

Diferenciacija terminalnih traheid kasnega lesa pri navadni jelki v dormantnem obdobju

Differentiation of terminal latewood tracheids in silver fir during dormant period

Jožica GRIČAR¹, univ. dipl. inž. les.,

prof. dr. **Katarina ČUFAR**¹,

dr. **Uwe SCHMITT**²

¹Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo, Rožna dolina, Cesta VIII/34, SI-1000 Ljubljana

²Federal Research Center for Forestry and Forest Products, Leuschnerstrasse 91, D-21031 Hamburg, Germany

Izvelek

Proučili smo diferenciacijo terminalnih traheid kasnega lesa v dormantnem obdobju pri 10 navidezno zdravih odraslih jelkah (*Abies alba*) s pomočjo svetlobne in transmisijske elektronske mikroskopije. Vzorci lesa in kambija so bili odvzeti iz živih dreves v oktobru, novembru in marcu. Kambijeva celična delitvena aktivnost se je pri vseh drevesih zaključila v oktobru, medtem ko je proces diferenciacije v najmlajših traheidah ob kambiju pri drevesih s širšimi branikami še vedno potekal. V novembru so bile pri vseh drevesih celične stene terminalnih traheid kasnega lesa dokončno oblikovane in lignificirane. Celična delitvena aktivnost kambija ter diferenciacija sta se pri drevesih s širšimi branikami zaključili kasneje kot pri drevesih z ožjimi branikami. V vseh proučenih drevesih se je proces diferenciacije v terminalnih traheidah kasnega lesa zaključil pred zimo.

Ključne besede: navadna jelka (*Abies alba*), traheide kasnega lesa, celična stena, diferenciacija, lignifikacija, dormanca, svetlobna mikroskopija, transmisijska elektronska mikroskopija

Abstract

The differentiation of terminal latewood tracheids of silver firs (*Abies alba*) was studied during dormant period. Samples of wood and cambium were taken from 10 apparently healthy mature trees in the middle of October, November and March. According to light microscopy and transmission electron microscopy, cambial cell-divisional activity was completed in all investigated trees in October, whereas process of differentiation was still ongoing in the youngest tracheids close to the cambium in trees with broader annual xylem growth rings. Cell wall formation and lignification of terminal latewood tracheids were completed in all trees in November. The cambial cell-divisional activity and also differentiation ended later in trees with broader annual xylem growth rings. However, differentiation of terminal latewood tracheids in all investigated trees was completed before winter.

Keywords: silver fir (*Abies alba*), latewood tracheids, cell wall, differentiation, lignification, dormancy, light microscopy, transmission electron microscopy

UVOD

Kvaliteta lesa je v veliki meri odvisna od njegove anatomske in kemijske zgradbe, ki sta med drugim v tesni zvezi s procesom nastanka celic lesa v kambiju. V lesu iglavcev prevladujejo aksialne traheide, ki nastanejo s periklinimi delitvami kambijevih celic, t.j. kambijevih inicialk ter njihovih neposrednih derivatov, v obdobju kambijeve celične delitvene aktivnosti. Po delitvi v kambiju novo nastala celica vstopi v proces diferenciacije, kjer dobi končno velikost in obliko in se specializira za svojo vlogo v lesnem tkivu. Proces diferenciacije vključuje štiri glavne zaporedne faze: postkambialno rast, ki ji sledi odlaganje slojevite sekundarne stene, lignifikacijo ter odmrtnje celice (npr. Wardrop 1965, Savidge 1996, Torelli 2000, Plomion in sod. 2001).

Skope so informacije o diferenciaciji najmlajših traheid, ki nastanejo malo pred prenehanjem kambijeve celične delitvene aktivnosti. V številnih študijah poročajo, da so pri različnih iglavcih na začetku dormantnega obdobja ob kambiju zasledili nepopolno diferencirane traheide kasnega lesa (Murmanis and Sachs 1969, Nix and Villiers 1985, Donaldson 1991, 1992, 2001, Schmitt in sod. 2003, Gričar in sod. 2003).

Cilj pričujoče študije je bil raziskati proces diferenciacije v terminalnih (zadnjih) traheidah kasnega lesa ob kambiju, pri navadni jelki (*Abies alba*) v dormantnem obdobju. Prikazani so rezultati opazovanj pod svetlobnim mikroskopom (SM) in transmisijskim elektronskim mikroskopom (TEM).

