

# UPORABA IZBRANIH SVETLOBNO MIKROSKOPSKIH TEHNIK ZA RAZISKAVE LESA IN SKORJE

Use of selected light microscopy techniques to investigate wood and bark

**Izvleček:** Predstavljamo nekaj možnosti uporabe svetlobnega mikroskopa za raziskavo lesa in skorje. Raziskave smo opravili na vzorcih intaktnih tkiv (lesa, kambija, skorje) odvzetih iz odraslih bukev (*Fagus sylvatica* L.) v različnih obdobjih vegetacijske dobe. Vzorce smo fiksirali in vklopili v parafin ali epoksi smolo po Spurr, pripravili rezine normalnega zrelega lesa in lesa v različnih fazah nastanka, rezine tenzijskega lesa, kambijeve cone ter tkiv skorje. Rezine smo obarvali z različnimi barvili (safranin, astra modro, akridin oranžno in toluidin modro), za primerjavo pa smo pripravili tudi neobarvane rezine. Preparate smo opazovali s svetlobnim mikroskopom in sicer z uporabo različnih tehnik kot so: svetlo polje, polarizacija in UV-fluorescenca. Predstavljamo posnetke različno obarvanih tkiv, opazovanih z različnimi tehnikami ter razpravljamo o prednostih in pomanjkljivostih posameznih tehnik pri uporabah za različne namene.

**Gljučne besede:** bukev, *Fagus sylvatica* L., les, polarizacija, skorja, svetlo polje, svetlobni mikroskop, UV-fluorescenca

**Abstract:** We present some possibilities to use a light microscope for investigations of wood and bark. We investigated intact tissue samples containing the wood, cambial zone and bark. They were taken from living mature beech (*Fagus sylvatica* L.) trees at different times of vegetation period. The samples were fixed in FEA (formalin-ethanol-acetic acid) and embedded in paraffin or epoxy resin after Spurr. We made the slices of normal mature wood and of wood in different phases of differentiation, tension wood, cambial zone and bark tissues. The sections were stained with safranin, astra blue, acridine orange and toluidin blue. We also prepared unstained sections for comparison. The sections were observed under the light microscope using bright field and polarization mode, and UV-fluorescence. We present images of sections stained with different stains and observed with different light microscope techniques. We discuss the advantages and disadvantages of all used techniques.

**Keywords:** beech, *Fagus sylvatica* L., wood, polarization, bark, bright field, light microscope, UV-fluorescence

## UVOD

Svetlobni mikroskop (SM) v zadnjem desetletju doživlja renesanso in številne študije so pokazale, da je nepogrešljiv tudi za proučevanje mikroskopskih struktur v lesu in skorji. Raziskovalni mikroskopi omogočajo uporabo različnih tehnik, med njimi so za raziskave lesa pogosto uporabljene tehnike svetlo polje, polarizacija in UV-fluorescenca.

Najbolj običajno je mikroskopiranje v svetlem polju, kjer preparate presvetlimo z vidno svetlobo (prim. Ličar in sod., 1972; Gerlach, 1976; Rawlins, 1992; Čufar, 2006). Tki-va različnih debelin (običajno od 1  $\mu\text{m}$  do 25  $\mu\text{m}$ ) lahko opazujemo neobarvana ali pa jih obarvamo z različnimi barvili. Za opazovanje lesa in skorje so se uveljavila predvsem barvila, ki obarvajo celulozo in lignin in so zato posamezna ali v kombinaciji uporabna za dokazovanje teh komponent (npr. Oven, 1997; Drnovšek in Perdih, 2005; Gričar, 2007).

\* univ. dipl. inž., Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo, Rožna dolina, Cesta VIII/34, 1000 Ljubljana, SLO; e-pošta: peter.prislan@bf.uni-lj.si

Pri SM, ki omogoča uporabo polarizacijske tehnike, med vir svetlobe in kondenzor vstavimo polarizacijski filter (polarizator), skozi katerega lahko prodre le svetloba, ki niha v ravnini, ki jo prepušča filter (t.j. polarizirana svetloba). Pravokotno na polarizator postavimo analizator - (filter nameščen nad objektivom). Ko sta oba filtra prekrizana, svetloba skozi mikroskop ne prodre, razen če objekt med filtroma ne vsebuje optično aktivne snovi, ki delno zasuče oz. odkloni ravnino polarizirane svetlobe in omogoči, da nekaj svetlobe prodre skozi analizator (npr. Ličar in sod., 1972; Gerlach, 1976; Rawlins, 1992). V takem primeru vidimo objekt iz optično aktivne snovi kot svetel objekt na temnem ozadju. To tehniko lahko pri raziskavah lesa in skorje uporabimo za opazovanje celuloze in anorganskih vključkov. Celuloza v P in S1 sloju celične stene lesa se na primer ne sveti, celuloza v S2 sloju, ki vsebuje kristalinično celulozo z vzporedno orientiranimi mikrofibrilami, pa se v polarizirani svetlobi sveti. Anorganski vključki so lahko prisotni v različnih celicah lesa in skorje.

Pri tehniki UV-fluorescence uporabljamo svetlobni mikroskop z virom UV svetlobe. Ker navadno steklo ne prepušča UV svetlobe nižjih valovnih dolžin, objekt navadno osvetljujemo z UV svetlobo valovne dolžine pod 400 nm ali z modro svetlobo, kar omogoča uporabo normalnega stekla za leče ter objektiva in krovna stekla.

