

## **Die In-Vitro-Kultur des Usambaraveilchens (Saintpaulia ionatha)**

Best.- Nr. 2022416

Im Rahmen des Unterrichts in der Oberstufe ist es sinnvoll, eine In-vitro-Kultur aus Blattgewebsstücken durch die Schüler selbst durchführen zu lassen. Ein experimentelles Beispiel wird im Videofilm vorgeschlagen: das Experiment dehnt sich über mehr als vier Monate aus und kann in drei Ansätzen realisiert werden. In jedem praktischen Versuch reichen die allgemeinen methodischen und kognitiven Ziele weit über die eigentliche In-vitro-Kultur-Technik hinaus. In der Tat können im Laufe dieser Übungen andere Ziele erreicht werden. Schon in der Unterstufe kann dieser Videofilm dem Lehrer helfen, einige Begriffe zu erläutern (Vermehrung auf ungeschlechtlichem Wege, Sterilisation, Kulturbedingungen).

### **Vorbemerkung**

Für Schüler ist es schwer, die Technik eines Versuchs unter sterilen Bedingungen erstmals zu üben, und gleichzeitig die In-vitro-Kultur zu entdecken. Deshalb ist es besser, eine erste praktische Übung durchzuführen: Das Hauptziel bleibt nach wie vor, unter sterilen Bedingungen zu üben. Es wird aber mit dem Nachweis von Mikroorganismen im Boden gekoppelt. Drei Petrischalen mit einem Glucose-Cellulose-Nährmedium werden dazu gebraucht. Die erste bleibt zu, der zweiten wird einige Minuten lang der Deckel abgenommen und dann wieder geschlossen, auf dem Medium der dritten Schale werden unter sterilen Bedingungen Bodenmikroorganismen mit einem Impfinstrument verteilt. Durch den Vergleich der beobachteten Petrischalen kann der Schüler eine bzw. zwei Wochen danach das Konzept der sterilen Bedingungen herausstellen und gleichzeitig die Bodenflora beobachten. Hinweise für die Schüler werden in den Anlagen vorgegeben.

Hintereinander können folgende praktische Übungen durchgeführt werden:

- 1. Praktische Übung: Die Kultivierung**
- 2. Praktische Übung: Die Mikropropagation (6 - 8 Wochen nach der ersten Übung)**
- 3. Praktische Übung: Die Einwurzelung (6 - 8 Wochen nach der zweiten Übung)**

Der Videofilm soll den Schülern verdeutlichen, wie wichtig die Vorbereitungen jeder Übung sind. Übrigens soll er das Hauptziel des gesamten Versuchs definieren und detaillierte Hinweise zur Manipulation unter sterilen Bedingungen angeben. Der Film kann in Verbindung mit irgendeiner anderen In-vitro-Kultur angewandt werden. Das Usambaraveilchen stellt nur ein besonders gutes und umfassendes Beispiel dar.

### **Bemerkung**

Der Forschungsreisende H. Wendland (Hannover) benannte die Gattung zu Ehren des Entdeckers W. Frh. von Saint-Paul Illaire, Bezirkshauptmann von Usambara (Tanganjika).

## **Erste praktische Übung: Die Kultivierung**

### Ziele

Kenntnisse: ein biotechnologisches Beispiel

Methoden: eine technische Realisierung, eine graphische Darstellung

### Einleitung:

Seit einigen Jahren bedeutet die Technik der In-vitro-Kultur eine echte Revolution in der Blumenproduktion und in der Landwirtschaft. Diese Technik setzt sich zum Ziel, unter sterilen Bedingungen irgendein pflanzliches Individuum zu kultivieren und es unter optimalen Standardbedingungen sich vermehren zu lassen.

### Prinzip:

Aus pflanzlichen Geweben und Organen werden Fragmente entnommen und im geeigneten Nährmedium kultiviert. So erfolgt eine rasche Zellvermehrung. Die regelmäßige Fragmentierung des Zellmassives ermöglicht die Klonung der Pflanze. Um die Verseuchung durch Mikroorganismen zu vermeiden, müssen sterile Bedingungen während der ganzen Kultur gewährleistet werden.

