultate zwischen 50 und 80 µm festgestellt wurden. Dickere Schnitte ermöglichten die Abbildung des gesamten Querschnitts und zeigten eine höhere Stabilität gegenüber Schnitten unter 50 µm. Hinzu kommt, dass das Aerenchym bei dünneren Schnitten oft einriss. Abschließend ist zu sagen, dass die nicht-eingebetteten Wurzeln von *Acorus calamus* für die Gefrierschnittanfertigung geeignet sind.

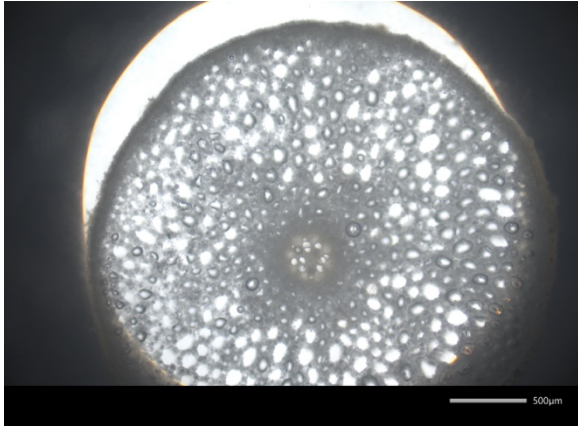


Abbildung 130: Wasserpräparat
QS Wurzel Übersicht

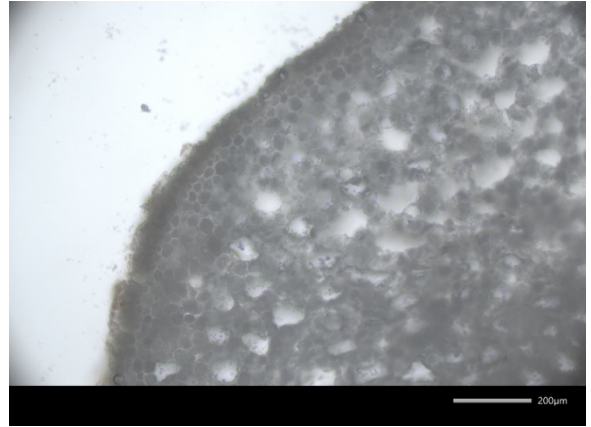


Abbildung 131: Wasserpräparat
QS Wurzel Aerenchym



Abbildung 132: Wasserpräparat
QS Wurzel Zentralzylinder

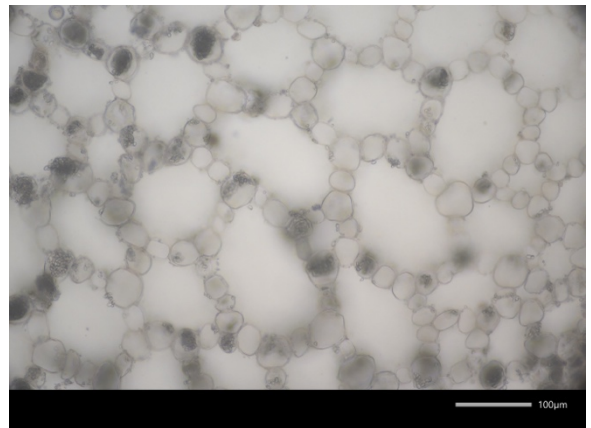


Abbildung 133: Wasserpräparat
QS Wurzel Aerenchym

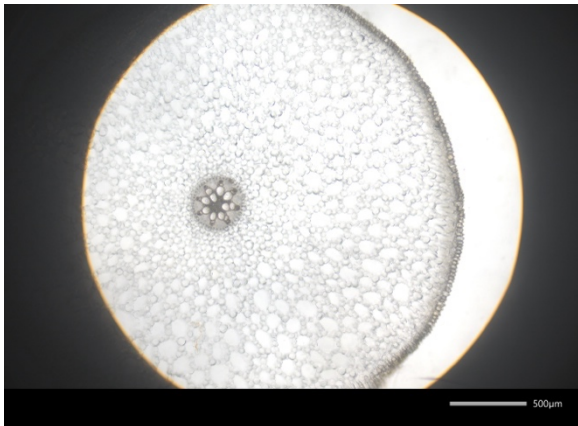


Abbildung 134: Chloralhydrat-Präparat
QS Wurzel Übersicht

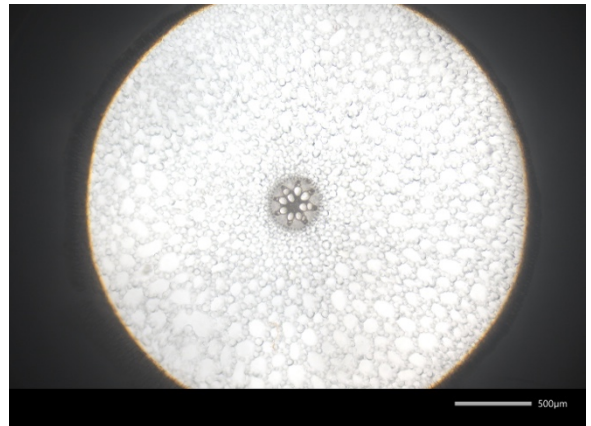


Abbildung 135: Chloralhydrat-Präparat
QS Wurzel Übersicht

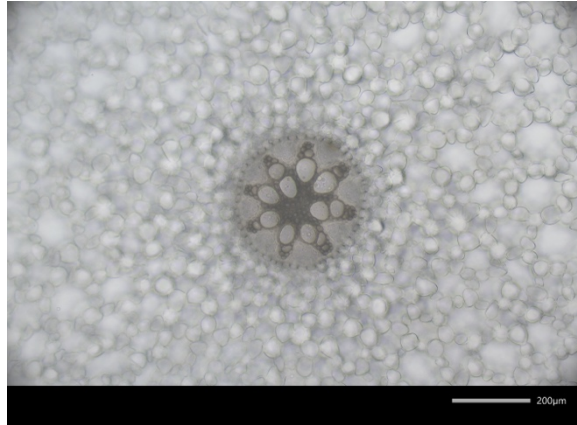


Abbildung 136: Chloralhydrat-Präparat
QS Wurzel Zentralzylinder

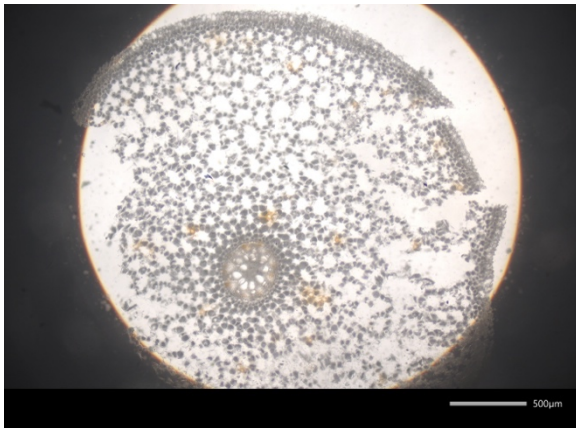


Abbildung 137: Kryoschnitt-CMC-Präparat
QS Wurzel Übersicht / Schnittdicke: 80 μm

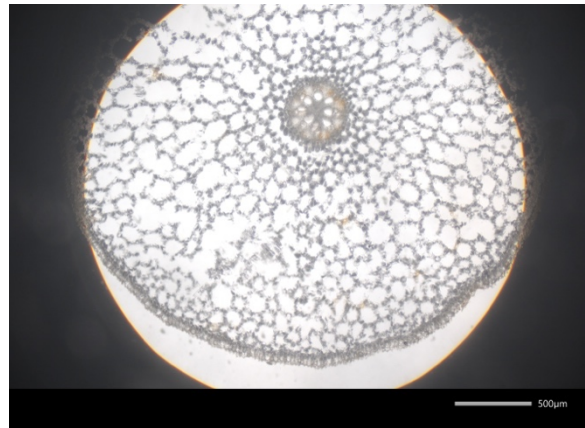


Abbildung 138: Kryoschnitt-Präparat ohne Einbettung
QS Wurzel Übersicht / Schnittdicke: 70 μm