Ko osvetlimo fluorescirajočo snov z nevidno kratkovalovno svetlobo (UV), ta oddaja dolgovalovno, vidno svetlobo. Pojav imenujemo fluorescenca. Snov oddaja vidno svetlobo, dokler je obsevana z UV žarki (prava fluorescenca). Nekatere snovi imajo po naravi sposobnost fluorescence (naravna ali primarna fluorescenca), druge snovi pa sposobnost fluorescence pridobijo (sekundarna fluorescenca), če jih obarvamo z ustreznimi barvili (fluorokromi). Fluorokromi (npr. akrudin oranž, anilin modro, fuksin) izkazujejo primarno fluorescenco (npr. Ličar in sod., 1972; Gerlach, 1976; Rawlins, 1992). S fluorescenčno mikroskopijo raziskujemo objekte, ki izkazujejo primarno ali sekundarno fluorescenco, pri čemer lahko sicer nevidne strukture postanejo vidne. Metoda se veliko uporablja v medicini in biologiji. V lesni anatomiji je zlasti uporabna za dokazovanje prisotnosti lignina (npr. Čufar in sod., 2008) in suberina (Biggs, 1984; Oven, 1997).

Z uporabo SM in naštetih tehnik je treba za opazovanje pod mikroskopom iz izbranih objektov pripraviti tanke rezine lesa ali skorje. Za pripravo rezin, debelih od 5 µm do 25 µm, lahko uporabimo rotacijske ali drsne mikrotome, za tanjše rezine pa ultratome. Slednji so namenjeni pripravi ultra-tankih rezin za elektronsko mikroskopijo (debeline 0,03 µm do 0,07 µm) lahko pa jih uporabimo tudi za rezanje tako imenovanih poltankih rezin debeline 1 µm. Izбира debeline rezanja je odvisna od tega, katere struktu-

re želimo opazovati, kakšno povečavo želimo uporabiti in katere tehnike priprave preparatov imamo na razpolago. Rezine običajno obarvamo, položimo na objektno steklo, vklopimo v medij (npr. glicerin, euparal) in prekrijemo s krovnim steklom. Preparati, vklopljeni v euparal so trajni, ker zlepi objektno in krovno steklo ter objekt med njima, zato jih lahko uporabimo tudi po več letih. V glicerin vklopljeni preparati pa so poltrajni in bolj občutljivi, ker krovno steklo ni prilepljeno. Po naših izkušnjah so tudi takšni preparati lahko uporabni več let. Tudi za barvila velja, da nekatera trajno obarvajo preparat, nekatera pa po določenem času zbledijo.

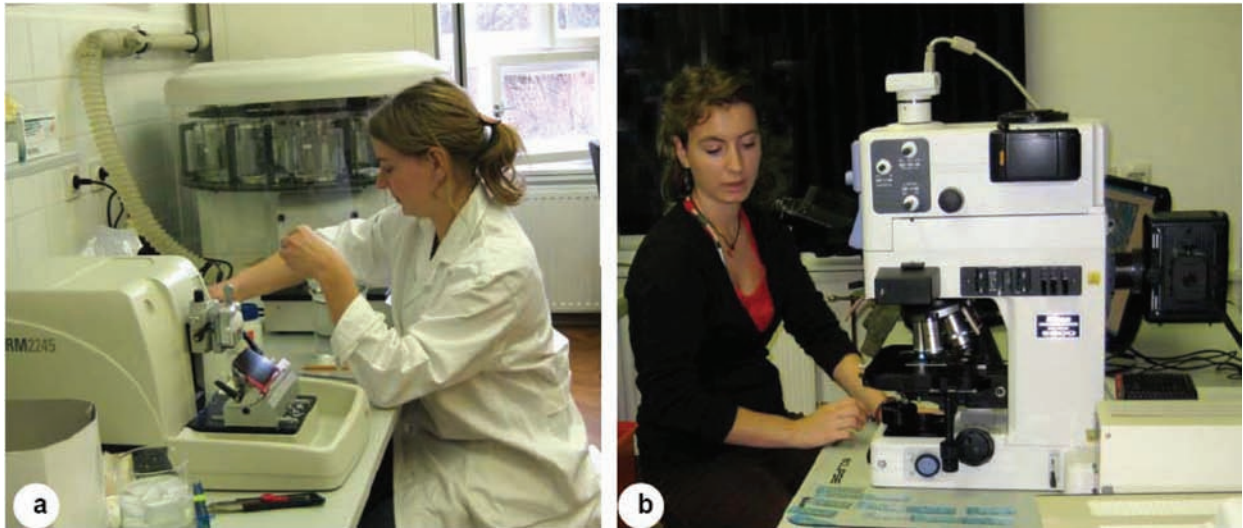
Zgoraj naštetete posebnosti veljajo predvsem za pripravo preparatov lesa in skorje, ki je zelo specifična. Pri delu uporabljamo uveljavljene recepture, ki jih nenehno dopolnjujemo in izboljšujemo (npr. Gerlach, 1976; Oven in sod., 1999).