### Anwendung an dem Usambaraveilchen

Allgemeine Hinweise:

Sie müssen Ihre Zeitplanung entsprechend den Manipulationserfordernissen aufstellen.

### **1. Beobachtung des Usambaraveilchenblattes**

(Stellen Sie Ihre Beobachtungen in einer Zeichnung dar.)

Ein Blatt zeichnen und folgende Teile bezeichnen: Blattspreite, -stiel und -nerv. (s. methodische Hinweise "Realisierung einer Beobachtungszeichnung").

### **2. Bericht (in Form eines Schemas)**

die hintereinander folgenden Phasen in Form einer Schema-Reihe zusammenfassen. Die zeitliche Anordnung soll dabei nicht vergessen werden.

Eine Tabelle vorbereiten, um die zeitliche Entwicklung der Kultur zu verfolgen.

### **3. Realisierung der Kultur (entsprechend einem Protokoll eine Manipulation durchführen)**

Vorbereitung des Materials

- Es ist angebracht, einen kochfesten Baumwollarbeitskittel zu tragen, die langen Haare hinten zusammenzuhalten und eine Nase-Mund-Schutzmaske zu tragen, um Verseuchungsquellen durch Atemluft zu vermeiden
- Den Stiel eines mittelgroßen Blattes sauber abschneiden.
- Das Blatt mit Leitungswasser sorgfältig abspülen, um es zu säubern.

- In einem Lösungsmittel das Blatt 2 Minuten lang liegenlassen, um die Cuticula wasserdurchlässig werden zu lassen.
- Dann 5 Minuten lang in eine Desinfektionslösung legen.
- Während des Experimentierens sollten die Hände unter Verwendung von Wasser, Seife und dann vor jeder Manipulation unter sterilen Bedingungen mit Ethanol desinfiziert werden (Vorsicht: in weiter Entfernung der Bunsenbrennerflamme!).
- Die Arbeitstischoberfläche mit einer Desinfektionslösung (z. B. Natriumhypochlorid bzw. Chlorwasser) desinfizieren und erst dann, entsprechend dem für Rechtshänder vorgeschlagenen Plan, das Material aufstellen.
- Den Bunsenbrenner anzünden.
- Ruhig am Arbeitstisch sitzen bleiben. Es ist notwendig, den oberen Teil der Gefäße beim Öffnen und beim Verschließen sowie jedes Instrument bei jeder Verwendung gründlich abzuflammen.
- Die Arbeitsinstrumente werden durch die Lehrerin bzw. den Lehrer in brennendem Brennspiritus am Boden des Becherglases sterilisiert. Ab jetzt erfolgen alle Manipulationen unter sterilen Bedingungen!
- Die vier Spülungsgefäße mit sterilem destilliertem Wasser auffüllen.

### Manipulation

- Mit einer Pinzette das Blatt aus dem Desinfektionsmittel herausnehmen.
- Das Blatt im ersten Spülungsbad durch ständiges Bewegen gründlich abspülen.
- Den Vorgang in den nächsten Spülungsgefäßen wiederholen.
- Während der vierten Spülungsphase die sterile Petrischale vorbereiten.
- Das Blatt herausnehmen und dann in die Petrischale legen.
- Ca. 1 cm<sup>2</sup> mit einem sterilen Skalpell ausschneiden.
- Die Kulturflasche öffnen und den Deckel auf ein mit Desinfektionsmittel durchtränktes Filterpapierstück legen. Das Papier selbst befindet sich in einer Schale.
- Mit großer Sorgfalt das Explantat mit der unteren Seite direkt auf den Celluloseboden auflegen.
- Noch vor dem Verschließen der Flasche die innere Seite des Flaschenhalses mit Wattetupfern und Desinfektionsmittel sorgfältig bestreichen.
- Ein Etikett mit Ihrem Namen, Ihrer Klasse bzw. Gruppe beschriften und dann auf die untere Seite des Flaschenbodens kleben.

Die Flasche wird dann in einem Kulturschrank unter optimalen Temperatur- und Lichtbedingungen sechs bis acht Wochen lang aufbewahrt.

## **Zweite praktische Übung: die Mikropropagation**

### Ziele:

Kenntnisse: eine moderne bioagronomische Anwendung, ihre technischen und biologischen Probleme, die Organ- Gewebe- und Zellkonzepte.