MATERIAL IN METODE

Za vzorčna drevesa smo izbrali 10 navidezno zdravih odraslih jelk, starih približno 150 let, iz dinarsko jelovo-bukovega gozda na Ravniku pri Planini (500-700 m n.v.). Vzorce kambija in ksilema smo odvzeli v prsni višini (1,3 m nad zemljo) iz živih dreves v oktobru 2001, novembru 2001 in marcu 2002. Takoj po odvzemu smo material fiksirali v FAA (mešanica formalina, očetne kisline in alkohola) in ga nato v laboratoriju dehidrirali v etanolu.

Za SM smo z mikrotomom LEICA SM 2000R pripravili 20 µm debele preparate prečnih prerezov ter jih obarvali z barvili safranin in astra modro, ki različno obarvata celice v

različnih fazah nastajanja sekundarne stene in lignifikacije. Preparate smo vklopili v Euparal ter jih opazovali pod svetlobnim mikroskopom Nikon Eclipse E800 LM. Nediferencirane celice smo določili po modro obarvanih celičnih stenah ter protoplazmi v celičnem lumnu. Rdeče obarvane celične stene ter prazni lumni so bili značilni za popolnoma diferencirane traheide.

Za TEM smo vzorce dodatno dehidrirali v acetonu ter jih vklopili v epoksidno smolo po modificiranem postopku, kot ga opisuje Spurr (1969). Na ultramikrotomu Ultracut S smo z diamantnim nožem pripravili ultra tanke rezine debeline 80-100 nm, jih položili na mrežice povlečene z bakrom ter jih kontrastirali s kalijevim permanganatom (Donaldson 1992), pri čemer so se lignificirana, elektronsko gostejša področja kontrastirala temneje, nelignificirana pa so ostala svetla. Preparate smo opazovali s transmisijskim elektronskim mikroskopom PHILIPS CM 12 TEM pri pospeševalni napetosti 40 ali 60 kV.

REZULTATI IN DISKUSIJA

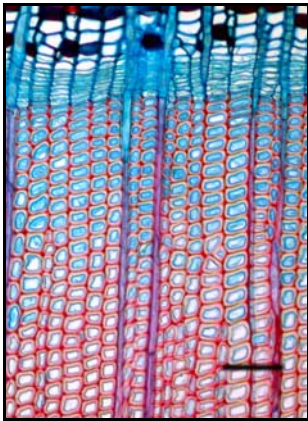
Z opazovanjem preparatov prečnega prereza s SM smo ugotovili, da se je kambijeva celična delitvena aktivnost pri vseh proučenih drevesih zaključila v oktobru (slika 1), kar smo določili na osnovi izgleda kambijevih celic. Vse celice v istem radialnem nizu so imele primerljivo majhne radialne dimenzije in celic, ki bi se nahajale v zgodnjih fazah diferenciacije (npr. postkambialni rasti), ni bilo zaslediti. Pri jelkah s širšimi branikami smo ob kambiju zasledili nepopolno diferencirane terminalne traheide kasnega lesa. Njihove celične stene so bile modro obarvane, v lumnih pa je bila prisotna protoplazma, kar kaže, da proces diferenciacije še ni bil zaključen. Pri jelkah z ožjimi branikami so bile celične stene terminalnih traheid kasnega lesa v oktobru obarvane rdeče, v lumnih pa nismo opazili protoplazme. To nakazuje, da so bile traheide popolnoma diferencirane. V novembru se je pri vseh drevesih proces diferenciacije v terminalnih traheidah kasnega lesa že zaključil (slika 2). V marcu je bil izgled terminalnih traheid kasnega lesa enak kot v novembru (slika 3), kar potrjuje, da se je diferenciacija zaključila že do novembrskega odvzema vzorcev.

S klasično svetlobno mikroskopijo lahko spremljamo proces diferenciacije traheid, transmisijska elektronska mikroskopija (TEM) pa to metodo dopolnjuje, saj zaradi velikih povečav omogoča podrobnejše opazovanje posameznih slojev celične stene. Kontrastiranje ultra tankih preparatov za TEM s kalijevim permanganatom smo izkoristili za kvalitativne