V pričujočem prispevku želimo predstaviti nekaj tehnik, ki jih uporabljamo na Katedri za tehnologijo lesa Oddelka za lesarstvo Biotehniške fakultete. Na primeru preparatov, narejenih iz intaktnih tkiv (lesa, kambija, skorje), odvzetih iz odraslih bukev (*Fagus sylvatica* L.) v različnih obdobjih vegetacijske dobe, želimo prikazati prednosti in pomanjkljivosti uporabe različnih načinov vklapljanja (parafin ali epoksi smola po Spurru, 1969), različnih debelin rezanja ob uporabi različnih mikrotomov, različnih tehnik barvanja z različnimi barvili (astra modro, safranin, akrudin oranžno ali toluidin modro) in uporabe različnih tehnik mikroskopiranja (svetlo polje, polarizacija, epi-fluorescenca).

## 2. MATERIAL IN METODE

Vzorci intaktnih tkiv lesa (zunanje branike), kambijeve cone in skorje smo odvzeli iz odraslih dreves bukve (*Fagus sylvatica* L.) v različnih obdobjih vegetacijske dobe. Velikost vzorcev, ki smo jih odvzeli z nožem in dletom, je bila približno 1 cm x 1 cm x 1 cm. Takoj po odvzemu smo vzorce fiksirali v FAA (raztopina formalina, etanola in ocetne kisline), jih po enem tednu izprali pod tekočo vodo ter jih shranili v 70 % raztopini etanola. Vzorce smo vklopili v dva različna medija, in sicer v parafin ali v epoksi smolo, kot je opisano v nadaljevanju.

Iz odvzetih vzorcev smo pred vklapljanjem v parafin pripravili vzorce dimenzije 2 mm x 2 mm x 5 mm ter jih dehidrirali v etanolni vrsti (30 %, 50 % in 70 % etanol). Infiltracijo s parafinom smo opravili s pomočjo komore za preparacijo oz. tkivnim infiltratorjem (Leica TP 1020). V parafinske bloke vklopljene vzorce smo vpeli v rotacijski mikrotom in narezali 12 µm debele rezine. Za opazovanje s pomočjo svetlopoljske in (ali) polarizacijske tehnike smo rezine obarvali z vodno raztopino barvil safranin in astra modro (kombinacija obeh barvil) ali akrudin oranžno in jih



- Slika 1. Priprava preparatov in mikroskopiranje: (a) rezanje tankih rezin lesa z rotacijskim mikrotomom - zadaj tkivni infiltrator za vklapljanje vzorcev v parafin; (b) delo z raziskovalnim mikroskopom Nikon Eclipse 800.

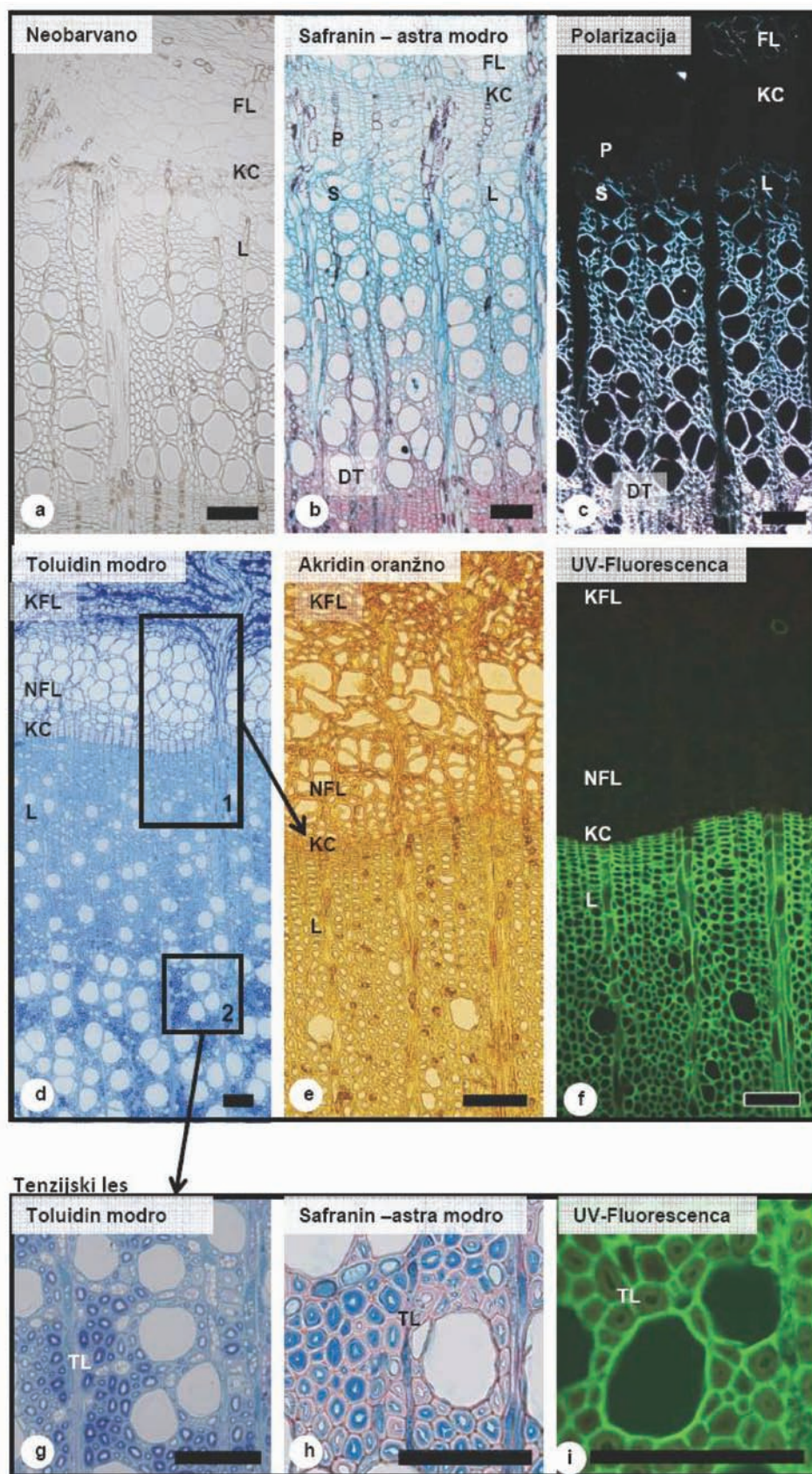
*Figure 1. Slide preparation and microscopy: (a) cutting of thin slices of wood using rotary microtome - in the background the tissue processor for embedding samples in paraffin; (b) work with the research microscope Nikon Eclipse 800.*