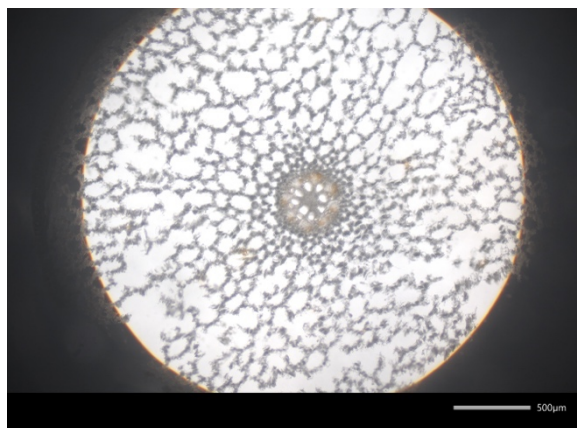


Abbildung 139: Kryoschnitt-Präparat ohne Einbettung
QS Wurzel Übersicht / Schnittdicke: 80 μm

3.14 *Ruscus aculeatus* L.; Stechender Mäusedorn; Wurzel

Organ: Radix; Wurzel

Familie: Asparagaceae (Spargelgewächse)

Die Stücke der Wurzeln von *Ruscus aculeatus* waren 1,5 cm lang mit einem Durchmesser von 0,5 cm $\varnothing$ und wurden zuerst in Wasser und Chloralhydrat untersucht. Am Kryostat-Mikrotom wurden ohne Einbettung (s. Abbildungen 152-158, S. 75-76) und in CMC-Gel eingebettet (s. Abbildungen 150 und 151, S. 75) Schnitte angefertigt.

3.14.1 Anatomie

Das primäre Abschlussgewebe der Wurzel bildet die einzellreihige Rhizodermis mit zugespitzten braun-grauen Wurzelhaaren, die teilweise abgebrochen oder verdreht sind. Darunter befinden sich die Parenchymzellen der primären Rinde. Diese sind verdickt, perlschnurartig getüpfelt und weisen dreieckige Interzellularen auf (s. Abbildung 141, S. 73). Die Tüpfel selbst sind oval bis rundlich geformt. In der primären Rinde liegen Raphidenbündel aus Ca-Oxalat in dünnwandigen Idioblasten (s. Abbildung 148, S. 74). Die darauffolgende tertiäre Endodermis ist U-förmig verdickt mit Durchlasszellen. Im Zentralzylinder liegt ein radiär polyarches Leitbündel mit zahlreichen Xylembereichen, bestehend aus Tracheen und Tracheiden, die alternierend mit Phloembereichen an der Innenseite der Endodermis entlang verlaufen (s. Abbildungen 142 und 149, S. 73-74). Im Zentrum des Zentralzylinders befindet sich Parenchymgewebe.

3.14.2 Positivkontrolle

3.14.2.1 Wasserpräparat

Mit Ausnahme der braun-grau gefärbten Rhizodermis ist der Aufbau des Wurzelgewebes bereits im Wasserpräparat klar ersichtlich (s. Abbildungen 140-145, S. 73).

3.14.2.2 Chloralhydrat-Präparat

Das Aufkochen im Chloralhydrat färbt die Rhizodermis hellbraun. Ansonsten bleibt der Querschnitt im Vergleich zum Wasserpräparat unverändert (s. Abbildungen 146-149, S. 74).

3.14.3 Kryoschnitt

Die Präparation des Mäusedorn ähnelte den bisherigen Wurzelproben (s. Kapitel 3.5.3 und 3.13.3, S. 28 und 68). Auch in diesem Fall sorgte die Einbettung in 5% und 10% CMC-Gel für eine verminderte Schnittqualität, wobei Querschnitte zwischen 50 und 80 μm akzeptabel waren (s. Abbildungen 150 und 151, S. 75). Im Gegensatz dazu lieferte das Schneiden der nicht eingebetteten Proben im Bereich von 40 bis 80 μm vielversprechende Resultate (s. Abbildungen 152-158, S. 75-76). Obwohl in der primären Rinde oft Risse entstanden, blieben die wesentlichen Strukturen der Wurzel ausreichend erhalten. Mit der schrittweisen Reduktion der Dicke unter 40 μm nahm auch die Qualität der Wurzelquerschnitte ab (s. Abbildung 152, S. 75). Daraus ergibt sich, dass der eingebettete Mäusedorn für die Kryosektion geeignet ist, wenn die oben angegebenen Schnittdicken (40 bis 80 μm) eingehalten werden.

