

Protokoll zur Erfassung der Beerenhautoberfläche mittels Kryo-Rasterelektronenmikroskop



Hintergrund

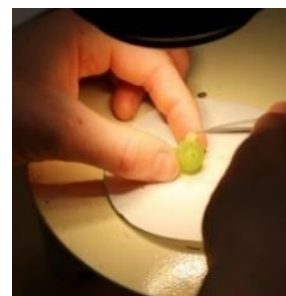
Die Beerenhauttextur und deren Wachsaufgabe hat einen erheblichen Einfluss auf die Anfälligkeit einer Rebsorte gegenüber der Grauschimmelfäule verursacht durch *Botrytis cinerea*. Im INTERREG-Projekt WiVitis wird diese Wachsaufgabe von Beeren pilzwiderstandsfähiger Rebsorten (PIWIs) sowie traditioneller Rebsorten mit verschiedenen Methoden untersucht. Neben dem Einsatz sensorgestützter Verfahren wird auch ein Kryo-Rasterelektronenmikroskop (Kryo-REM) eingesetzt. Mit diesem kann die Beerenhautoberfläche bis zu 40.000-fach vergrößert dargestellt werden, um die winzigen Strukturen der Wachsaufgabe für das menschliche Auge sichtbar werden zu lassen und diese auf Strukturunterschiede hin zu untersuchen.



Probenvorbereitung

Zunächst wird aus der vorausgewählten Beere ein 3-5 mm großes, flaches Stück der Beerenhaut mit einem Skalpell herausgeschnitten und zusammen mit weiteren Beerenhautpräparaten auf einem Probenteller fixiert.

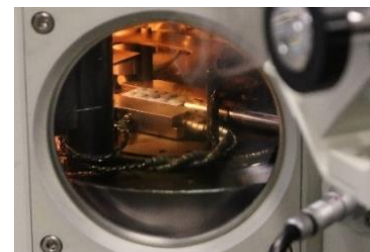
Im REM herrscht ein sehr hohes Vakuum bei Raumtemperatur. Das Wasser in dem Beerenhautpräparat würde somit sofort verdampfen und die Wachse kollabieren. Daher müssen die Präparate vorher in flüssigem Stickstoff bei -210°C schockgefrostet werden. Bei dieser optimalen Gefriertrate bilden sich keine Eiskristalle, wodurch die Zellen und Wachse der Proben unversehrt bleiben und originalgetreu aufgenommen werden können.



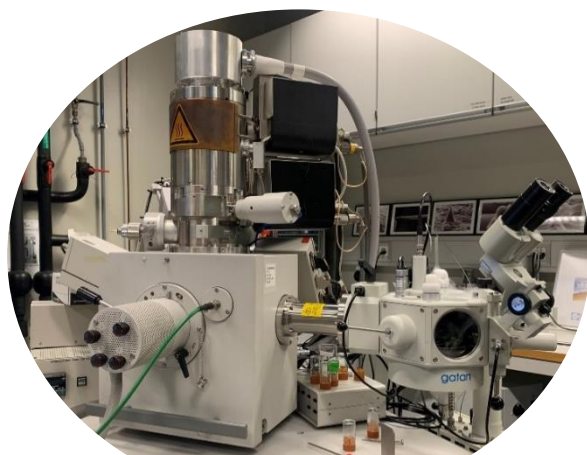
Präparation der Beerenhautprobe unter dem Auflichtmikroskop

Funktion im Kryo-REM

Unsere Probenplatte mit den zehn gefrorenen Beerenhautstücken kann nun in die Kryo-Einheit eingebracht werden. Da die unseres Projektpartners NI Lab Basel über ein Sichtfenster verfügt, lässt sich beobachten, wie die gefrorenen Proben mit ca. 30 nm Gold (möglich sind auch andere elektrisch leitfähigen Metalle oder Kohlenstoffe) beschichtet werden. Dies verhindert später im REM ein Aufladen der Proben unter dem Elektronenstrahl, stabilisiert diese und verbessert deren bildgebende Sekundärelektronensignale.



Gefrorene Proben in der Kryo-Einheit



Kryo-REM des Nano Imaging Lab Basel

Anschließend erfolgt eine Überführung der präparierten Proben durch die Schleuse in das REM. Bei ca. -150°C wird der Elektronenstrahl Zeile für Zeile über die Probe geführt und interagiert an jedem Punkt mit der Probenoberfläche. Die entstehenden Signale werden mit Detektoren gemessen, mit welchen die Beschaffenheit der Probenoberfläche dargestellt wird. Je nach Anzahl der an einem Punkt gemessenen Elektronen, wird dieser auf dem PC-Bildschirm heller oder dunkler erscheinen. Das Resultat sind beeindruckende, hochaufgelöste Fotos von Beerenhautoberflächen diverser Rebsorten.