

## MIKROSKOPSKE TEHNIKE ZA ŠTUDIJ NASTANKA LESA PRI BUKVI

Peter PRISLAN<sup>1</sup>, Jožica GRIČAR<sup>2</sup>, Gerald KOCH<sup>3</sup>, Uwe SCHMITT<sup>4</sup>, Katarina ČUFAR<sup>5</sup>

### Izvleček

Opisan je nastanek lesa pri bukvi (*Fagus sylvatica*), ki smo ga spremljali na vzorcih intaktnih tkiv (lesa, kambijeve cone, skorje). Vzorce smo odvzeli iz odraslih dreves z rastišča na Panški reki pri Ljubljani tekom vegetacijske dobe 2006. Za spremljanje nastanka lesa smo uporabili svetlobno mikroskopijo (SM), UV-mikrospektrofotometrijo (UMSP) in transmisijsko elektronsko mikroskopijo (TEM). SM (svetlo polje in polarizacija) in sistem za analizo slike smo uporabili za spremljanje delitev v kambijevi coni ter nastajanje lesnih celic. Z UMSP smo določili vsebnost lignina v nastajajočih celičnih stenah. S pomočjo TEM pa smo spremljali razvoj posameznih slojev celične stene. Kombinacija vseh metod je omogočila spremljanje nastajanja lesa na različnih nivojih. Delitve v kambijevi coni so se začele konec aprila in končale od konca julija do sredine avgusta. Pretežni del branike je nastal od maja do julija. Razvoj prvih trahej je trajal približno en mesec, prvih vlaken pa približno dva meseca.

Ključne besede: bukev (*Fagus sylvatica* L.), nastajanje lesa, svetlobna mikroskopija, UV mikrospektrofotometrija, transmisijska elektronska mikroskopija

## MICROSCOPY TECHNIQUES TO STUDY WOOD FORMATION IN BEECH

### Abstract

We studied wood formation in beech (*Fagus sylvatica*), using intact tissue samples containing xylem, cambial zone and phloem. The samples were taken from adult trees growing at the forest site Panška reka near Ljubljana at weekly intervals during the 2006 vegetation period. Light microscopy (LM), UV-microspectrophotometry (UMSP) and transmission electron microscopy (TEM) were used for analyses. LM (bright field and polarization mode) and image analysis were used for investigation of cell divisions in the cambial zone and xylem formation. We determined lignin content in forming cell walls with UMSP. TEM was used to follow the deposition of cell wall layers. The methods used enabled us to investigate wood formation at different levels. Cell divisions started at the end of April and ended from the end of July till mid August. The main part of the growth ring in the wood was formed from May till July. The first formed vessels were completely formed in approximately one month and the first formed fibres in approximately two months.

Key words: beech (*Fagus sylvatica* L.), wood formation, light microscopy, UV – microspectrophotometry, transmission electron microscopy

## UVOD

### INTRODUCTION

Bukev (*Fagus sylvatica* L.) je med gospodarsko najpomembnejšimi lesnimi vrstami v Sloveniji. Kvaliteta bukovine je tesno povezana z njegovo anatomsko zgradbo, ta pa je odvisna od procesov, ki se odvijajo med nastankom lesa in jih vodijo notranji in zunanji dejavniki. Čeprav je bukev zelo razširjena, je presenetljivo malo znanega o procesu nastajanja lesa pri tej drevesni vrsti (npr. SCHMITT et al. 2000; WERF van der / SASS-KLAASSEN / MOHREN 2007; ČUFAR et al. 2008).

Proces nastanka lesa sestoji iz štirih zaporednih faz: (I) celične delitve v kambijevi coni, (II) rast novo nastalih celic

(površinska rast in podaljševanje), (III) debelitev in lignifikacija celičnih sten ter (IV) programirana celična smrt pri trahejah in vlaknih (PLOMION / LEPROVOST / STOKES 2001). Na nižjih nadmorskih višinah v Sloveniji se pri različnih drevesnih vrstah celične delitve v kambijevi coni začnejo praviloma v aprilu in končajo med julijem in septembrom (GRIČAR / OVEN / ČUFAR 2005a, GRIČAR et al. 2005b, GRIČAR / OVEN / ČUFAR 2005b, GRIČAR 2006, GRIČAR / OVEN / ČUFAR 2006, GRIČAR 2007, MARION / GRIČAR / OVEN 2007, ČUFAR et al. 2008). Po zaključku delitev v kambijevi coni se proces debelitve in lignifikacije celičnih sten pri zadnjih nastalih celicah v braniki različnih drevesnih vrst lahko nadaljuje tudi več tednov (MURMANIS / SACHS 1973, DONALDSON 1992, GRIČAR et al. 2005a).