Methoden: unter sterilen Bedingungen manipulieren; ein Mikroskop benutzen.

### Einleitung:

Bei der ersten praktischen In-vitro-Kultur-Übung wurde ein Blattgewebestück vom Usambara-Veilchen auf einen sterilen Nährboden gelegt. Jetzt geht es darum, die Entwicklung dieses Fragments zu verfolgen und die Manipulation weiter durchzuführen.

## **1. Beobachtung des Explantats nach einer achtwöchigen Kultur**

(Beobachtungstechniken anwenden)

Aus einem Blattstück hat man ein Zellmassiv, auch Kallus genannt, wachsen lassen. Daraus erfolgt die Herausbildung kleinerer grüner Blätter:

- Ohne die Flasche zu öffnen, den Stand der Kultur beobachten und schematisieren.
- Die Frage beantworten: aus welchem Organ entstehen normalerweise die Blätter?

## **2. Mikropropagation des Usambaraveilchens**

(eine Manipulation praktisch durchführen lassen)

Dieser Arbeitsvorgang ermöglicht die Fragmentierung des gewonnenen Kallusgewebes. Um die Anzahl der Exemplare zu vermehren, wird jedes Fragment auf ein Nährmedium mit derselben Zusammensetzung gelegt. Diese Manipulation erfolgt unter sterilen Bedingungen (s. technische Hilfshinweise).

- Mit einem Desinfektionsmittel den Arbeitstisch desinfizieren.
- Entsprechend dem vorgeschlagenen Plan das Material aufstellen.
- Den Bunsenbrenner anzünden.
- Die Maske verwenden und die Hände unter Verwendung von Seife und dann von Ethanol säubern.
- Den Deckel der sterilen Petrischale abnehmen.
- Die Kulturflasche öffnen und ihren Deckel auf ein mit Desinfektionsmittel durchtränktes Papierstück legen.
- Das Blättermassiv mit abgeflammt Pinzetten herausnehmen und in die Petrischale legen.
- Das Blättermassiv mit abgeflammt Pinzetten und Skalpell in vier einzelne Fragmente teilen.
- Zwei Fragmente in jede Flasche übertragen. Dabei müssen die sterilen Bedingungen unbedingt beachtet werden.

- Vor dem Verschließen des Flaschenhalses mit dem Desinfektionsmittel gründlich reinigen.
- Ein mit Datum und Gruppenname bzw. -nummer beschriftetes Etikett unter die Flasche kleben.
- Die Flaschen werden unter für ihre Entwicklung günstigen Bedingungen sechs bis acht Wochen lang aufbewahrt.

In Ihrem Bericht fertigen Sie Schemadarstellungen der durchgeführten Experimente an.

### **3. Die Zelldifferenzierung**

(Beobachtungstechniken anwenden und Informationen erfassen)

Um den biologischen Vorgang, den die Kultivierung und die Zellvermehrung ermöglicht, besser zu verstehen, werden zwei Typen von pflanzlichen Zellen beobachtet. Einerseits kallusähnliche Zellen und andererseits blattähnliche Zellen, die aus einer Knospe entstehen. Wegen der Größe der Zelle ist die Anwendung des Lichtmikroskops erforderlich (s. technische Hilfshinweise). Dabei soll nicht vergessen werden, dass ein Gewebe aus untereinander identischen Zellen besteht.

Am Ende der praktischen Übung geben Sie den schriftlichen Bericht mit Zeichnungen zurück (s. Anlage 1).

#### 3.1 Beobachtung eines Längsschnittes durch die Spitze der Knoblauchwurzel

Diese meristematischen teilungsfähigen Zellen ähneln den Kalluszellen.

- Mit der schwachen Vergrößerung das Präparat zentrieren.
- Mit der mittleren Vergrößerung 6 Zellen in der Nähe der Wurzelspitze auswählen.
- Mit der starken Vergrößerung diese Zellen zeichnen.

#### 3.2 Beobachtung des Präparates: "Querschnitt durch ein Blatt"

Diese Zellen ähneln den Zellen des Mikroblattes des Usambaraveilchens. Sie haben schon dieses Organ bei der ersten praktischen Übung beobachtet.