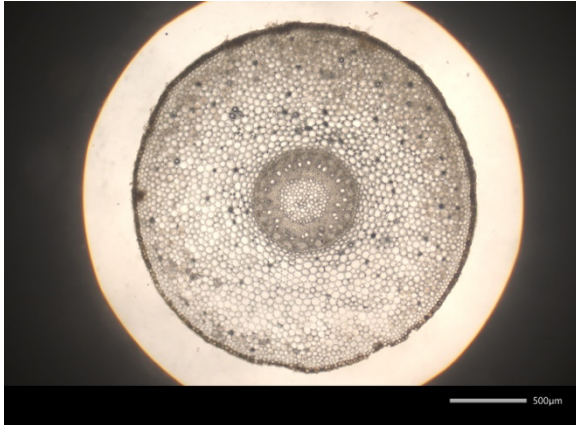


Abbildung 140: Wasserpräparat
QS Wurzel Übersicht

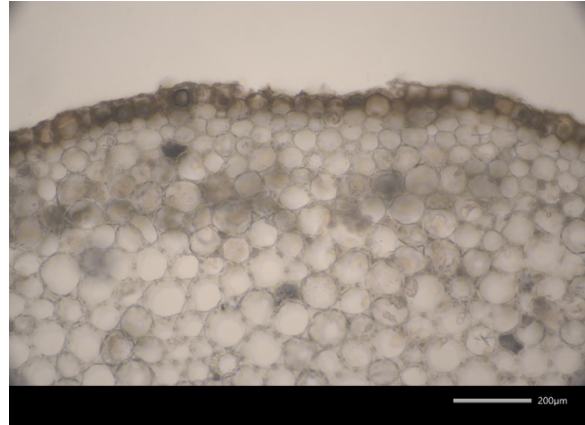


Abbildung 141: Wasserpräparat
QS Wurzel Rhizodermis und darauffolgend Parenchym

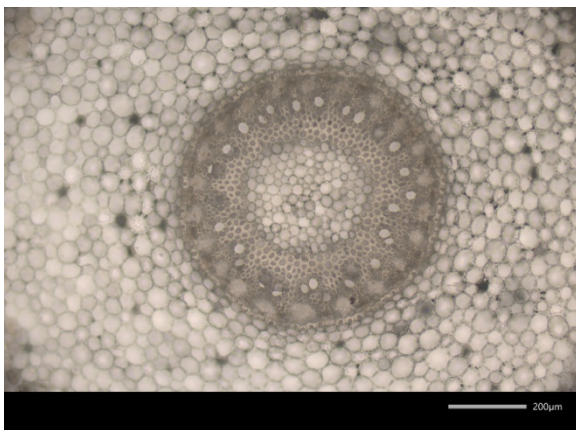


Abbildung 142: Wasserpräparat
QS Wurzel Zentralzylinder

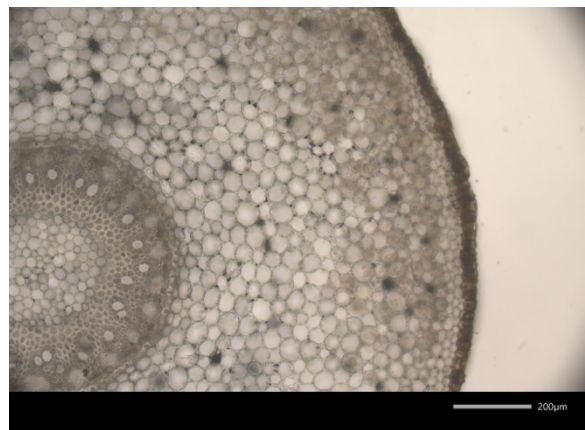


Abbildung 143: Wasserpräparat
QS Wurzel Übersicht

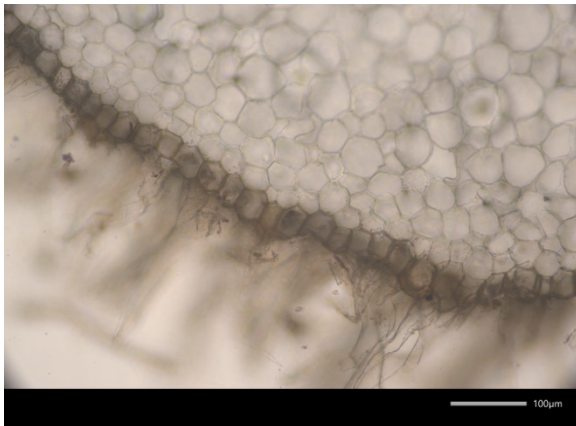


Abbildung 144: Wasserpräparat
QS Wurzel Rhizodermis mit Wurzelhaaren

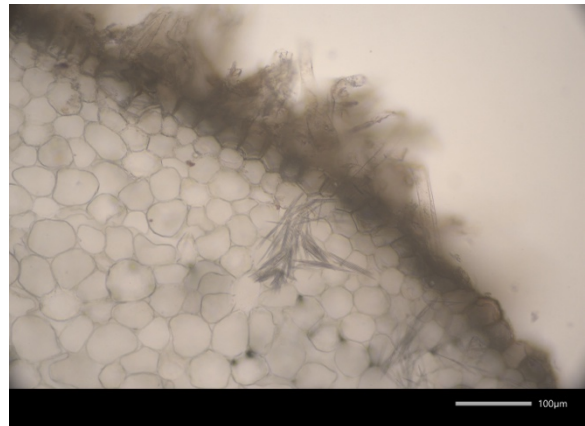


Abbildung 145: Wasserpräparat
QS Wurzel Rhizodermis mit Wurzelhaaren

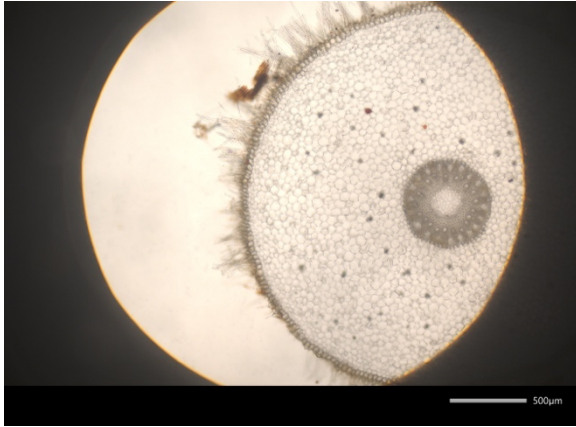


Abbildung 146: Chloralhydrat-Präparat
QS Wurzel Übersicht

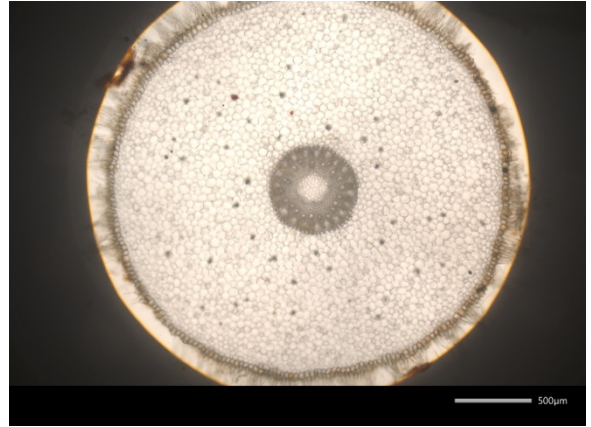


Abbildung 147: Chloralhydrat-Präparat
QS Wurzel Übersicht

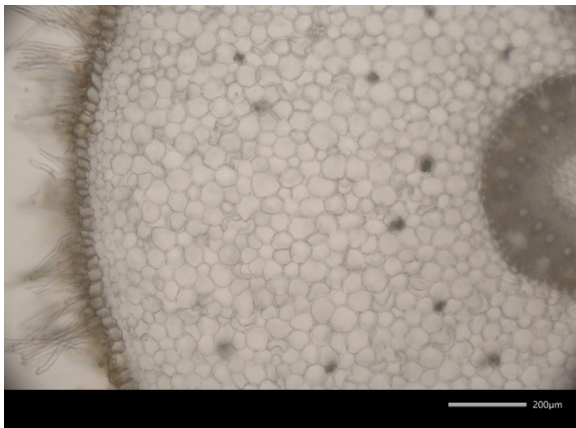


Abbildung 148: Chloralhydrat-Präparat
QS Wurzel Parenchym

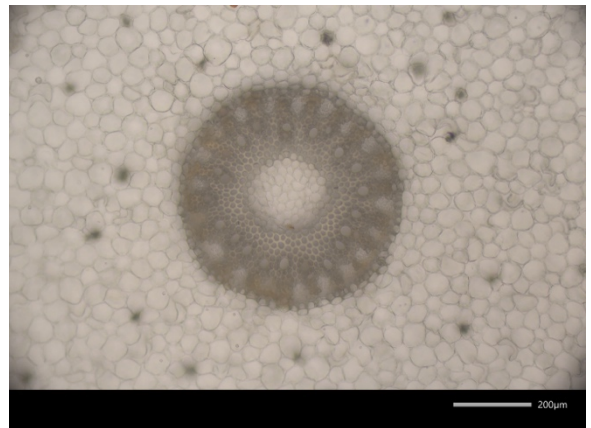


Abbildung 149: Chloralhydrat-Präparat
QS Wurzel Zentralzylinder

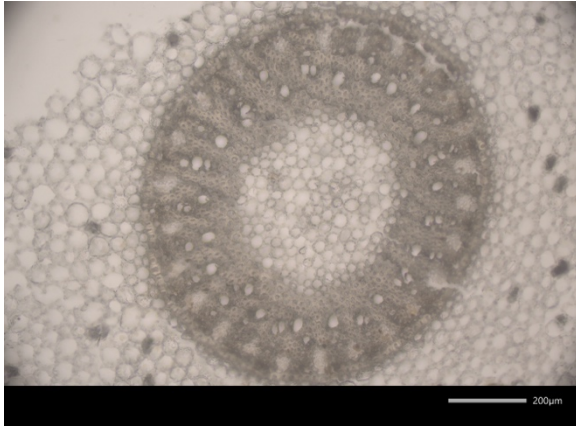


Abbildung 150: Kryoschnitt-CMC-Präparat
QS Wurzel Zentralzylinder / Schnittdicke: 80 μm

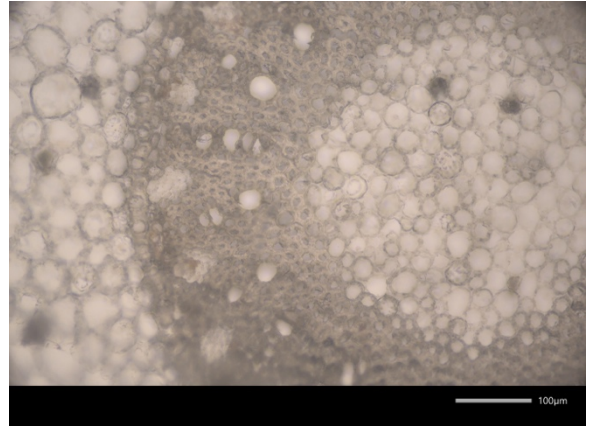


Abbildung 151: Kryoschnitt-CMC-Präparat
QS Wurzel Zentralzylinder / Schnittdicke: 60 μm

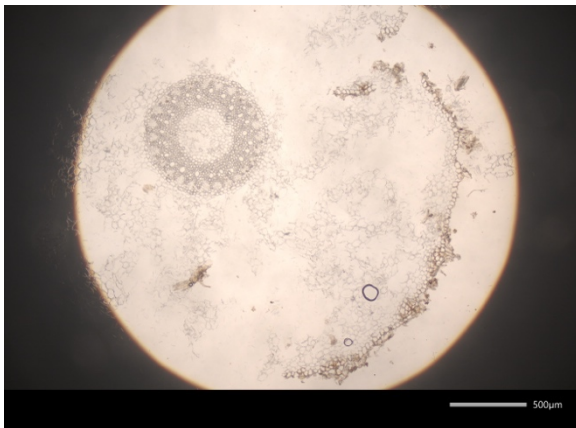


Abbildung 152: Kryoschnitt-Präparat ohne Einbettung
QS Wurzel Übersicht / Schnittdicke: 30 μm