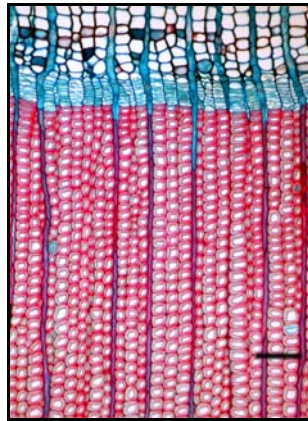
raziskave razlik v porazdelitvi lignina v celičnih stenah terminalnih traheid kasnega lesa. Lignificirana področja celične stene so se temno obarvala, nelignificirana področja so ostala svetla. Intenziteta kontrasta je sovpadala z vsebnostjo lignina v posameznem sloju celične stene, kar smo potrdili v eni od predhodnih študij (Schmitt in sod. 2003). Pri jelkah s širšimi branikami sekundarna celična stena terminalnih traheid kasnega lesa v oktobru še ni bila v celoti oblikovana in lignificirana, saj so po kontrastiranju s kalijevim permanganatom notranji deli celične stene ostali svetli (slika 4). Pri jelkah z ožjimi branikami so bile celične stene terminalnih traheid kasnega lesa v oktobru popolnoma diferencirane. Vsi sloji so bili dokončno oblikovani in lignificirani, vključno s slojem S3 ter bradavičastim slojem. Pri novembrskih vzorcih je bil pri jelkah z ožjimi in širšimi branikami proces diferenciacije zaključen (slika 5). Pri marčevskih preparatih je bilo stanje podobno kot pri novembrskih (slika 6).

Na osnovi rezultatov smo zaključili, da sta se kambijeva delitvena aktivnost ter proces diferenciacije kasneje zaključila pri drevesih, ki imajo širše branike oz. produktivnejši kambij. Proces diferenciacije terminalnih traheid kasnega lesa je bil pri vseh drevesih zaključen pred zimo, zato nismo opazili nobenih razlik v zgradbi terminalnih traheid kasnega lesa med novembrskimi ter marčevskimi preparati.

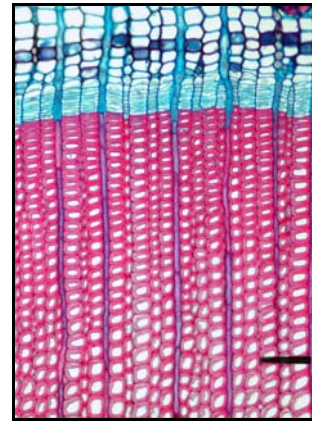
Naši rezultati se razlikujejo od opažanj nekaterih drugih avtorjev. Murmanis in Sachs (1969) sta poročala o prisotnosti protoplazme v lumnih v enem ali več tangencialnih nizih terminalnih traheid kasnega lesa bora *Pinus strobus* v septembru, oktobru in januarju. Donaldson (1991, 1992) je zasledil, da se pri večini vzorcev lesa bora *Pinus radiata* proces lignifikacije sekundarnih celičnih sten traheid kasnega lesa ni zaključil do poznega zimskega obdobja. Nix in Villiers (1985) sta na vzorcih odvzetih v novembru in marcu merila dvojne debeline celičnih sten traheid kasnega lesa pri dveh borih *Pinus taeda* ter *Pinus elliotii* in ugotovila, da so bile debeline celičnih sten izmerjene v marcu večje kot v novembru, kar naj bi nakazovalo, da v novembru proces diferenciacije še ni bil zaključen. Tako Donaldson (1992) kot Nix in Villiers (1985) so sklepali, da se proces diferenciacije traheid kasnega lesa, ki je poleg notranjih dejavnikov podvržen tudi zunanjim vplivom okolja, morda nadaljuje med zimskim obdobjem ali pa se prekine in nadaljuje nekje v marcu naslednje leto ter se zaključi preden nastanejo prve celice branike tekočega leta, česar v naši študiji nismo mogli potrditi.



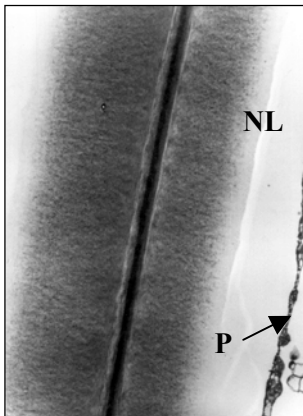
Slika 1: Oktober 2001 - celične stene terminalnih traheid kasnega lesa pri jelkah s širšimi branikami so modro obarvane in vsebujejo protoplazmo. Diferenciacija še ni zaključena. Daljica = 100 μ m