- Slika 2. Les in skorja bukve (*Fagus sylvatica* L.):

(a) neobarvana rezina, opazovana v svetlem polju (SP): sekundarni floem (FL), kambijeva cona (KC) in nastajajoči les (L); (b) rezina, obarvana s safraninom (lignificirana tkiva) ter astra modrim (nelignificirana tkiva) v SP: začetek nastajanja sekundarne celične stene (S), diferencirano tkivo (DT), primarna stena (P); (c) opazovanje s pomočjo polarizirane svetlobe (POL): celične stene v lesu, ki že vsebujejo sekundarno steno, se svetijo; (d) rezina, obarvana s toluidin modrim v SP: kolabirani floem (KFL) in tenzijski les (TL) sta temneje obarvana kot ostala tkiva, NFL - nekolabiran floem; okvir 1 na sliki 2d: les, KC in FL prikazan na slikah e in f; (e) rezina, obarvana z akridin oranžnim v SP; (f) rezina, obarvana z akridin oranžnim, UV-fluorescenca (UV), les fluorescira zaradi prisotnosti lignina v že lignificiranih celičnih stenah; okvir 2 na sliki 2d: tenzijski les (TL) prikazan na slikah g, h in i; (g) TL obarvan s toluidin modrim v SP: nelignificiran G-sloj je temneje obarvan kot ostali deli celične stene; (h) TL obarvan z astra modrim in safraninom v SP: G-sloj obarvan modro, ostale plasti celičnih sten pa rdeče; (i) TL obarvan z akridin oranžnim v UV: G-sloj oranžen in ne fluorescira, ostale (lignificirane) plasti celičnih sten pa fluorescirajo zeleno. Merilne daljice so dolge 100  $\mu\text{m}$ .

*Figure 2. Beech (*Fagus sylvatica* L.) wood and bark:*

*(a) non-stained section observed under light microscope, bright field (SP): secondary phloem (FL), cambial zone (KC) and forming wood (L); (b) section stained with safranin (lignified tissues) and astra blue (non-lignified tissues) in SP: beginning of secondary wall formation (S), differentiated tissue (DT), primary wall (P); (c) objects in polarized light (POL): wood cell walls that already contain secondary wall are shining; (d) section stained by toluidin blue in SP: compared to other tissues collapsed phloem (KFL) and tension wood (TL) appear darker, NFL – non-collapsed phloem; frame 1 in figure 2d: wood, KC and FL displayed in figures e and f; (e) section stained with acridine orange in SP; (f) section stained with acridine orange, UV-phluorescence (UV), wood shows phluorescence due to presence of lignin in the cell walls; frame 2 on figure 2d: tension wood (TL) shown in figures g, h and i; (g) TL stained with toluidin blue in SP: non-lignified G-layer is darker than other parts of the cell wall; (h) TL stained with astra blue and safranin in SP: G-layer is stained blue, other cell wall layers are stained red; (i) TL stained with acridine orange in UV: G-layer is orange and does not show phluorescence, other (lignified) cell wall layers show phluorescence (green). Scale bars are 100  $\mu\text{m}$  long.*



vklopili v glicerin ali euparal. Vzporedne rezine smo pustili neobarvane.

Za vklopjanje v epoksidno smolo smo uporabili vzporedne vzorce tkiv dimenzije 1 mm x 1 mm x 5 mm, ki smo jih dehidrirali v acetonu (30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 100 %) in jih vklopili po recepturi, kot jo je predlagal Spurr (1969). Površino vklopljenih vzorcev smo obrezali tako, da je velikost rezalne površine znašala približno 0,5 mm<sup>2</sup>. Z mikrotomom Ultacut E (Richert-Jung) in diamantnim nožem smo izdelali poltanke rezine (1 µm) jih položili na objektno steklo ter jih obarvali z barvilom toluidin modro ter jih vklopili v euparal (Gričar, 2006; Gričar, 2007).