<sup>1</sup> P. P., dipl.inž.les., BF, Oddelek za lesarstvo, Rožna dolina C. VIII/34, SI-1000 Ljubljana SLO

<sup>2</sup> dr. J. G., Gozdarski inštitut Slovenije, Večna pot 2, SI-1000 Ljubljana SLO

<sup>3</sup> prof. dr. G. K., Johann Heinrich von Thünen- Institute (VTI) and University of Hamburg, Leuschnerstr. 91, D-21031 Hamburg, Germany

<sup>4</sup> dr. U. S., Johann Heinrich von Thünen- Institute (VTI) and University of Hamburg, Leuschnerstr. 91, D-21031 Hamburg, Germany

<sup>5</sup> prof. dr. K. Č., BF, Oddelek za lesarstvo, Rožna dolina C. VIII/34, SI-1000 Ljubljana SLO

Bukev je difuzno porozni listavec, njen les (sekundarni ksilem) pa sestavljajo traheje, vlakna (v širšem pomenu besede), aksialni parenhim in trakovi, sestavljeni iz parenhima. Trahejni členi, vlakna in aksialni parenhim nastanejo iz vretenastih kambijevih inicialk, trakovi pa pretežno iz trakovnih inicialk (npr. ČUFAR 2006).

Pri bukvi se delitve v kambijevi coni začnejo neposredno po olistanju, natančen čas aktivacije kambijeve cone pa je odvisen od vremenskih razmer v tekočem letu, delitve v kambijevi coni pa se zaključijo v času od julija do septembra (SCHMITT *et al.* 2000; ČUFAR *et al.* 2008, (ČUFAR *et al.* 2008, SCHMITT / MÖLLER / ECKSTEIN 2000).

Procese v kambijev coni in nastanek novih celic lesa lahko spremljamo s pomočjo svetlobne mikroskopije na preparatih ustrezno pripravljenih vzorcev tkiv odvzetih iz živih dreves. Svetlobna mikroskopija v omejenem obsegu omogoča tudi spremljanje poteka odlaganja celične stene in lignifikacije. UV – mikrospektrofotometrija (UMSP) in transmisijska elektronska mikroskopija (TEM) imata to prednost, da zaradi večje ločljivosti omogočata podrobnejše raziskave v zgradbi posameznih slojev celične stene (SCHMITT *et al.* 2003, GRIČAR / ČUFAR 2004, GRIČAR *et al.* 2005a).

Cilj pričujočega sestavka je predstaviti odvzem tkiv iz živih dreves bukve (*Fagus sylvatica* L.), pripravo preparatov in spremljanje nastanka lesa s pomočjo svetlobne mikroskopije (SM), UV – mikrospektrofotometrije (UMSP) in transmisijske elektronske mikroskopije (TEM). Izpostaviti želimo prednosti in omejitve posamezne mikroskopske tehnike za tovrstna opazovanja.

## MATERIALI IN METODE MATERIALS AND METHODS

### TESTNA DREVEŠA TEST TREES

Vzorci intaktnih tkiv lesa (zunanje branike), kambijeve cone in skorje smo odvzeli iz šestih odraslih dreves bukve (*Fagus sylvatica* L.) z rastišča Panška reka v bližini Ljubljane, nadmorska višina 400 m n.m. Vzorce smo odvzeli na prsni višini dreves v tedenskih presledkih od začetka aprila do konca septembra 2006. Vsak teden smo iz drevesa odvzeli po en vzorec. Velikost vzorcev, ki smo jih odvzeli z nožem in dletom, je bila  $1 \times 1 \times 3 \text{ cm}^3$  (GRIČAR 2007). 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 kasneje razdelili na dva vzoredna bloka in enega vklopili v parafin za SM, enega pa v epoksi smolo za UMSP in TEM, kot je opisano v nadaljevanju.