- Mit der schwachen Vergrößerung das Präparat zentrieren.
- Mit der mittleren Vergrößerung 3 verschiedene Zelltypen erkennen.
- Je eine Zelle von jedem Typ zeichnen.

### 3.3 Endergebnis

(eine Synthese erstellen)

Stellen Sie einen Vergleich zwischen kallusähnlichen Zellen und Blattzellen auf. Der Übergang von einem Kallustyp zu einer Blattpyzelle veranschaulicht einen wesentlichen biologischen Prozess: die Zelldifferenzierung.

### Dritte praktische Übung: die Einwurzelung

#### Ziele

Kenntnisse eine moderne bioagronomische Anwendung, ihre technischen und biologischen Probleme, die Hormonwirkung.

#### Methoden

Unter sterilen Bedingungen manipulieren, ein mikroskopisches Präparat realisieren usw.

#### **Einleitung**

Vorerst wurde ein nur noch partiell differenziertes Zellmassiv geteilt und auf einen neuen sterilen Nährboden gelegt. Jetzt sind die Fragmente auf ein neues Medium zu übertragen, damit die Differenzierung bis zum Ende geführt wird.

#### **1. Beobachtung der Fragmente nach einer vierwöchigen Kultur**

(Beobachtungstechniken anwenden)

Man hat ein Zellmassiv (Kallus) wachsen lassen. Daraus haben sich kleine Blätter wie am Ende der ersten Übung herausgebildet.

- Ohne die Flasche zu öffnen, ist der Stand der Kultur zu beobachten und zu schematisieren.
- Was für neue und bedeutende Veränderungen zeigt die Kultur?

#### **2. Einwurzelung des Usambaraveilchens**

(Eine Manipulation praktisch durchführen)

Dieser Arbeitsvorgang ermöglicht die Fragmentierung des Kallusgewebes. Jedes Fragment wird zwecks Wurzelwachstums auf ein Nährmedium mit einer neuen unterschiedlichen Zusammensetzung gelegt. Diese Manipulation erfolgt unter sterilen Bedingungen (s. technische Hilfshinweise)

- Mit einem Desinfektionsmittel den Arbeitstisch desinfizieren.
- Entsprechend dem vorgeschlagenen Plan das Material aufstellen.
- Den Bunsenbrenner anzünden.
- Die Maske verwenden und die Hände unter Verwendung von Seife und Ethanol säubern.
- Den Deckel der sterilen Petrischale abnehmen.

- Die Kulturflasche öffnen und den Deckel auf ein mit Desinfektionsmittel durchtränktes Papierstück legen.
- Das Blättermassiv mit abgeflamten Pinzetten herausnehmen und in die Petrischale legen.
- Das Blättermassiv mit abgeflamten Pinzetten und Skalpell in vier einzelne Fragmente teilen.
- Zwei Fragmente in je zwei Flaschen übertragen, die sterilen Bedingungen müssen dabei unbedingt beachtet und die Flaschen aufrecht gehalten werden.
- Vor dem Verschließen des Flaschenhalses mit dem Desinfektionsmittel gründlich reinigen.
- Ein mit Datum und Gruppennummer bzw. -name beschriftetes Etikett auf die Flasche kleben.
- Die Flaschen werden unter für die Wurzelherausbildung günstigen Bedingungen so lange wie nötig aufbewahrt.

Sie müssen den Bericht mit Schemata der durchgeführten Experimente weiterhin kontrollieren.

### **3. Übertragung in die eingedeckte Keimschale**

(eine Manipulation praktisch üben)

Einige Fragmente wurden schon im Rahmen der zweiten Übung auf das Einwurzelungsmedium übertragen. Dieses ermöglicht die Weiterführung und das Ende des Experimentes zu protokollieren.

- Ein Fragment mit Wurzel beobachten.
- Das Fragment vom Nährboden sorgfältig entfernen und in Düngererde verpflanzen.
- In einer abgedeckten Keimschale wachsen lassen.

### **4. Ein mikroskopisches Präparat herstellen**

Dabei müssen sie das Protokoll der technischen Hilfshinweise respektieren.