Za opazovanje s pomočjo UV-fluorescence smo tanke rezine vzorcev, vklopljenih v parafin, obarvali z barvilom akridin oranžno. Za mikroskopiranje smo uporabili modro UV-svetlobo ob uporabi kombinacije vzpodbujevalnega filtra 330 nm - 380 nm in bariernega filtra 420 nm.

Tako pripravljene preparate smo opazovali s svetlobnim mikroskopom Nikon Eclipse E800 (svetlo polje, polarizacija in UV-fluorescena). Opazovanje in zajem slik smo opravili z video kamero Nikon digital sight DS-Fi1 in s sistemom za analizo slike NIS Elements BR 3.0.

### 3. REZULTATI IN RAZPRAVA

Slika 2 prikazuje rezine lesa in skorje bukve (*Fagus sylvatica* L.) po obarvanju z različnimi barvili ob uporabi različnih tehnik: svetlo polje (SP), polarizacija (POL) in UV-fluorescenca (UV). Na neobarvani rezini (slika 2a) so tkiva floema, kambijeve cone in lesa podobno obarvana, razlikujejo pa se morfološko (po obliki celic). Na vzporedni rezini, obarvani z astra modrim in safraninom pa lahko razlikujemo rdeče obarvan zreli les (DT), kjer je razvoj celic, vključno z lignifikacijo, že zaključen (slika 2b). Nad njim vidimo modro obarvan les, kjer so celice še v procesu diferenciacije, obdaja pa jih bodisi samo primarna stena (P) ali pa v njih že poteka proces odlaganja lignina oz. lignifikacije sekundarne stene (DT). Tudi KC in FL sta obarvana modro. Na istem preparatu v polarizirani svetlobi (slika 2c) se celice v lesu, kjer se je že začela odlagati sekundarna stena, svetijo. Celice, kjer je odlaganje celične stene že zaključeno, se svetijo najbolj intenzivno (slika 2c, DT), celice, kjer se je sekundarna celična stena (S) šele pričela odlagati, pa nekoliko manj. FL, KC in celice v lesu, ki vsebujejo le primarno steno (P), se ne svetijo.

Slika 2 d prikazuje tkiva, obarvana s toluidin modrim. Vsa tkiva so zrela, razvoj celic pa se je že zaključil. Najtemneje je obarvan tenzijski les (TL), temni pa so tudi deli kolabiranega floema (KFL). Tkiva, označena z okvirjem 1 (slika 2d) se po obarvanju z akridin oranžnim v svetlopoljski tehniki (SP) po barvi med seboj bistveno ne razlikujejo (slika 2 e), slika istih tkiv v UV-svetlobi pa kaže, da fluorescira samo les, ki ima v tem primeru že popolnoma lignificirane celične stene (slika 2f).

Tenzijski les v okviru 2 (slika 2d) je prikazan tudi pri večji povečavi in v različnih tehnikah (slike 2 g, h, i). Za tenzijski les so značilna tenzijska vlakna, ki vsebujejo G-sloj. Ta sloj je sestavljen pretežno iz celuloze (Čufar, 2006), zato se pri uporabi toluidin modrega barvila obarva intenzivno temno modro (slika 2g). Prav tako se obarva modro ob uporabi kombinacije safranina in astra modrega (slika 2h), v UV-svetlobi pa za razliko od ostalih slojev celične stene G-sloj ne fluorescira (slika 2i).

Rezine večine tkiv, prikazanih na sliki 2, smo pripravili z rotacijskim mikrotomom po predhodnem vklapljanju v parafin, rezine pa so bile debele 12 µm. Izjemi sta s toluidin modrim obarvani rezini (sliki 2d in g), ki sta debeli 1 µm in sta bili odrezani z ultratomom, tkivo pa je bilo pred tem vklapljeno v epoksi smolo po recepturi, ki jo je predlagal Spurr (1969). Na poltankih rezinah, so nežne celice NFL in KC odrezane najlepše, zaradi tankosti pa je preparat primeren tudi za opazovanje pri velikih povečavah (objektivni povečav 40x, 60x in 100x).