### SVETLOBNA MIKROSKOPIJA LIGHT MICROSCOPY

Vzorce smo dodatno obrezali na dimenzije  $2 \times 2 \times 5 \text{ mm}^3$  ter jih dehidrirali v etanolni vrsti (30%, 50% in 70%). Infiltracijo s parafinom smo opravili s pomočjo komore za preparacijo tkiv Leica TP 1020. V parafinske bloke vklopljene vzorce smo vpeli v rotacijski mikrotom in narezali  $10 \mu\text{m}$  debele rezine, ki smo jih obarvali z barvili safranin in astra modro in vklopili v evparal. Tako pripravljene trajne preparate smo opazovali s svetlobnim mikroskopom Nikon Eclipse E800 (svetlo poljska in polarizacijska tehnika). Na prečnih prerezhih smo določili kambijevo cono, v nastajajoči braniki pa celice v fazi postkambialne rasti, celice v fazi odlaganja celične stene in lignifikacije ter zrele celice. Nato smo na vsakem preparatu vzdolž treh radialnih nizov prešteli celice v posameznih tkivih in izmerili širino posameznih tkiv v radialni smeri. Vlaknom tik nad letnico smo izmerili tudi radialne in tangencialne debeline celičnih sten, trahejam pa le radialne debeline celičnih sten. Vedno smo merili enojno debelino celične stene od srednje lamele do lumna. Štetje in merjenje smo opravili s sistemom za analizo slike Lucia G 4.8. Fotografiranje smo opravili z digitalnim fotoaparatom Nikon Coolpix E995.

### UV – MIKROSPEKTROFOTOMETRIJA UV - MICROSPECTROPHOTOMETRY

Vzporedne vzorce tkiv smo še dodatno obrezali na dimenzije  $1 \times 1 \times 5 \text{ mm}^3$ , jih dehidrirali v acetonu (30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100%) in jih vklopili v epoksidno smolo po recepturi, kot jo je predlagal Spurr (SPURR 1969).

Površino vklopljenih vzorcev smo obrezali tako, da je velikost rezalne površine znašala približno  $0,5 \text{ mm}^2$ . Z mikrotomom Ultacut E (Richert-Jung) in diamantnim nožem smo za vsak vzorec izdelali po dve poltanki rezini ( $1 \mu\text{m}$ ). Eno smo položili na običajno objektno steklo ter jo obarvali z barvilom toluidin modro. Slike posnete s svetlobnim mikroskopom so služile za boljšo orientacijo na UMSP, ter za meritve debeline celične stene vlaken in trahej s programom Analysis. Drugo rezino smo položili na kvarčno steklo, nanjo kanili kapljico

glicerina, ki ne absorbira UV svetlobe (mešanica glicerina in vode z lomnim količnikom  $n_D = 1,46$ ), ter jo pokrili s kvarčnim krovnim steklom.

Meritve smo izvedli z UV mikrospektrofotometrom (UMSP 80, Zeiss) opremljenim z imerzijskim ultrafluralnim 23:1 objektivom in skenirno mizo, ki skupaj s programom APAMOS® (Automatic-Photometric-Analysis of Microscopic Objects by Scanning, Zeiss) omogoča izdelavo topokemijskih slik pri konstantni valovni dolžini. Za ugotavljanje porazdelitve lignina v tkivu bukve smo izbrali valovno dolžino 278 nm, kjer je bil po predhodnih raziskavah ugotovljen lokalni maksimum UV spektra za vlakna bukovine (KOCH / KLEIST 2001, KOCH / GRÜN WALD 2004, RODER / KOCH / SIXTA 2004). Omenjeni program digitalizira kvadratna polja z lokalno resolucijo  $0,25 \mu\text{m}^2$  in fotometrično resolucijo s 4096 barvami na sivi lestvici, ki jih pretvori v 14 osnovnih barv za vizualizacijo absorpcijskih vrednosti. Skenirane slike lesa smo prikazali dvo- ali tridimenzionalno skupaj z grafi absorpcijskih vrednosti (KOCH / GRÜN WALD 2004). S skenirno napravo lahko torej merimo UV absorpcijske vrednosti določenega morfološkega področja ksilema pri konstantni valovni dolžini.

Z UMSP smo opravili tudi konvencionalne točkovne meritve (velikost točke  $1 \mu\text{m}^2$ ) pri valovnih dolžinah od 240 nm do 400 nm, da bi ugotovili ali obstajajo področja v ksilemski braniki kjer so UV absorpcijski spektri različni od 278 nm. Za vizualizacijo in vrednotenje smo uporabili program LAMBDA SCAN® (Zeiss). Točkovne meritve omogočajo ugotavljanje spektralnih značilnosti posameznih morfoloških področij v ksilemski braniki, saj naprava na izbranem mestu v ksilemskem tkivu izmeri absorpcijske vrednosti za vsako valovno dolžino na določenem intervalu. Iz oblike spektra lahko sklepamo o kemični sestavi lignina in o njegovi koncentraciji.