### **Schlussfolgerung**

Sie müssen den Bericht vervollständigen und nicht vergessen, das schöne Usambaraveilchen einige Wochen später mit nach Hause zu nehmen.



## HINWEISE UND BEMERKUNGEN

### Technische Voraussetzungen für die Realisierung der praktischen Übungen

- Übliche unspezifische Hilfsmittel: Seife, Desinfektionsmittel (z. B. Bleich- bzw. Chlorwasser), Detergenzien, 70 %-iges vol. Ethanol, Brennspiritus, Ohrentupfer, Etiketten, destilliertes Wasser, Schnellkochtopf, Autoklav oder Mikrowellengerät, Watte- und Zellstoffstopfen, Alufolie, übliche Glasgeräte, Bunsenbrenner, Präparierbesteck (Pinzette, Skalpell, Rasierklingen u. a.).
- Spezifisches Material: Nährmedien, Usambaraveilchen, Kulturgefäße
- Im Wachstumsschrank müssen eine lange tägliche Beleuchtung (15 Stunden pro Tag), aber keine erhöhte Temperatur herrschen. Ein möglicher Treibhauseffekt in den Flaschen muss vermieden werden.
- Gefäßbeispiel für die Einwurzelung: Einweckglas - aber ohne Metallteil - der Glasdeckel wird sogar mit durchsichtiger Plastikfolie überzogen.

### Schädliche Faktoren für das Wachstum der Explantate

- Pflanzenspezifische innere Faktoren: die ausgewählte Pflanze muss sich in gutem phylogenetischen Zustand befinden, obwohl es im Winter schwieriger ist.
- Die Sterilisationsfaktoren: Formol, auch Formalin genannt, werden von den Pflanzen nicht vertragen. Dabei sollten wir nie vergessen, dass die Sterilisation des Explantats eigentlich nur ein Kompromiss zwischen einer nicht perfekten Sterilisation und der Zellerstörung sein kann.
- Die Kulturfaktoren: Normalerweise werden die Eigenschaften der Nährmedien regelmäßig geprüft. Eine ungenügende Beleuchtung und eine zu hohe Temperatur sollen vermieden werden.

Schließlich ist die Biologie eine experimentelle Wissenschaft. Deshalb sind die Ergebnisse nicht genau vorauszusagen (nicht zuletzt liegt hier ein Reiz der Biologie). Ein erfolgloser Versuch soll immer analysiert und bis zum Erfolg wiederholt werden.

Im Film wurden die Bunsenbrennerflammen leuchtend und hell eingestellt, damit sie sichtbar werden. Praktisch aber muss die Flamme als blauer Kegel erscheinen. Bei all diesen Manipulationen soll der Lehrer auf die Haare und das Ethanol in Flammennähe aufpassen. Manche Sequenzen des Filmes können mehrmals gezeigt werden, um diese Sicherheitsprobleme bei der Arbeit zu unterstreichen. Sterilisation der Instrumente mit brennendem Brennspiritus im Becherglas darf nur durch den Lehrer durchgeführt werden. Dieser Vorgang kann durch eine Sterilisation der eingepackten Instrumente im Autoklav (sie können aber schnell verrostet) ersetzt werden oder noch vor dem Gebrauch mit Ethanol sterilisiert werden.



Diese Manipulation kann auf drei (wie im Film) oder sogar auf zwei Übungen reduziert werden. In diesem Fall muss bei der zweiten Übung die Hälfte der Kallusfragmente auf das Mikropropagationsmedium und die andere Hälfte auf das Einwurzelungsmedium übertragen werden. Eine kurze Beobachtung genügt dann als dritte praktische Übung.

## Anlagenliste

1. Anlage Bericht der In-vitro-Kultur (für die Schüler).
2. Anlage technische Hilfshinweise "Manipulationen unter sterilen Bedingungen" (für die Schüler).
3. Anlage technische Hilfshinweise "Mikroskopische Präparate pflanzlicher Organe" (für die Schüler).
4. Anlage methodische Hilfshinweise "Realisierung einer Beobachtungszeichnung" (für die Schüler).
5. Anlage Vorbereitungshinweise (für das Laborpersonal).