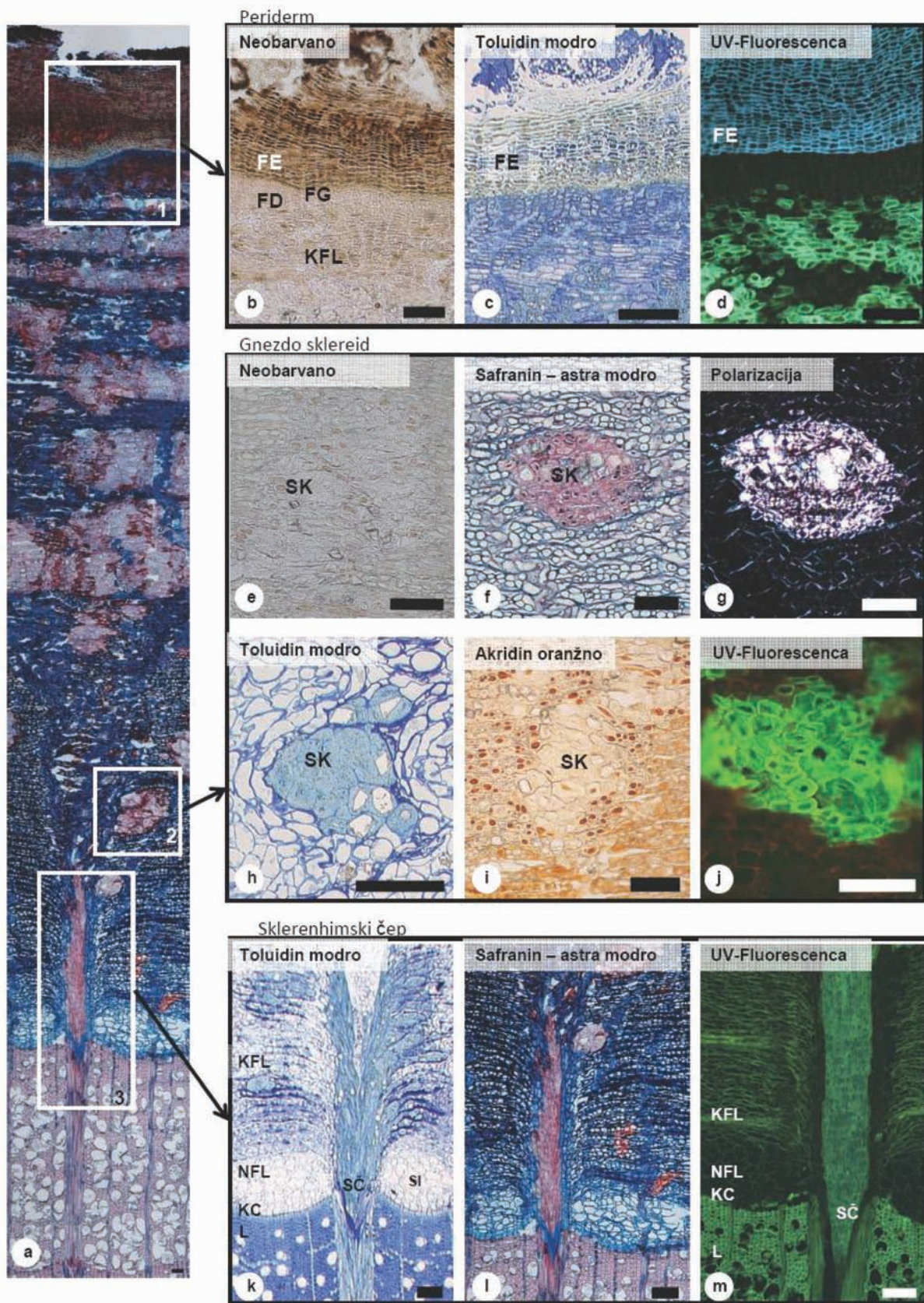
Safranin in astra modro tkiva obarvata trajno, toluidin modro in akridin oranžno pa s časom zbledita. Večino rezin na sliki 2 smo vklopili v smolo euparal in izdelali trajne preparate. Izjema so le rezine obarvane z akridin oranžnim (slike 2e, f, l), ki smo jih vklopili v glicerin. UV-fluorescenca je po obarvanju z akridin oranžnim bolj izrazita, če je tkivo vklapljeno v glicerin. Euparal je za UV mikroskopijo manj primeren zaradi autofluorescence (ima lastno fluorescenco), ki moti opazovanje. Barvilo, ki povzroči fluorescenco

### ■ Slika 3. Les in skorja bukve (*Fagus sylvatica* L.):

(a) tkiva obarvana z astra modrim in safraninom, sestavljena slika, opazovana v svetlem polju (SP); okvir 1 na sliki 3a: periderm sestavljen iz felema oz. plute (FE), felogena oz. plutnega kambija (FG) ter feloderma (FD), pod njim nekaj kolabiranega floema (KFL); (b) periderm: neobarvana rezina v svetlem polju (SP); (c) periderm: rezina obarvana s toluidin modrim v SP; (d) periderm: rezina, obarvana z akridin oranžnim v UV; okvir 2 na sliki 3a: gnezdo sklereid (SK) v kolabiranem floemu; (e) SK: neobarvana rezina v SP; (f) SK: rezina obarvana z astra modrim in safraninom v SP; (g) SK v polarizirani svetlobi (POL); (h) SK: rezina obarvana s toluidin modrim v SP; (i) SK: rezina obarvana z akridin oranžnim v SP; (j) SK: rezina obarvana z akridin oranžnim v UV; okvir 3 na sliki 3a: sklerificiran širok floemski trak oz. sklerenhimski čep (SČ) sega v ksilemski trak; (k) SČ: rezina obarvana s toluidin modrim v SP; (l) SČ: rezina obarvana z astra modrim in safraninom v SP; (m) SČ: rezina obarvana z akridin oranžnim v UV. Merilne daljice so dolge 100 µm.