## **TRANSMISIJSKA ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA** *TRANSMISSION ELECTRON MICROSCOPY*

Vzorčke vklopljene v Spurr epoksidno smolo smo nazadnje še dodatno obrezali, tako da je rezalna površina znašala le približno  $0,05 \text{ mm}^2$ . Ultratanke rezine debeline 90 – 100 nm smo izdelali z mikrotomom Ultracut E (Reichert-Jung), ter jih položili na mrežice. Kontrastirali smo jih v enoodstotni raztopini kalijevega permanganata, ki smo mu dodali 0,1 % natrijevega citrata, kar naj bi povečalo reaktivnost ligninskih komponent celične stene in obenem preprečilo reaktivnost drugih komponent (GRİČAR 2007).

Raziskavo ultrastrukture bukovega lesa smo opravili s transmisijskim elektronskim mikroskopom PHILIPS CM 12 TEM, pri napetosti med 40 in 60 kV. Fotografije lesa smo pri vzorcih iz začetka rastne sezone posneli tik ob letnici, pri vzorcih na koncu rastne sezone pa tik pod kambijevo cono. Tako smo lahko spremljali diferenciacijo oz. lignifikacijo vlaken in trahej na začetku in ob koncu branike.

## **REZULTATI** *RESULTS*

### **SVETLOBNA MIKROSKOPIJA** *LIGHT MICROSCOPY*

Trajne mikroskopske preparate smo opazovali s svetlobnim mikroskopom v svetlem polju in spremljali širino kambijeve cone ter tedenske prirastke ksilemske branike 2006 (slika 1a). Svetlobni mikroskop v kombinaciji s sistemom za analizo slike med drugim omogoča tudi štetje celic in merjenje širin celic in tkiv pri različnih povečavah. Delitve v kambijeve coni so se začele med 18. in 24. aprilom, ko se je število celic v radialnem nizu pričelo večati. Maksimalno širino je kambijeva cona dosegla 20. junija (od 10 do 13 celic v radialnem nizu), nato pa se je pričela zopet ožati (na 4 do 6 slojev v radialnem nizu). Med 25. julijem in 22. avgustom 2006 so se delitve v kambijeve coni zaključile. Meritve širin ksilemske branike so pokazale, da prirastek skozi rastno sezono sledi krivulji oblike črke S, s počasnejšim prirastkom na začetku, hitro rastjo na sredini in upadom na koncu. Slika 3 kaže, da je večina branike pri bukvah s Panške reke v rastni sezoni 2006 nastala že do sredine julija.

S pomočjo selektivnega obarvanja preparatov s safraninom in astra modrim ter z opazovanjem pod polarizirano svetlobo smo določili tudi posamezne faze razvoja celic (vlakna, traheje in aksialni parenhim) v ksilemski braniki (slika 1a, b). Nelignificirana tkiva sestavljena le iz celuloze in hemiceluloz se obarvajo modro, medtem ko rdeče obarvana tkiva nakazujejo prisotnost lignina. Začetek sinteze sekundarne celične stene lahko ugotovimo z opazovanjem tkiv v polarizirani svetlobi, saj se sekundarna stena zaradi vzporedne usmerjenosti celuloznih mikrofibril sveti (slika 1b).

S svetlobnim mikroskopom smo prve celice v fazi postkambialne rasti opazili na preparatih odvzetih 24. aprila 2006. Celice tik pod kambijevo cono so imele nekoliko večje radialne dimenzije in modro obarvane celične stene (slika 1a). Konec postkambialne rasti in začetek sinteze sekundarne ste-

ne smo zasledili konec aprila (slika 1b) tako v vlaknih kot v trahejah. Lignifikacija vlaken se je začela med 24. aprilom in 3. majem 2006. Pet tednov kasneje so bile njihove celične stene popolnoma oblikovane in lignificirane. Ker je celična stena trahej zelo tanka, je na trajnih mikroskopskih preparatih zelo težko opazovati njene razvojne faze. Na nekaterih preparatih pa smo kljub temu opazili, da so se celične stene trahej prej obarvale rdeče kot celične stene vlaken, iz česar smo sklepali da poteka lignifikacija trahej nekoliko hitreje.