Ein Beispiel für die Geräteaufstellung am Arbeitstisch bei der 1. Übung (die Mikropropagation)

Ein Beispiel für die Geräteaufstellung am Arbeitstisch bei der 2. Übung (die Einwurzelung)

## **Anlage 1**

### **Bericht der In-vitro-Kultur (2. Übung)**

KLASSE

NAME

VORNAME

NAME

VORNAME

Jeder Schüler muss zwei der vier Zeichnungen selbst anfertigen.

#### **1. Mikroskopische Beobachtung der kallusähnlichen Zellen**

Material: meristematische Zellen der Wurzelspitze des Knoblauchs

Vergrößerung: x 400

Beschreiben Sie das Aussehen der verschiedenen Zelltypen!

## 2. Mikroskopische Beobachtung der Blattzellen

Material: Querschnitt durch ein Blatt

Vergrößerung: x 400

Beschreiben Sie das Aussehen dieser Zellen!

## 3. Auswertung

Vergleichen Sie die Blätter bei der 1. und 2. Beobachtung!

## Anlage 2

### MANIPULATIONEN UNTER STERILEN BEDINGUNGEN

#### Prinzip:

Mikroorganismen bzw. Zellen entwickeln sich mit Hilfe eines entsprechenden Nährmediums. Verseuchung und Entwicklung fremder Mikroorganismen müssen unbedingt vermieden werden. Sie dürfen nie vergessen, dass die Luft zahlreiche unerwünschte Mikroorganismen enthält, und dass jeder Luftzug sie in Bewegung bringt. Deshalb müssen bestimmte Regeln streng eingehalten werden.

#### DURCHFÜHRUNG

1. Zum Arbeitsbeginn sollten die Hände unter Verwendung von Wasser und Seife mehrmals gewaschen werden.

Soweit wie möglich sollten das Gesicht von der Kultur entfernt sowie das Sprechen und Husten vermieden werden (deshalb wird die Verwendung einer Maske empfohlen).

2. Den Arbeitstisch mit Desinfektionsmittel (Chlorwasser oder Ethanol) sterilisieren. Es besteht keinerlei Gefahr, wenn die Hände in Berührung mit den Lösungen kommen.

#### 3. Sterilisationsverfahren

Die Instrumente müssen mit Brennspritus vor und nach jeder Benutzung abgeflammt werden (in Alkohol getaucht und dann abgeflammt).

Alle verwendeten Glasgeräte und Nährböden werden in einen Schnellkochtopf, einen Autoklav oder ein Mikrowellengerät eingebracht und sterilisiert. Vor und nach jeder Verwendung muss die Öffnung jedes Glasgerätes abgeflammt werden.

4. In der Nähe der Flamme arbeiten: Sie verursacht einen aufsteigenden Luftzug, der unerwünschte Mikroorganismen entfernt. Es soll immer im Bereich dieses Sterilisationskegels gearbeitet werden.

Höchste Vorsicht mit der Flamme ist geboten: Haare und Kleider vor Brand schützen!  
Keinen Alkohol in Flammennähe benutzen!

5. Schnell, aber überlegt arbeiten: Je länger eine Petrischale oder Flasche geöffnet ist, desto größer ist die Verunreinigungsgefahr.

### Anlage 3

#### Technische Hilfinweise

#### MIKROSKOPISCHE PRÄPARATE PFLANZLICHER ORGANE

##### Prinzip:

Das Blatt muss dünn genug geschnitten werden. Eine einwandfreie Durchleuchtung des Präparates ist von ausschlaggebender Bedeutung für die Qualität des Bildes im Lichtmikroskop. Es muss quer zum Hauptblattnerve geschnitten werden.

##### DURCHFÜHRUNG

#### 1. Herstellung des Schnittes

- Ein Stück Holundermark wird benötigt, um das Blatt zu halten: das Mark muss so ausgehöhlt werden, um das Blatt einzuklemmen, ohne es zu zerdrücken.
- Das Holunderstück zwischen Daumen und Zeigefinger in der linken, die Rasierklinge in der rechten Hand, ergibt der erste Schnitt eine glatte Oberfläche.
- Von rechts nach links schneiden (für Rechtshänder), die Rasierklinge soll etwas schräg gehalten und immer ruhig benutzt werden.
- Die Schnitte müssen so dünn wie möglich sein. Auch die unvollständigen Schnitte werden sofort in ein mit Wasser gefülltes Uhrglas gelegt.