**Figure 3: Beech (*Fagus sylvatica* L.) wood and bark:**

(a) tissues stained with astra blue and safranin, composed figure in bright field (SP); frame 1 in figure 3a: periderm composed of phellem (cork) (FE), phellogene (cork cambium) (FG) and phelloderm (FD), below periderm there is some collapsed phloem (KFL); (b) periderm: non-stained section in bright field (SP); (c) periderm: section stained with toluidin blue in SP; (d) periderm: section stained with acridine orange in UV; frame 2 in figure 3a: sclereid nest (SK) in collapsed phloem; (e) SK: non-stained section in SP; (f) SK: section stained with astra blue and safranin in SP; (g) SK in polarised light (POL); (h) SK: section stained with toluidin blue in SP; (i) SK: section stained with acridine orange in SP; (j) SK: section stained with acridine orange in UV; frame 3 in figure 3a: wide sclerified phloem ray (SČ) extends into xylem ray; (k) SČ: section stained with toluidin blue in SP; (l) SČ: section stained with astra blue and safranin in SP; (m) SČ: section stained with acridine orange in UV. Scale bars are 100 µm long.



določenih tkiv pri opazovanju pod UV svetlobo, s časom razpade, posledično pa se zmanjša tudi učinek fluorescence. Za delo z UV-fluorescenčno tehniko je zato vedno potrebno pripraviti sveže obarvane rezine lesa.

Slika 3a prikazuje pregled sekundarnih tkiv v bukvi. Na dnu slike je zadnja, popolnoma izoblikovana ksilemska branika, nad njo kambijeva cona in celotna skorja, ki jo na vrhu zaključuje edini periderm, sestavljen iz treh plasti: felema oz. plute (FE), felogena oz. plutnega kambija (FG) ter feloderma (FD) (slika 3a). Širina lesa in skorje na sliki 3a je znašala 13 mm, zato smo sliko morali sestaviti iz več zaporednih posnetkov tkiv pod mikroskopom.

Okvirji na sliki 3a označujejo tkiva, ki smo jih opazovali pri večjih povečavah ter različnih obarvanjih in mikroskopskih tehnikah. Na neobarvani rezini periderma najbolj izstopa temnejši felem (slika 3b), na rezini, obarvani s toluidin modrim, pa se tkiva po barvi bistveno ne razlikujejo (slika 3c). V UV-svetlobi se dobro vidi fluorescence felema (FE) in kolabiranega floema (KFL); FG in FD pa ne izkazuje ta fluorescence (slika 3d).

Sklereide (SK) so debelostene lignificirane celice, ki nastanejo v kolabiranem delu floema (slika 3a, okvir 2 ter slike 3 e-j). SK se dobro obarvajo s safraninom (slika 3f) ali toluidin modrim (slika 3h), se svetijo v polarizirani svetlobi (slika 3 g) in izkazujejo UV-fluorescenco (slika 3j). V polarizirani svetlobi v sklereidi vidimo tudi kristale anorganskih vključkov, ki so poleg celuloze v tej tehniki najbolj vidni (slika 3g).

Okvir 3 (slika 3a) prikazuje del zadnje branike v lesu, celoten nekolabirani floem (NFL) in del kolabiranega floema (KFL). Širok trak v lesu (ksilemski trak) prehaja v floemski trak. Osrednji del floemskega traku je sklerificiran in ga imenujemo sklerenhimski čep (SČ). Sklerificirano tkivo se obarva temno modro s toluidin modrim (slika 3k), rdeče s safraninom (slika 3l) in tudi izkazuje fluorescenco (slika 3m).

Večina rezin, prikazanih na sliki 3, je pripravljenih z rotacijskim mikrotomom (debelina 10 µm) po predhodnem vklapljanju v parafin. Izjema so le poltanke rezine tkiv, obarvane s toluidin modrim (slike 3c, h in k), na katerih se jasno vidijo posamezne celice. To je še posebej očitno pri sliki 3k, kjer so razločno vidne sitaste cevi (SI) z velikimi lumni. Sitaste cevi so na primer na sliki 3l nekoliko deformirane. Do deformacije celic je prišlo že ob vklapljanju v parafin in pri rezanju z rotacijskim mikrotomom.

Velikostni red največje povečave svetlobnega mikroskopa je 1000× (objektiv 100×, okular oz. projektiv 10×). Posnetki na slikah 2 in 3 so bili posneti z objektivni 4×, 10×, 20×

in 40×, povečave na slikah pa so označene z merilnimi daljicami. Slike omenjenih povečav so uporabne za študij lesa in skorje na celičnem nivoju. Za natančne preiskave manjših struktur, npr. slojev celične stene, pa je poleg svetlobnega mikroskopa nepogrešljiva tudi uporaba transmisijskega elektronskega mikroskopa (TEM), ki teoretično omogoča povečave do milijonkrat. Prednosti in različni primeri uporabe TEM so bili prikazani v več objavah naše skupine (npr. Schmitt in sod., 2003; Gričar in sod., 2005; Čufar in sod., 2008; Prislan in sod., 2009).

Zgoraj predstavljena barvila in mikroskopske tehnike omogočajo, da vidimo strukturo oz. anatomijo tkiv in predpostavimo njihovo kemijsko zgradbo. Omenjene metode barvanja štejem za kvalitativne, zato jih je pri raziskavah potrebno kombinirati in preverjati z drugimi metodami. Eno od takih metod predstavlja UV-mikrospektrofotometrija (UMSP), kjer lahko na primer polkvalitativno ugotavljamo vrsto lignina in stopnjo lignifikacije (prim. Schmitt in sod., 2003; Gričar in sod., 2005; Čufar in sod., 2008; Prislan in sod., 2009) ali prisotnost različnih ekstraktivnih snovi (npr. Koch, 2004; Koch in Grünwald, 2004; Lehringer in sod., 2008).