Na preparatih vzorcev odvzetih 3. maja 2006 je srednja debelina celičnih sten vlaken znašala 1,1  $\mu\text{m}$ , konstantno vrednost (5  $\mu\text{m}$ ) pa je pri prvo nastalih vlaknih dosegla 20. junija 2006 (slika 1c). Debelitev celičnih sten trahej je potekala hitreje kot debelitev sten vlaken. Na vzorcih odvzetih 3. maja 2006 je bila celična stena trahej tako tanka, da je z uporabljenim metodo nismo mogli natančno izmeriti. Teden dni kasneje pa so celične stene trahej dosegle končno debelino (1,5  $\mu\text{m}$ ). Postkambialno rast in debelitev celične stene aksialnega parenhima je bilo v začetnem delu vegetacijske dobe težko spremljati, saj je v postkambialni fazi rasti razlikovanje med vlakni in aksialnim parenhimom zaradi morfološke podobnosti celic zelo oteženo.

## UV – MIKROSPEKTROFOTOMETRIJA

### UV – MICROSPECTROPHOTOMETRY

Medtem ko selektivno obarvani preparati namenjeni za svetlobno mikroskopijo omogočajo le kvalitativno spremljanje odlaganja lignina na celičnem nivoju, UV – mikrospektrofotometrija omogoča polkvantitativno določanje vsebnosti lignina (slika 1 d, f, g, h). Slika 1d prikazuje primer UV fotografije posnete pri valovni dolžini 280 nm. Na temnejših delih slike je koncentracija lignina večja, na svetlejših pa manjša. Podobno kot svetlobna mikroskopija ali TEM ta tehnika ne omogoča kvalitativnega določanja vsebnosti lignina.

Slika 2 prikazuje primerjavo spektrov različnih morfoloških področij, ki smo jih posneli s konvencionalnimi točkovnimi meritvami pri valovni dolžini med 240 nm in 400 nm. Meritve smo opravili v: celičnih vogalih, združeni srednji lameli, ter sekundarni steni vlaken, trahej in aksialnega parenhima. Spektri so potrdili, da se absorpcijski maksimum vlaken, celičnih vogalov in združene srednje lamele nahaja pri valovni dolžini 278 nm, kar je značilno za listavce. Absorpcijski maksimum trahej se nekoliko razlikuje, saj se nahaja pri valovni dolžini 280 nm in znaša  $\text{abs}_{280}$  0,23.

Iz spektrov je razvidno, da so absorpcijske vrednosti sekundarne celične stene vlaken najmanjše, maksimum se nahaja pri valovni dolžini 278 nm, absorpcijska vrednost pa znaša  $\text{abs}_{278}$  0,14. Največje vrednosti lahko izmerimo v celičnih vogalih vlaken do  $\text{abs}_{278}$  0,33. V celični steni aksialnega parenhima in v združeni srednji lameli pa so absorpcijske vrednosti primerljive in so med  $\text{abs}_{278}$  0,18 in 0,21.