## 2. Färbung des Schnittes

Um die Strukturen zu verdeutlichen, müssen die Schnitte behandelt werden. Sie werden von einer Glasschale oder einer Glasküvette zur anderen mit den verschiedenen Lösungen mittels einer Pinzette oder eines Pinsels sorgfältig übertragen.

- Chlorwasser (Natriumhypochlorid): diese Lösung zerstört den Zellinhalt, ohne die Membranen zu schädigen. Die Zellen bleiben bis zur Entfärbung in der Schale. Die Gewebe können später leicht erkannt werden.
- Schnell im Wasser waschen.
- In sehr verdünnter Essigsäure 4 Min. liegen lassen (dies erleichtert die Entfernung des Chlorwassers und die spätere Färbung).
- In Jod-Grün 1 Min färben: so sehen die verholzten Membranen grün aus.
- Mit Wasser schnell abspülen.
- Im Karminalaun 10 Min. färben, damit die pektin- und cellulosehaltigen Membranen rosa werden.
- Mit Wasser erneut abspülen.
- Die Schnitte in einen Wassertropfen zwischen Objektträger und Deckglas legen.
- Beobachten.

## Anlage 4

### Methodische Hilfsinweise

#### REALISIERUNG EINER BEOBACHTUNGSZEICHNUNG

Sie soll die Realität treu nachbilden, sie ist kein Schema.

#### 1. Realisierung

- Alles was gesehen wird, muss gezeichnet werden. Das Objekt günstig auswählen, nichts erfinden, nicht allzu stark vereinfachen.
- Eine einfache geometrische Figur herausfinden die das Objekt umrahmt.
- Diese Figur hilft, die Zeichnung richtig auf das Blatt zu bringen.
- Eine Skizze der Zeichnung mit den richtigen Verhältnissen anfertigen.
- Die endgültigen Linien scharf ziehen.
- Legenden schreiben.
- Einen vollständigen Titel auswählen.

## 2. Darstellung

- Der Titel muss vollständig sein und mit dem Lineal unterstrichen werden.
- Die vorläufigen Hilfslinien zur geraden Schreibweise der Legenden müssen wegradiert werden.
- Die Pfeiler der Legenden müssen waagrecht und nicht gekreuzt gezeichnet werden.
- Die Einteilung des Blattes muss richtig sein. Die Zeichnung in der Blattmitte soll so groß wie möglich sein.
- Die saubere Arbeit zeigt nur saubere Linien.
- Nur den Bleistift benutzen.

## Anlage 5

### Vorbereitungshinweise

#### IN-VITRO-KULTUR - PRAKTISCHE ÜBUNG

### 1. Sterilisation der Flaschen

- die Flaschen gründlich waschen, dann mit Hilfe eines Gummistopfens, dessen Loch mit Watte verstopft ist, verschließen.
- 20 Min. im Autoklav bei 120 °C sterilisieren (die Zeitdauer genügt in dieser Übung).

### 2. Vorbereitung der Nährböden

- Vollständige dehydrierte Trockenmedien dienen zur Bereitung der Nährböden.
- Das Trockenmedium wird mit dem vorgegebenen destillierten Wasservolumen gemischt.
- Unter häufigem Rühren mit einem Glasstab wird das Medium über die Bunsenbrennerflamme oder im Mikrowellengerät zum Erhitzen gebracht. Dies dauert bis zur perfekten Homogenisierung des Mediums an.
- Das noch warme flüssige Nährmedium wird in Kulturflaschen abgefüllt (40 ml pro Flasche).
- Die Flaschen sind zu sterilisieren und zu verschließen.
- Solange der Nährboden noch flüssig ist, werden die Flaschen so auf eine Leiste gelegt, dass der Boden schräg erstarrt. Die auf diese Weise erzielte Oberfläche soll für das Explantat groß sein und damit die Arbeit erleichtern.