#### 4. SKLEPI

Predstavljena je uporaba barvil safranin, astra modro, akridin oranžno in toluidin modro. Prikazujemo različno obarvana tkiva lesa in skorje bukve v primerjavi z neobarvanimi tkivi.

Našteta barvila so uporabna predvsem za dokazovanje prisotnosti celuloze in lignina. Celuloza se ob uporabi kombinacije barvil astra modro in safranin obarva modro, lignin pa rdeče. Ob uporabi barvila toluidin modro se celuloza obarva temno modro, lignin pa svetlo modro. Barvilo akridin oranžno spada v skupino fluorokromov, zato je posebej primerno za barvanje rezin, ki jih opazujemo v UV-svetlobi.

Zaradi urejene zgradbe se celuloza, ki sestavlja sekundarno steno celic v lesu, v polarizirani svetlobi sveti. V polarizirani svetlobi se svetijo tudi kristali anorganskih vključkov, ki jih najdemo tako v lesu kot tudi v skorji.

Tehnika UV-fluorescence je med drugim uporabna za dokazovanje lignina. Prikazali smo fluorescenco lignificiranih delov po obarvanju z barvilom akridin oranžno.

#### 5. LITERATURA

1. **Biggs A. R.** (1984) Intracellular suberin: occurrence and detection in tree bark. *IAWA Bulletin*, 5, 2: 91-154
2. **Čufar K.** (2006) Anatomija lesa. Univerza v Ljubljani, Bioteh-

niška fakulteta, Ljubljana

3. **Čufar K., Gričar J., Zupančič M., Koch G., Schmitt U.** (2008) Anatomy, cell wall structure and topochemistry of water-logged archaeological wood aged 5,200 and 4,500 years. *IAWA Journal*, 29:55-68
4. **Drnovšek T., Perdih A.** (2005) Selective staining as a tool for wood fibre characterization. *Dyes and Pigments*, 67: 197-206
5. **Gerlach D.** (1976) *Das Lichtmikroskop. Eine Einführung in Funktion, Handhabung und Spezialverfahren für Mediziner und Biologen.* Georg Thieme Verlag Stuttgart
6. **Gričar J., Čufar K., Oven P., Schmitt U.** (2005) Differentiation of terminal latewood tracheids in silver fir trees during autumn. *Annales of Botany*, 95: 959-965
7. **Gričar J.** (2006) Vpliv temperature in padavin na ksilogenezno pri jelki (*Abies alba*) in smreki (*Picea abies*), doktorska disertacija, Ljubljana
8. **Gričar J.** (2007) Xylo- and phloemogenesis in silver fir (*Abies alba* Mill.) and Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.). Slovenian Forestry Institute. Ljubljana
9. **Koch G.** (2004) Biologische und chemische Untersuchungen über Inhaltsstoffe im Holzgewebe von Buche (*Fagus sylvatica* L.) und Kirschbaum (*Prunus serotina* Borkh.) und deren Bedeutung für Holzverfärbungen. Kommissionsverlag Max Wiedebusch, Hamburg
10. **Koch G., Grünwald C.** (2004) Application of UV microspectrophotometry for the topochemical detection of lignin and phenolic extractives in wood fibre cell walls. In: *Wood Fibre Cell Walls: Methods to Study their Formation, Structure and Properties.* Eds. Schmitt, U., Ander, P., Barnett, J.R., Emons, A.M.C., Jeronimidis, G., Saranpää, P., Stanzl-Tscheegg, S. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala
11. **Ličar P., Valentinčič T., Matjašič, J.** (1972) Navodila za vaje iz splošne biologije II. del. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Ljubljana
12. **Lehringer C., Gierlinger N., Koch G.** (2008) Topochemical investigation on tension wood fibers of *Acer* spp., *Fagus sylvatica* L. and *Quercus robur* L. *Holzforschung* 62:255-263
13. **Oven P.** (1997) Odziv sekundarnega floema in ksilema ter kambija na mehanske poškodbe bele jelke (*Abies alba* Mill.), navadne smreke (*Picea abies* Karst.), rdečega bora (*Pinus sylvestris* L.) in evropskega macesna (*Larix decidua* Mill.). Doktorska disertacija, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo, Ljubljana, 167
14. **Oven P., Torelli N., Shortle W., Zupančič M.** (1999) The formation of a ligno-suberised layer and wound periderm in beech bark (*Fagus sylvatica* L.). *Flora*, 194, 2: 137-144
15. **Prislan P., Koch G., Čufar K., Gričar J., Schmitt U.** (2009) Topochemical investigations of cell walls in developing xylem of beech (*Fagus sylvatica*). *Holzforschung*, 63: DOI: 10.1515/HF.2009.079
16. **Rawlins D.J.** (1992) *Light microscopy. Introduction to biotechniques.* Bios scientific publishers, Oxford
17. **Rossi S., Anfodillo, T., Menardi R.** (2006) Trephor: a new tool for sampling microcores from tree stems. *IAWA Journal* 27: 89-97
18. **Schmitt U., Grünwald C., Gričar J., Koch G., Čufar K.** (2003) Wall structure of terminal latewood tracheids of healthy and declining silver fir trees in the Dinaric region, Slovenia. *IAWA Journal*, 24: 41-51
19. **Spurr A.R.** (1969) A low viscosity embedding medium for electron microscopy. *Journal of Ultrastructural Research*, 26: 31-43