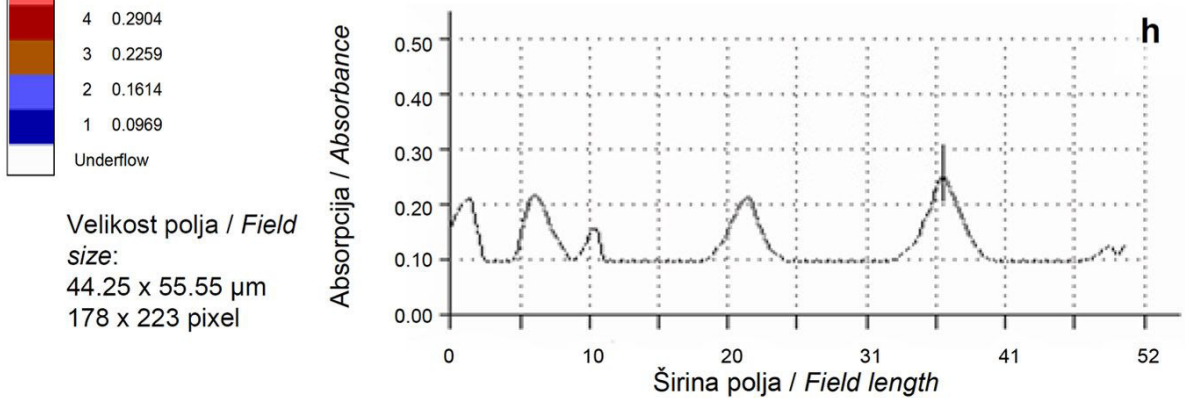
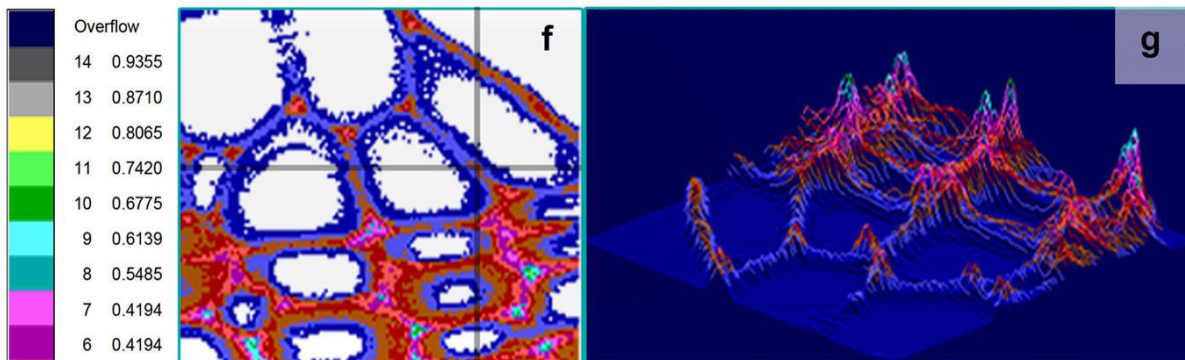
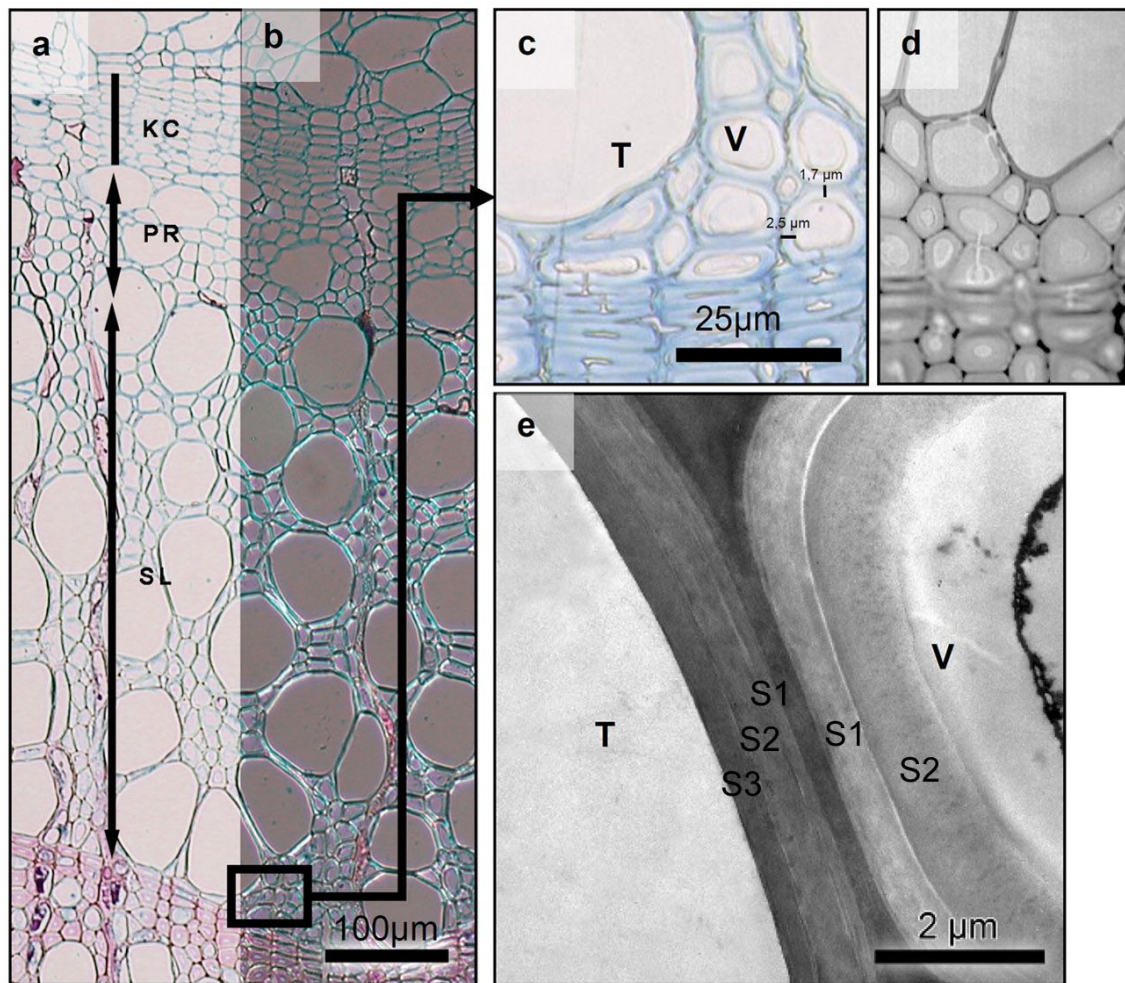
Skenirna funkcija naprave UMSP 80 omogoča vizualizacijo porazdelitve lignina v ksilemskem tkivu pri konstantni valovni dolžini 278 nm in ločljivosti 25  $\mu\text{m}^2$  na piksel. Slika 1f prikazuje tipičen dvo-dimenzionalen UV-posnetek porazdelitve lignina v celičnih stenah vlaken in trahej, slika 1g pa tri-dimenzionalnega. 16-barvna skala prikazuje različne absorpcijske vrednosti, iz katerih lahko sklepamo o vsebnosti lignina v posameznih morfoloških področjih stene. Na sliki 1f so prikazane absorpcijske vrednosti celic tik ob letnici vzorca odvzetega 16. junija 2006; celice v zgornji polovici slike predstavljajo nastajajočo braniko 2006, celice v spodnji polovici pa zaključni del branike 2005.