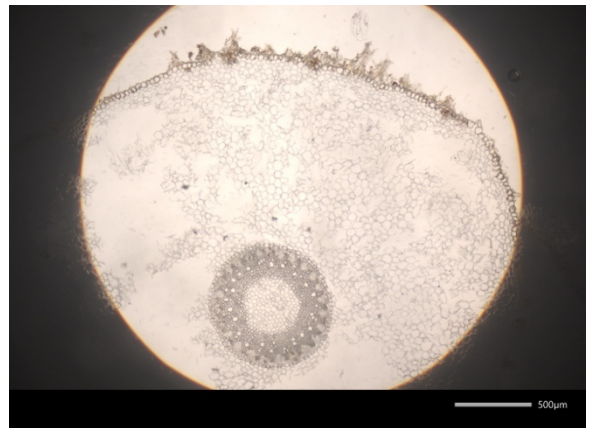


Abbildung 153: Kryoschnitt-Präparat ohne Einbettung
QS Wurzel Übersicht / Schnittdicke: 50 μm

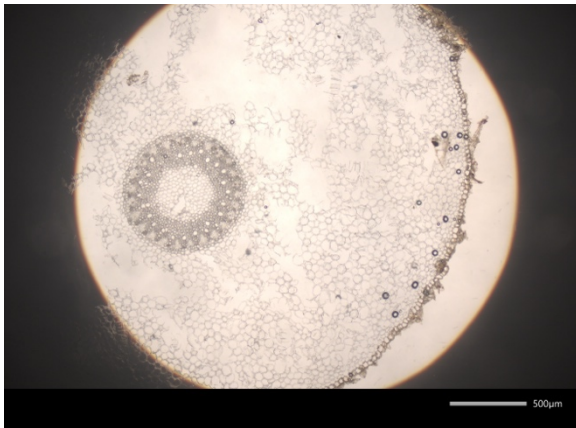


Abbildung 154: Kryoschnitt-Präparat ohne Einbettung
QS Wurzel Übersicht / Schnittdicke: 60 μm

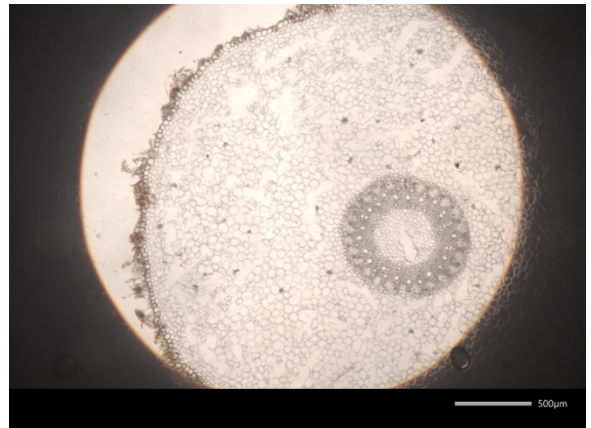


Abbildung 155: Kryoschnitt-Präparat ohne Einbettung
QS Wurzel Übersicht / Schnittdicke: 70 μm

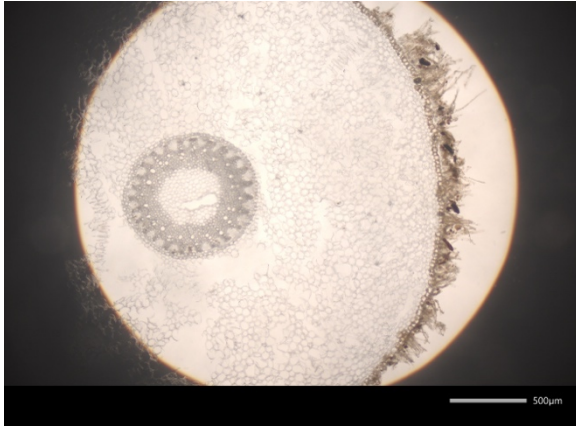


Abbildung 156: Kryoschnitt-Präparat ohne Einbettung
QS Wurzel Übersicht / Schnittdicke: 80 μm

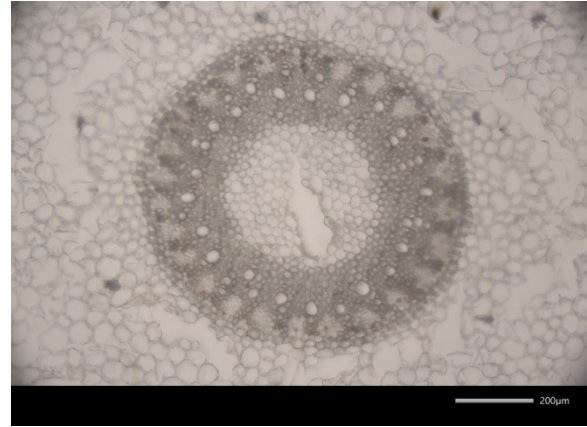


Abbildung 157: Kryoschnitt-Präparat ohne Einbettung
QS Wurzel Zentralzylinder / Schnittdicke: 70 μm

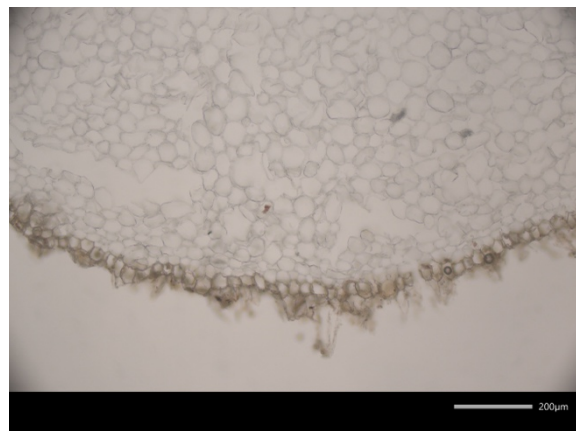


Abbildung 158: Kryoschnitt-Präparat ohne Einbettung
QS Wurzel Rhizodermis mit Wurzelhaaren / Schnittdicke: 80 μm

4 Diskussion

Im Rahmen dieser Masterarbeit sollten gegenwärtige Strategien optimiert werden, die die Kryosektion gefrorener Pflanzen erleichtern, um eine geeignete Grundlage für eine mögliche nachfolgende MALDI-MS-Analyse zu schaffen. Obwohl es sich hierbei in der Human- und Tierhistologie um eine bereits etablierte Methodik handelt, sind die verfügbaren Informationen in der Pflanzenforschung noch limitiert. Daher wurden unterschiedliche Pflanzenorgane und verschiedenste Pflanzenarten untersucht, um spezifische Anpassungen für die individuellen Anforderungen des Probenmaterials zu erarbeiten. Es wurde das Ziel verfolgt, letztlich Methoden zu entwickeln, die zu einer verallgemeinerten Arbeitsvorschrift zusammengefasst werden können. Dies erscheint jedoch fraglich, da im Laufe der Experimente deutlich wurde, dass einer umfassenden Implementierung der Technik noch Hürden im Weg stehen.

Für die praktische Arbeit wurde bewusst Probenmaterial verwendet, das am Institut in ausreichender Menge vorhanden war, um eine Replikation der Versuche mit denselben Pflanzen sicherzustellen. Zudem sollten auch unterschiedliche Organe – Blätter, Wurzeln und Früchte – sowie eine Vielfalt an Pflanzenarten berücksichtigt werden. An dieser Stelle ist hinzuzufügen, dass Blüten aufgrund des Zeitfaktors und Sprosse aufgrund ihrer ähnlichen Beschaffenheit zu Wurzeln bewusst von der Untersuchung ausgeschlossen wurden. Allerdings wurde versucht, ein möglichst großes Spektrum an unterschiedlichen Pflanzen mit einer Vielfalt an haptischen Eigenschaften abzudecken. Ferner war es wichtig – mit der Ausnahme von *Piper ornatum* –, dass die Inhaltsstoffe weitgehend bekannt sind.