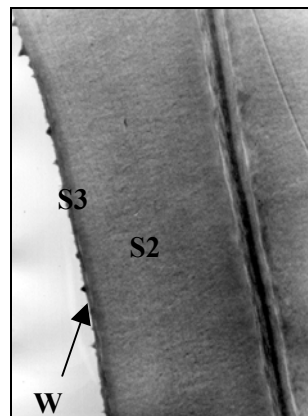
Slika 2: November 2001 - celične stene terminalnih traheid kasnega lesa so pri vseh jelkah rdeče obarvane, lumni so prazni. Proces diferenciacije je zaključen. Daljica = 100 μ m



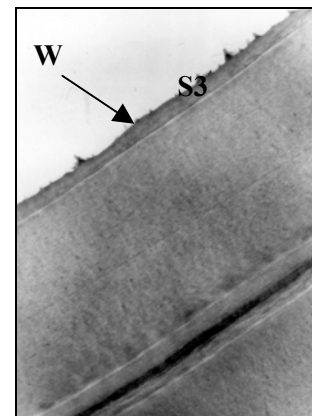
Slika 3: Marec 2002 - popolnoma diferencirane terminalne traheide kasnega lesa. Stanje celic je podobno kot v novembru 2001. Daljica = 100 μ m



Slika 4: Oktober 2001 - nediferencirane celične stene terminalnih traheid kasnega lesa ob kambiju pri jelkah s širšimi branikami. Sekundarna celična stena ni dokončno oblikovana, notranji sloji so nelignificirani (NL). V lumnu so vidni ostanki protoplazme (P). Povečava:9300x



Slika 5: November 2001 - oblikovani in lignificirani so vsi sloji sekundarne stene terminalnih traheid kasnega lesa pri vseh jelkah, vključno s S3 slojem ter bradavičastim slojem (W). Povečava:9300x



Slika 6: Marec 2002 - popolnoma oblikovana celična stena terminalnih traheid kasnega lesa. Povečava:14800x

ZAHVALA

Zahvaljujemo se prof. dr. Jasni Štrus z Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete ter njenim sodelavcem, Tanji Potsch iz Univerze v Hamburgu in Martinu Zupančiču za pomoč v laboratoriju in na terenu. Skladu kmetijskih zemljišč se zahvaljujemo, da nam je omogočil delo na terenu. Prispevek je bil predstavljen v obliki posterja na konferenci Eurodendro 2003 v Obergurglu, v Avstriji, 10-14 septembra, 2003. Delo je financiralo Ministrstvo za šolstvo, znanost in šport Republike Slovenije.

VIRI

- Donaldson, L.A., 1991. Seasonal changes in lignin distribution during tracheid development in *Pinus radiata*. Wood Science and Technology, 25: 15-24
- Donaldson, L.A., 1992. Lignin distribution during latewood formation in *Pinus radiata*. IAWA Bulletin n.s., 12, 4: 381-387
- Donaldson, L.A., 2001. Lignification and lignin topochemistry – an ultrastructural view. Phytochemistry, 57: 859-873
- Gričar J., Straže A. & Čufar K. 2003. Differentiation of the last formed tracheids in wood of silver firs (*Abies alba*) having various cambial productivity. Zbornik gozdarstva in lesarstva (Research Reports Forestry and Wood Science and Technology), 70: 87-100
- Murmanis, L. & Sachs, I., 1969. Seasonal development of secondary xylem in *Pinus strobus* L. Wood Science and Technology, 3: 177-193
- Nix, L.E. & Villiers, K., 1985. Tracheid differentiation in southern pines during the dormant season. Wood and Fibre Science, 17, 3: 397-403
- Plomion, C., Leprovost, G., Stokes, A., 2001. Wood formation in trees. Plant Physiology, 127: 1513-1523
- Savidge, R.A., 1996. Xylogenesis, genetic and environmental regulation – a review. IAWA Journal, 17, 3: 269-310
- 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, 1: 41-51
- Spurr, A.R., 1969. A low viscosity embedding medium for electron microscopy. J. Ultrastructural Research, 26: 31-43
- Torelli, N., 2000. Ksilogeneza. Les, 52, 10: 325-335
- Wardrop A. B. 1965. Cellular differentiation in xylem. V: Cellular ultrastructure of woody plants. Proceedings of the Advanced Science Seminar Pinebrook Conference Center Upper Saranac Lake, New York, september, 1964. Cote W.A. (ed.). Syracuse, New York, Syracuse University Press: 61-97