### 3. Vorbereitung des sterilen destillierten Wassers

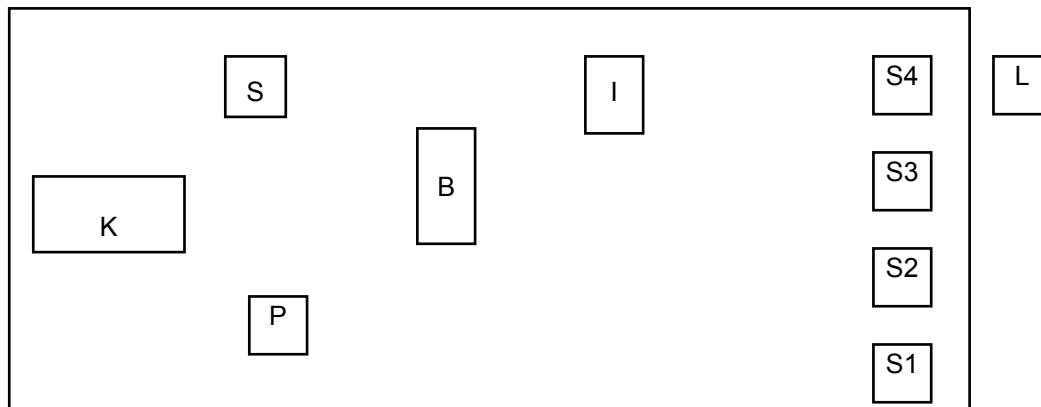
- 500 ml destilliertes Wasser in einem Ballon 30 Min. lang kochen lassen.
- Den Ballon mit Hilfe eines Watte- und Zellstoffstopfens verschließen und mit Alufolie überdecken.
- Die Aufbewahrungsdauer ist begrenzt. Deshalb erst am Vorabend der Manipulation das Wasser sterilisieren.

### 4. Vorbereitung der sterilisierten Gefäße

- Nur gründlich gewaschene Gefäße benutzen.
- Alle Röhrchen, Erlenmeyerkolben, Bechergläser und Ballons mit Watte- und Zellstoffstopfen verschließen und mit Alufolie überdecken (Vorsicht: keine Alufolie im Mikrowellengerät benutzen!)
- Das Sterilisiergut wird 20 Min. im Autoklav bei 120 °C behandelt.

## IN-VITRO-KULTUR(1)

### Aufstellungsplan des Arbeitstisches

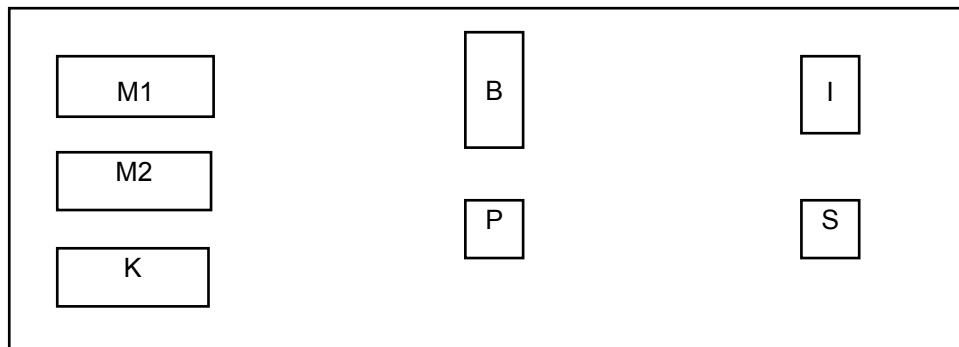


#### Legenden:

- L: Lipid. Lösungsmittel  
 I: sterilisierte Instrumente im Becherglas  
 S: Schale (mit Desinfektionsmittel, durchtränktes Papierstück)  
 K: Kulturflasche  
 B: Bunsenbrenner  
 S1, S2, S3, S4: Spülungsphasen im Wasser  
 P: Petrischale

## IN-VITRO-KULTUR (2)

### Aufstellungsplan des Arbeitstisches



#### Legenden:

- B: angezündeter Bunsenbrenner
- I: sterilisierte Instrumente im Becherglas
- S: Schale (mit Desinfektionsmittel, durchtränktes Papierstück)
- K: Kulturflasche
- M1, M2: Mikropropagationsflaschen
- P: sterile Petrischale