Ein wichtiger Aspekt, der zuerst genauer untersucht werden musste, war die Suche nach einem geeigneten Einbettungsmedium, das für einen Teil der Pflanzenorgane beim Schneideprozess essenziell war. Unter Berücksichtigung der Literatur wurde schnell festgestellt, dass der Histologie-Standard Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound, der in der Human- und Tierforschung am Kryostat-Mikrotom häufig eingesetzt wird, aufgrund seiner störenden Wirkung bei einer potenziell nachfolgenden MALDI-Analyse ungeeignet ist (Kaspar et al., 2011). Aus diesem Grund wurde zunächst mit denaturiertem Albumin aus Eiern gearbeitet, da dieses in der Studie von Schmidt (2018) bereits erfolgreich eingesetzt wurde. Dabei ergaben sich zahlreiche Schwierigkeiten. Zum einen war der Kochvorgang zeitaufwändig, das Eigelb störend und das

Ergebnis inhomogen. Zum anderen handelt es sich um ein filigranes Medium, das zur Rissbildung neigt. Problematisch war auch, dass für den Einfrierprozess keine geeignete Form zur Verfügung stand, um das Eiweiß vor dem direkten Kontakt mit flüssigem Stickstoff zu schützen. Aus diesem Grund wurde versucht, das Albumin in Cellophan oder Alufolie einzuwickeln. Zwar zeigte diese Vorgehensweise Erfolg, brachte jedoch einen zusätzlichen Arbeitsschritt mit sich. Nach der Anfertigung zahlreicher Kryoschnitte stellte sich heraus, dass das Medium den Schneidevorgang sowie die mikroskopische Untersuchung störte. Angesichts unzureichender Ergebnisse und fehlender Nachhaltigkeit wurde Albumin als Einbettungsmedium schließlich verworfen.

Wie in der Arbeit von Dong (2016) beschrieben, stellte sich das Einbettungsmedium CMC als eine vielversprechende Alternative heraus. Die Grundlage hierfür bildet die zeiteffizientere Herstellung und die längere Haltbarkeit im Vergleich zu Albumin. Anders als in der Literatur wurden von Anfang an jedoch höhere Konzentrationen CMC-Gel, nämlich 5% und 10%, für die Einbettung verwendet. In zahlreichen Versuchen konnte jedoch gezeigt werden, dass bereits 5% ausreichen, um den Pflanzen ein stabiles Einbettungsmedium zu bieten. Hinzu kommt, dass höhere Konzentrationen eventuell die Quellung des Pulvers erschweren und ungelöste Partikel einen Störfaktor für die MALDI-MS-Analyse darstellen könnten. Eine Fragestellung, die noch weiterer Untersuchungen bedarf, ist, inwiefern der hohe Wassergehalt zu einer erhöhten Sprödigkeit der Probenwürfel geführt hat, da dies einen negativen Einfluss auf den Schneideprozess hatte. Trotz dieser offenen Frage kann Carmellose jedoch als geeignetes Medium betrachtet werden und bietet eine solide Grundlage für zukünftige Forschungsarbeiten.

Anhand vorheriger Studien wurde nachgewiesen, dass sich das Einfrieren des Probenmaterials in flüssigem Stickstoff vor dem Schneiden als besonders effektiv erweist, da die schnelle Abkühlung wesentlich zum Erhalt der Gewebestruktur beiträgt. Man muss dabei jedoch berücksichtigen, dass es sich um einen zentralen Arbeitsschritt in der Probenvorbereitung handelt und eine fehlerhafte Ausführung einen beträchtlichen Einfluss auf die Qualität der Ergebnisse hat. Um den Kontakt des Probenmaterials mit dem flüssigen Stickstoff zu verhindern, kamen Falcon-Tubes für Wurzelgewebe und Waterdrop®-Plastikwürfel für Blätter und Früchte zum Einsatz. Im Laufe dieser praktischen Arbeit konnte bestätigt werden, dass das

Einfrieren der Proben ein nicht zu vernachlässigender Arbeitsschritt in der Probenvorbereitung ist, der durch die Verwendung spezieller Waterdrop®-Plastikwürfel optimiert werden konnte, da diese die Handhabung der eingebetteten Proben erheblich erleichterten.

Man sollte außerdem bedenken, dass die Aufrechterhaltung der Kühlkette eine zentrale Rolle in der Probenvorbereitung einnimmt, da eine Unterbrechung unter anderem enzymatische Reaktionen und Veränderungen in der Zelle begünstigen könnte. Um dieses Risiko auf ein Minimum zu reduzieren, wurde zügiges Arbeiten vorausgesetzt. Einerseits wurden die Präparate nach dem Einfrieren innerhalb kürzester Zeit in eine vorgekühlte Styroporbox zum Tiefkühler gebracht. Andererseits erfolgte nach der Lagerung bei -20 °C der schnelle Transport zum Kryostat-Mikrotom in derselben Box, um eine durchgängige Kühlung zu gewährleisten. An dieser Stelle ist anzumerken, dass die Kühlkette für die mikroskopische Untersuchung nach der Kryosektion absichtlich unterbrochen wurde, um die Qualität der Proben zu beurteilen. Dieser Schritt unterscheidet sich von der herkömmlichen Probenvorbereitung für die MALDI-MS, da in dieser Arbeit nur der erste Aspekt, die Kryosektion, beleuchtet werden soll.

Als Beispiel soll hier das Blatt *Piper ornatum* dienen. Während des Schneideprozesses am Kryostat-Mikrotom war der pinke Farbstoff in der Hypodermis noch sichtbar, wohingegen er unter dem Mikroskop bei Raumtemperatur innerhalb von Minuten verschwand. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der schnelle Temperaturwechsel, die Exposition gegenüber Luftsauerstoff und die unzureichende Aufrechterhaltung der Kühlkette den Verlust des Farbstoffs verursachen könnten. Die weiter oben beschriebenen Experimente (s. Abschnitt „Untersuchungen hinsichtlich des Farbstoffes“, S. 48) wurden in einem Exsikkator durchgeführt, um das Risiko anderer Reaktionen innerhalb des Blattes zu minimieren. Angesichts dieser Ergebnisse liegt die Schlussfolgerung nahe, dass der Farbstoff in größeren Blättern aufgrund der langsameren Auftaugeschwindigkeit länger erhalten blieb. Dies unterstreicht die anfängliche Hypothese, dass der Farbstoffverlust auf die Unterbrechung der Kühlkette zurückzuführen ist. Darüber hinaus verdeutlicht das Experiment die hohe Relevanz einer durchgängigen Kühlung während der Kryopräparation, um die Homogenität der Proben zu gewährleisten und eine allfällige Artefaktbildung hintan zu halten. Hier ist kritisch anzumerken, dass es sich um eine theoretische Annahme handelt, die bisher durch keine Studien belegt wurde und genauere Untersuchungen erfordert.

Ein zusätzlicher Aspekt, der berücksichtigt werden sollte, ist die präzise Handhabung des Kryostat-Mikrotoms. Nachdem die Proben mit Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound auf den Stempeln befestigt wurden, mussten die Präparate in der Vorrichtung fixiert werden. Da die Positionierung bei diesem Gerät manuell erfolgte, musste besonders darauf geachtet werden, die Präparate gerade und mittig einzuspannen, sodass die Klinge entlang der Oberfläche gleiten kann. Dabei sollte nicht außer Acht gelassen werden, dass die Positionen nicht immer auf den Millimeter genau reproduzierbar sind und eine gewisse Variabilität in der Schnittqualität begünstigen kann. Insbesondere die Einstellung des Klingenwinkels, die Geschwindigkeit der Bewegung und der ausgeübte Druck hatten eine erhebliche Auswirkung auf die Qualität der Ergebnisse. In Zukunft könnte untersucht werden, ob eine Automatisierung des Prozesses realisierbar ist, um diese Fehlerquelle auf ein Minimum zu reduzieren.