Lignifikacija v celični steni vlaken in trahej se je pričela med 3. in 9. majem 2006. Nizke absorpcijske vrednosti smo najprej izmerili v celičnih vogalih (CV) in združeni srednji lameli (ZSL) (pribl.  $\text{abs}_{278}$  0,09). Teden dni kasneje se je lignifikacija pričela v sekundarni celični steni (S2) ter nadaljevala v centripetalni smeri proti lumnu. Absorpcijske vrednosti v CV so se povečale na  $\text{abs}_{278}$  0,22, v združeni srednji lameli na pribl.  $\text{abs}_{278}$  0,16. Skenirna tehnika je potrdila, da lignifikacija celične stene pri trahejah poteka bistveno hitreje kot pri vlaknih. Pri trahejah so bile od 16. maja 2006 naprej absorpcijske vrednosti konstantne, približno  $\text{abs}_{278}$  0,29. Prva popolnoma lignificirana vlakna smo zaznali šele 20. junija 2006 oz. dva meseca po njihovem nastanku (slika 3). Absorpcijske vrednosti različnih morfoloških področij so v tem obdobju primerljive z vrednostmi spektrov s slike 2. UV – absorpcijska vrednost celičnih vogalov je približno  $\text{abs}_{278}$  0,41, združene srednje lamele  $\text{abs}_{278}$  0,26 in sekundarne stene vlaken med  $\text{abs}_{278}$  0,16 in 0,22.

## TRANSMISIJSKA ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA

### TRANSMISSION ELECTRON MICROSCOPY

Diferenciacijo ksilemskega tkiva smo spremljali tudi s transmisijskim elektronskim mikroskopom na rezinah obarvanih s kalijevim permanganatom. Ta tehnika omogoča kvalitativno opazovanje nastajanja celične stene na subcelularnem



Slika 1: Prečni prerezi lesa vzorcev bukve (*Fagus sylvatica*), ki smo jih odvzeli 16. junija 2006 in posneli z različnimi mikroskopskimi tehnikami pri različnih povečavah: a) svetlobni mikroskop (SM), svetlo polje, preparat debeline 10  $\mu\text{m}$ , obarvanje s safraninom (rdeče) in astra modrim (modro), širina ksilemske branike (PR + SL) ter kambijeve cone (KC); različne faze diferenciacije ksilemskega tkiva: celice v fazi postkambialne rasti (PR) in v fazi odlaganja sekundarne celične stene oz. lignifikacije (SL). KC je široka pribl. 10 celic. b) SM, polarizirana svetloba; preparat debeline 10  $\mu\text{m}$ , celice KC in PR temne, celice SL se svetijo. c) SM, svetlo polje, obarvanje s toluidin modrim, preparat debeline 1  $\mu\text{m}$ , celice kjer poteka odlaganje celične stene (T – traheja, V-vlakno). d) UV mikroskop, preparat debeline 1  $\mu\text{m}$ , monokromatska svetloba valovne dolžine 280 nm. e) transmisijski elektronski mikroskop (TEM), kontrastiranje s kalijevim permanganatom, preparat debeline 100 nm; sloji celične stene S1, S2, S3 (temneje obarvani sloji so bolj lignificirani); T-traheja, V-vlakno. f, g, h) UV – mikrospektrofotometer (UMSP), UV-absorpcijske vrednosti pri valovni dolžini 278 nm (višje vrednosti predstavljajo višjo stopnjo lignifikacije): f) razporeditev UV-absorpcijskih vrednosti po prečnem prerezu - dvodimenzionalni prikaz in g) tridimenzionalni prikaz. h) Absorpcija v odvisnosti od širine skeniranega polja ( $\mu\text{m}$ ), na mestu, ki ga označuje križ na sliki f).