Im Rahmen der Untersuchung konnte herausgefunden werden, dass auch die Bestimmung der optimalen Schnittdicke ein sehr zeitintensiver Prozess ist. Um zu einem optimalen Ergebnis zu kommen, wurde ein breites Spektrum an Schnittdicken ausprobiert. Der Ausgangspunkt war 100 µm und die Dicke wurde schrittweise um 5 µm herabgesetzt, bis die resultierenden Querschnitte unter dem Mikroskop nicht mehr den Anforderungen der MALDI-MS-Analyse entsprachen. Anders als in der Human- und Tierforschung, wo sehr dünne Schnitte (5-10 µm) der Norm angehören, lieferte dies für Pflanzengewebe keine positiven Resultate. Im Allgemeinen zeigt sich, dass Wurzelgewebe in einem höheren Mikrometerbereich (40-80 µm, vereinzelt auch darüber) bessere Ergebnisse bringt, wohingegen die Schnittdicke von Früchten und Blättern auch darunter liegen kann (30-70 µm). Begründen könnte man dies durch das Einbettungsmedium, welches den Pflanzenproben eine erhöhte Stabilität bietet. Das gilt jedoch nicht für die *Aloe vera*, bei der Schnittdicken von über 90 µm nötig waren. Daraus ergibt sich, dass jede Pflanze individuell betrachtet werden muss, da die Anforderungen mit der Beschaffenheit des Gewebes stark schwanken. Aus den Ergebnissen lassen sich zwar bestimmte Tendenzen ableiten, trotzdem war eine Verallgemeinerung der Schnittdicken nicht möglich. Es lässt sich daraus schließen, dass Wurzeln und Sprosse ohne Einbettungsmedium geschnitten werden sollten, während eine Stabilisierung durch CMC-Gel für Blätter und Früchte zu empfehlen ist. Weiters wird für zukünftige Studien eine individuelle Anpassung der Arbeitsansätze vorgeschlagen.

Ein zusätzlicher Aspekt ist die Reproduzierbarkeit der Pflanzenschnitte, was bei den meisten Proben zu Schwierigkeiten führte. Eine erfolgreiche Analyse mit der MALDI-MS setzt die Herstellung von Serienschnitten voraus, da nur so sichergestellt werden kann, dass der gesuchte Inhaltsstoff in den Zielzellen noch vorhanden ist. Das folgende Beispiel kann die Problematik belegen: *Eucalyptus globulus* und die Darstellung des ätherischen Öls. Hier muss ergänzt werden, dass die angefertigten Schnitte aufgrund ihrer Größe häufig auf dem silbernen Plateau des Mikrotoms verloren gingen. Daher erfordert der Schneidevorgang eine noch präzisere Steuerung, um definierte Zielgewebe in die MALDI-MS-Analyse zu integrieren. Wünschenswert wäre es, durch die mikroskopische Untersuchung der entstandenen Querschnitte zu überprüfen, wie tief man in den Zellschichten vorgedrungen ist, um den nachfolgenden Schnitt direkt für die Massenspektrometrie vorzubereiten.

Ein weiterer Punkt, auf den in dieser Arbeit aus zeitlichen Gründen nicht eingegangen werden konnte, ist der Einfluss der Kammertemperatur auf die Qualität der Schnitte. Hierbei handelt es sich um einen gründlich beleuchteten Parameter der Tier- und Humanhistologie. Zahlreiche Studien belegen, dass für Gewebeschnitte des Gehirns eine Temperatur von -20 °C verwendet wird (Paul et al., 2008; Son et al., 2018; Paletzki & Gerfen, 2019; Ross et al., 2022). Die Studie von Paletzki (2019) betont jedoch, dass die optimale Temperatur gewebeabhängig ist und an die spezifischen Gegebenheiten angepasst werden muss. Auch die Forschungsgruppe von Son (2018) zeigt, dass sowohl die Gewebezusammensetzung als auch die Luftfeuchtigkeit Einfluss auf die Schnitttemperatur nehmen können und während des Prozesses experimentiert werden muss. Bei Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass eine Deformation der Schnitte auf eine zu warme Temperatur zurückzuführen ist, während eine zunehmende Porosität darauf hinweist, dass zu kalt gearbeitet wurde. Zudem muss bei der Adjustierung der Kammertemperatur der Fettgehalt des Gewebes berücksichtigt werden. Lipidreiche Gewebe wie das Gehirn lassen sich besser bei Temperaturen von ca. -22 bis -25 °C schneiden, während Gewebe mit geringem Fettgehalt, wie die Zunge, bereits bei -18 bis -19 °C zufriedenstellende Ergebnisse liefern (Ross et al., 2022). Auch die Untersuchungen von Goodwin (2012) bestätigen diese Ergebnisse und geben eine optimale Kammertemperatur zwischen -16 und -26 °C an. Bei der Betrachtung von pflanzlichem Gewebe ist die Forschungslage weniger umfassend. In der Studie von Schmidt (2018) wurde eine Temperatur von -20 °C gewählt, was als Ausgangspunkt der hier durchgeführten Experimente diente. Die genannten Ergebnisse zeigen Parallelen zu

Peukert (2014). Zwar wurde die Kryosektion von Wurzeln in dieser Studie überwiegend bei -20 °C durchgeführt, aber es wurde festgestellt, dass höhere Temperaturen sich bei fragileren Pflanzen positiv auf die Schnittqualität auswirken könnten. Darüber hinaus sollte die Temperatur bei flexiblen nicht-eingebetteten Pflanzen weiter reduziert werden. In den durchgeführten Versuchen war die Kammertemperatur konstant auf -20 °C eingestellt. Es ist fraglich, ob eine Reduktion der Kammertemperatur Einfluss auf die physikalischen Eigenschaften und die Sprödigkeit des CMC-Gels nimmt. Ferner muss geklärt werden, ob dies dann auch enzymatische Reaktionen oder Veränderungen im Probenmaterial hervorrufen könnte. Diese Arbeit kann keine endgültige Antwort geben, aber in zukünftigen Studien sollte untersucht werden, welchen Einfluss Temperaturveränderungen auf die Pflanzen bzw. auf das Einbettungsmedium haben, da auch in der Human- und Tierhistologie individuelle Anpassungen erfolgen.

Im Zuge der Literaturrecherche konnten nur wenige vergleichbare Publikationen gefunden werden. Die meisten vorhandenen Forschungsarbeiten behandeln die Tier- und Humanhistologie, wobei die Methodik nicht vollständig auf die Pflanzenhistologie übertragen werden kann. Als Grundlage dienten Arbeitsvorschriften zur Kryoschnitt-Technik (z.B. Ross 2022) sowie Studien zur Probenvorbereitung in der Pflanzenforschung, welche allerdings Einschränkungen aufwiesen (Dong 2016; Schmidt 2018,). Die Forschungsgruppe von Schmidt (2018) nutzt ein anderes Massenspektrometrie-Gerät, nämlich ein MALDI-FT-ICR-MS, während die entwickelte Probenvorbereitung für das MALDI-TOF-MS ausgelegt ist. Außerdem wurden in dieser Arbeit gezielt cyanogene Glycoside analysiert, wobei es sich um eine sehr spezifische Fragestellung handelt. Die Probenvorbereitung sowie die Herstellung der Kryoschnitte wurde nur oberflächlich behandelt und es erfolgte weder ein Vergleich unterschiedlicher Präparationsmethoden noch eine ausführliche Begründung für die gewählten Schnittdicken. Darüber hinaus wurde denaturiertes Albumin als Einbettungsmedium gewählt, was sich in dieser Arbeit, wie bereits weiter oben beschrieben, als ineffizient erwiesen hat. Dennoch diente die Studie von Schmidt (2018) als eine sinnvolle Orientierung, da sie verschiedene Einbettungsmedien auflistet, eine funktionierende Einfriertechnik aufzeigt und Hinweise liefert, dass Wurzeln und Sprosse keine Einbettung benötigen. Für die Weiterentwicklung dieser Methodik kann auf diese Studie zurückgegriffen werden, da sie sich ebenfalls mit der Matrix-Applikation und der MALDI-MS-Analyse umfassend auseinandersetzt. Ähnliches zeigt

sich auch in der Übersichtsarbeit von Kaspar (2011), die sich zwar auf die MALDI-MS-Technik konzentriert, aber die Herausforderungen der Schnittpräparation von Pflanzen nur kurz thematisiert. Dadurch entsteht der Eindruck, dass die Probenvorbereitung ein einfacher Schritt dieser Methodik ist, während die vorliegende Arbeit aufzeigt, dass dieser Arbeitsprozess in der Praxis sehr anspruchsvoll ist und individuell an die jeweilige Pflanze angepasst werden muss. In seinem Review weist Dong (2016) auf die Probleme der Pflanzenhistologie im Vergleich zur Human- und Tierhistologie hin und führt detaillierte Beschreibungen zur Lagerung, zum Schneideprozess und zu Mounting-Techniken an. Allerdings fehlt auch hier eine präzise Auseinandersetzung mit den individuellen Unterschieden der Pflanzenorgane. Stattdessen konzentriert sich Forschungsarbeit auf die Analyse unterschiedlicher Stoffgruppen in der MALDI-MS. Alles in allem zeigt sich, dass die vorhandenen Publikationen die Matrix-Applikation und die Analyse mittels MALDI-MS in den Vordergrund stellen, während die Kryosektion eine untergeordnete Rolle einnimmt. Dem ist hinzuzufügen, dass sich die existierende Forschung nur im geringen Maße mit den unterschiedlichen Pflanzenorganen – Blätter, Wurzeln, Sprosse und Früchte – auseinandersetzt. Ebenfalls gibt es keine Studie, welche Positivkontrollen in Form von Handschnitten mit den angefertigten Kryoschnitten vergleicht.

Im Fokus dieser Arbeit stand die Analyse der Unterschiede in der Kryosektion zwischen der Human- und Tierhistologie verglichen mit der Pflanzenhistologie. Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde im praktischen Teil eine Methodik entwickelt und umgesetzt. Die Untersuchung zeigte, dass über die pflanzliche Probenvorbereitung deutlich weniger bekannt ist als über die Human- und Tierhistologie. Als Beispiele dienen hier insbesondere die Wahl des Einbettungsmediums, die Temperatureinstellung und die individuelle Anpassung der Schnittdicke an unterschiedliche Pflanzenorgane. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der in dieser Arbeit optimierte Ansatz eine fundierte Basis für die zukünftige Forschung liefert, um die Methodik weiter auszubauen und eine breitere Anwendbarkeit in der Pflanzenforschung zu erzielen. Darüber hinaus bietet sie eine solide Grundlage für die darauffolgenden Schritte zur Matrix-Aufbringung und der Analyse mittels MALDI-MS.

5 Schlussfolgerung und Ausblick

Diese Arbeit legt eine fundierte Grundlage für die Optimierung der Probenvorbereitung von Kryoschnitten für die MALDI-MS-Analyse. Es konnte gezeigt werden, dass der hohe Wassergehalt, die starren Zellwände und die geringe mechanische Stabilität der Pflanzen eine vollständige Übertragung der bereits etablierten Methoden aus der Human- und Tierhistologie nicht ohne Einschränkungen zulassen. Vielmehr erfordert es eine präzise Auseinandersetzung mit den gegenwärtigen Ansätzen und sorgfältige Anpassungen.

Aus der Untersuchung ging hervor, dass unter anderem die Wahl des Einbettungsmediums und die Ermittlung der optimalen Schnittdicke viel Zeit in Anspruch nehmen und an die individuellen Gegebenheiten der Pflanze angepasst werden müssen. In dieser Arbeit erwies sich Carboxymethylcellulose als ein geeignetes Medium, das dem Probenmaterial ausreichend Stabilität bieten konnte und sich positiv auf die Qualität der Querschnitte auswirkte. Die Verwendung von flüssigem Stickstoff zum Einfrieren der Proben war besonders effektiv, um die Gewebestruktur zu erhalten und zellulären Veränderungen innerhalb der Pflanze entgegenzuwirken. Anhand zahlreicher Beispiele und unterschiedlicher Organe konnte verdeutlicht werden, dass diese weiterentwickelte Vorgehensweise die Probenvorbereitung für die MALDI-MS-Analyse ermöglicht.

Dem muss entgegengehalten werden, dass die Bestimmung der pflanzenindividuellen Schnittdicke ambivalent und komplex ist. Weiterhin macht es die Anfertigung von Serienschnitten notwendig, jeden Schnitt einer mikroskopischen Untersuchung zu unterziehen, bis die Zielzelle erreicht ist, was mit einem hohen Zeitaufwand verbunden ist.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Kryosektion bei einigen Pflanzen zu bemerkenswerten Resultaten geführt hat, wodurch auch die Strukturdarstellung im Vergleich zu Handschnitten erleichtert wurde. Folgende Beispiele verdeutlichen dies: *Foeniculum vulgare*, *Ruscus aculeatus*, *Acorus calamus*, *Eucalyptus globulus*, *Myrtus communis*, *Myrrhis odorata* und *Citrus x limon*. Daraus lässt sich schließen, dass diese Technik der Schnitthanfertigung auch eine nützliche Alternative zur Verwendung eines Rotationsmikrotoms sein könnte, da Vorbereitungsschritte, wie die Entwässerung, entfallen.

Ausgehend von den hier vorgestellten Ergebnissen könnte zukünftig an unterschiedlichen Positionen angesetzt werden, um eine weitere Optimierung der Methode zu erzielen. Es wäre in diesem Zusammenhang sinnvoll, zu untersuchen, welchen Einfluss die Kammertemperatur auf das Ergebnis hat. Weiterer Forschungsbedarf ergibt sich aus dem Vergleich unterschiedlicher Einbettungsmedien, wie zum Beispiel Gelatine. Eine wertvolle Ergänzung wäre auch die Untersuchung anderer Pflanzenarten, um mehr Erkenntnisse zu sammeln. Langfristig wäre es wünschenswert, die darauffolgenden Arbeitsschritte der Probenvorbereitung genauer zu untersuchen, um schließlich die Analyse mit der MALDI-MS durchzuführen.

6 Zusammenfassung

Bei intensiver mikroskopischer Analyse von Pflanzenorganen (Blätter, Wurzeln und andere), trifft man häufig auf mehr oder weniger auffällige Strukturen, die teilweise gut zu beschreiben aber schwer interpretierbar sind. Dabei handelt es sich z. B. um typisch gefärbte Zellen oder um Inhalte, die sich nach der Präparation während des Beobachtens verändern, wie z. B. kristalline oder amorphe Zellinhalte. Es ist anzunehmen, dass diese Beobachtungen auf eine Vielzahl von Inhaltsstoffen zurückzuführen sind, die sich in den entsprechenden Zellen befinden. Versucht man, durch Recherche in einschlägiger Literatur nähere Informationen zu den beobachteten Phänomenen zu erhalten, so findet man wenig bis keinerlei Information. Das heißt, obwohl diverse Strukturen auffällig sind, fehlen deren Beschreibung und Charakterisierung oftmals in der gängigen Literatur. Dies liegt vermutlich darin begründet, dass zwar das beobachtete Phänomen auffällig ist, aber die Erklärung, warum dieses Erscheinungsbild auftritt, schuldig geblieben werden muss, weshalb solche Strukturen erst gar nicht Erwähnung finden. Diese Wissenslücken bedürfen einer Klärung und tragen dazu bei, den anatomischen Kenntnisstand zu verbessern, um damit eventuell auch neue wissenschaftliche Ansätze für die Lokalisation von Inhaltsstoffen in bestimmten Geweben zu liefern.

In der Human- und Tierhistologie sind bereits verschiedene Methoden zur Untersuchung von Zellveränderungen, zur Lokalisation von Biomolekülen und für die Immunhistochemie etabliert, während die Forschung in der Pflanzenwelt noch in ihren Anfängen steckt. Ein möglicher Grund dafür sind die speziellen Eigenschaften pflanzlicher Gewebe, welche die Probenvorbereitung verkomplizieren. Insbesondere die starren Zellwände, der hohe Wassergehalt und die großen Vakuolen machen die Kryosektion anspruchsvoll. Die Aufgabe dieser Masterarbeit bestand darin, die Probenvorbereitung von Kryoschnitten zu erarbeiten und optimieren. Ziel war es, geeignete Methoden der Einbettung, Einfrierung, Lagerung, und Schneidetechniken zu finden, die es erlauben, solche Präparate weiterführenden Analysen wie z. B. MALDI-MS zuzuführen. Die erarbeiteten Präparationstechniken sollen die Voraussetzungen liefern dafür, dass die speziell präparierten Pflanzenschnitte mittels spezieller Bildgebungsverfahren und massenspektrometrischer Analysen vermessen werden können, um Inhaltsstoffe "in situ" zu charakterisieren bzw. identifizieren.

Dazu wurden unterschiedliche Pflanzen und Organe für die Probenvorbereitung ausgewählt (*Monstera deliciosa* – Luftwurzeln, *Ruscus aculeatus* – Wurzeln, *Acorus calamus* – Wurzeln, *Foeniculum vulgare* – Früchte, *Myrrhis odorata* – Früchte, *Aloe vera* – Blätter, *Piper ornatum* – Blätter, *Citrus x limon* – Blätter, *Myrtus communis* – Blätter, *Eucalyptus globulus* – Blätter). Zunächst wurden für jede Pflanze sogenannte „Positivkontrollen“ in Form von Wasser- und Chloralhydrat-Präparaten angefertigt. Letztendlich wurden dieselben Proben entweder ohne Einbettung oder eingebettet in Carmellose-Natrium mittels Flüssigstickstoffs eingefroren und am Kryostat-Mikrotom bei unterschiedlichen Schnittdicken geschnitten.

Die Erarbeitung der Probenvorbereitung war grundsätzlich erfolgreich. Insgesamt zeigen die Untersuchungen, dass Wurzeln und Sprosse ohne Einbettungsmedium am Kryostat-Mikrotom geschnitten werden können. Hingegen benötigt fragileres Probenmaterial wie Blätter und Früchte eine zusätzliche Stabilisierung durch CMC. Es konnte außerdem herausgefunden werden, dass die Pflanzenhistologie die Anfertigung von dickeren Schnitten (ca. 40-60 µm) notwendig macht verglichen mit humanem oder tierischem Gewebe (5-10 µm).

Abstract

During intensive microscopic analysis of plant organs (leaves, roots and others), one often encounters conspicuous structures, some of which are easy to describe but difficult to interpret. These are, for example, typically colored cells or contents that change after preparation during observation, such as crystalline or amorphous cell contents. It can be assumed that these observations are due to a variety of substances contained in the corresponding cells. If one attempts to obtain more detailed information on the observed phenomena by researching the relevant literature, little or no information is found. This means that although various structures are conspicuous, their description and characterization are often missing in the current literature. This is presumably due to the fact that although the observed phenomenon is conspicuous, the explanation as to why this appearance occurs has to be omitted, which is why such structures are not even mentioned. These gaps in knowledge need to be clarified and contribute to improving the level of anatomical knowledge to possibly provide new scientific approaches for the localization of substances in certain tissues.

In human and animal histology, various methods have already been established for investigating cell changes, localizing biomolecules and for immunohistochemistry, while research in the plant world is still in its infancy. One possible reason for this is the special properties of plant tissue, which complicate sample preparation. In particular, the rigid cell walls, the high water content and the large vacuoles make cryosectioning challenging. The task of this master's thesis was to develop and optimize the sample preparation of cryosections. The aim was to find suitable methods of embedding, freezing, storage and cutting techniques that allow such preparations to be subjected to further analyses such as MALDI-MS. The preparation techniques developed should provide the prerequisites for the specially prepared plant sections to be measured using special imaging methods and mass spectrometric analyses to characterize or identify ingredients 'in situ'.

Different plants and organs were selected for sample preparation (*Monstera deliciosa* - aerial roots, *Ruscus aculeatus* - roots, *Acorus calamus* - roots, *Foeniculum vulgare* - fruits, *Myrrhis odorata* - fruits. *Aloe vera* - leaves, *Piper ornatum* - leaves, *Citrus x limon* - leaves, *Myrtus communis* - leaves, *Eucalyptus globulus* - leaves). Initially, so-called 'positive controls' were prepared for each plant in the form of water and chloral hydrate preparations. Finally, the same

samples were frozen either without embedding or embedded in carboxymethylcellulose using liquid nitrogen and cut on the cryostat microtome at different cutting thicknesses.

The preparation of the samples was generally successful. Overall, the investigations show that roots and shoots can be cut on the cryostat microtome without an embedding medium. However, more fragile sample material such as leaves and fruits require additional stabilization with carboxymethylcellulose. It was also found that plant histology requires the preparation of thicker sections (approx. 40-60 μm) compared to human or animal tissue (5-10 μm).

7 Literaturverzeichnis

Alagukannan, G. & Ganesh, S., 2014. Relationship Between Growth Parameters and Aloin Content in Aloe Vera. *IJSR - International Journal of Scientific Research*, 7(3), 3-5.

Ammon, P. D. H. P. T., 2010. *Hunnius Pharmazeutisches Wörterbuch*. 10. Auflage Hrsg. s.l.:De Gruyter.

Braune, W., Leman, A. & Taubert, H., 1994. *Pflanzenanatomisches Praktikum I*. 7. Auflage Hrsg. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag Jena.

Dean, H. L. & Sybil Jr, E., 1942. Permanent Slides of Plant Cuticle Stained with Sudan IV and Sudan Black B. *Proceedings of the Iowa Academy of Science*, 49(1), 129-132.

Dong, Y. et al., 2016. Sample Preparation for Mass Spectrometry Imaging of Plant Tissues: A Review. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1-16.

EDQM, 1974. *Europäisches Arzneibuch*. Ausgabe 8. 2014. Hrsg. Stuttgart: Dt. Apotheker-Verl.

Goodwin, R. J. A., Pennington, S. R. & Pitt, A. R., 2008. Protein and peptides in pictures: imaging with MALDI mass spectrometry. *Proteomics*, 8, 3785-3800.

Kaspar, S. et al., 2011. MALDI-imaging mass spectrometry – An emerging technique in plant biology. *Proteomics*, 11, 1840-1850.

Paletzki, R. F. & Gerfen, C. R., 2019. Basic neuroanatomical methods, *Current Protocols in Neuroscience*. Wiley Periodicals LLC, 90, e84, 1-18.

Paul, C. A., Beltz, B. & Berger-Sweeney, J., 2021. Sectioning of Brain Tissues. *Cold Spring Harb Protoc.*, 131-133.

Peukert, M., Becker, M., Matros, A. & Mock, H.-P., 2014. Mass spectrometry-based imaging of metabolites and proteins. In: *Methods in molecular biology*. Clifton: Springer Verlag, pp. 223-240.

Rahfeld, B., 2011. *Mikroskopischer Farbatlas pflanzlicher Drogen*. 2. Auflage Hrsg. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.

Rodig, S. J., 2021. Preparing Frozen Tissue Sections for Staining. *Cold Spring Harb Protoc.*, 131-133.

Ross, M. A., Kohut, L. & Loughran, P. A., 2022. Cryosectioning. *Current Protocols*, 2, e342, 1-8.

Schmidt, F. B. et al., 2018. Mass Spectrometry Based Imaging of Labile Glucosides in Plants. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1-12.

Son, A. I., Sokolowski, K. & Zhou, R., 2018. Cryosectioning. In: *Methods in molecular biology*. Clifton: Springer Verlag, pp. 301-311.

Stutts, W. L. et al., 2020. Methods for Cryosectioning and Mass Spectrometry Imaging of Whole-Body Zebrafish. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 31, 768–772.

Wilson M.D., L. B., 1905. A method for the rapid preparation of fresh tissues for the microscope. *Circulatory Disease - Bishop*.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Masterarbeit unterstützt und motiviert haben.

Zuallererst möchte ich mich bei meiner Erstbetreuerin, ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Sabine Glasl-Tazreiter, bedanken, die mir die Möglichkeit gegeben hat, meine Masterarbeit im Department der Pharmakognosie zu verfassen. Sie hatte immer ein offenes Ohr für Fragen und stand mir während der praktischen Arbeit mit innovativen und hilfreichen Ratschlägen zur Seite.

Weiters möchte ich mich herzlichst bei meiner Zweitbetreuerin, Mag. Dr. Elisabeth Ginko, bedanken, die dieses äußerst interessante Thema bereitgestellt hat und es mir ermöglicht hat, in meiner Masterarbeit mikroskopisch zu arbeiten. Außerdem danke ich ihr für ihre Begeisterung, durch die sie mir bereits im Bachelorstudium gezeigt hat, wie facettenreich und spannend die Pflanzenmorphologie ist.

Zudem danke ich Univ.-Prof. Dipl.-Ing. Dr. Manfred Ogris und seiner Forschungsgruppe für die Möglichkeit, im Rahmen meiner Masterarbeit das Kryostat-Mikrotom zu nutzen.

Mein Dank gilt auch all meinen Freundinnen und Freunden für den starken emotionalen Rückhalt über die gesamte Dauer dieses Studiums. Danke für die gegenseitige Unterstützung und die schöne Zeit, welche wir immer miteinander verbracht haben.

Ein besonderer Dank geht an meine zwei Brüder, die immer ein offenes Ohr für mich hatten.

Der größte Dank gebührt jedoch meinen Eltern und meiner Großmutter, durch deren finanzielle Unterstützung mir dieses Studium erst ermöglicht wurde. Danke auch für all eure lieben Worte und dafür, dass ihr mich stets motiviert habt, mein Bestes zu geben. Danke für alles.