Fig. 1: Cross-sections of beech (*Fagus sylvatica*) xylem on 16 June 2006 visualized with different microscopy techniques: a) light microscope (LM), bright field, section 10  $\mu\text{m}$  thick, safranin (red) and astra blue staining; the width of the xylem growth ring (PR + SL) and the cambium zone (KC); various stages of xylem differentiation: the cells in stage of post-cambial growth (PR) and secondary wall deposition (SL). The cambium zone is approximately 10 cells thick. b) LM, polarized light, section 10  $\mu\text{m}$  thick; KC and PR cells dark, the cell wall of SL cells bright. c) LM, bright field, toluidin blue staining, section 1  $\mu\text{m}$  thick; the deposition of secondary cell wall (T – vessel, V – fibre). d) UV – microscope, unstained, section 1  $\mu\text{m}$  thick, monochromatic light with wavelength 280 nm. e) Transmission electron microscope (TEM), potassium permanganate staining, section 100 nm thick, the layers of the cell wall (S1, S2, S3); darker parts contain more lignin. f, g, h) UV – microspectrophotometer (UMSP); UV-absorption values at a constant wavelength of 278 nm, higher values indicate higher lignin content: f) distribution of higher UV-absorption values on cross-section – two-dimensional image and g) three-dimensional image. h) Absorption in relation to field length (line profile) on the position marked with the cross on picture f).

nivoju. Odlaganje posameznih plasti celične stene ter potek lignifikacije lahko pri TEM spremljamo na podlagi sivih odtenkov na sliki, ki so posledica različne prehodnosti tkiva za elektrone (SCHMITT / MELCHER 2003, GRIČAR / ČUFAR 2004).

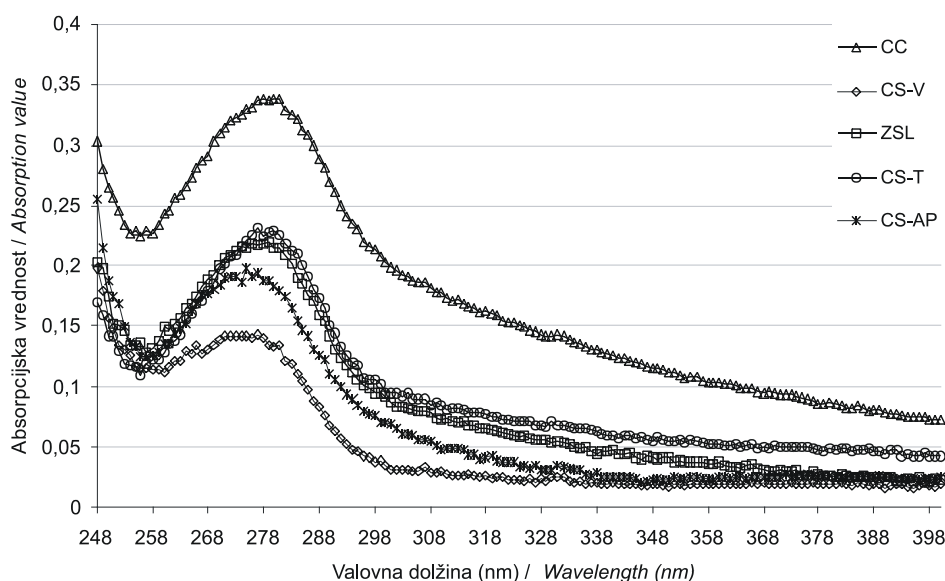
TEM slike potrjujejo, da se je celična stena ksilemskih celic pričela odlagati šele 3. maja, zato tedaj ni bilo mogoče zaznati vsebnosti lignina z UV mikrospektrofotometrom. Glede na absorpcijske vrednosti v celični steni trahej smo predvidevali, da se je lignifikacija 16. maja 2006 že zaključila, vendar pa je TEM pokazal, da so popolnoma oblikovani vsi trije sloji sekundarne stene (S1, S2 in S3), medtem ko se bradavičasti sloj (W) še ni odložil (slika 1e). Kontrastiranje s kalijevim permanganatom kaže, da je koncentracija lignina v S1 traheje največja. Manjša elektronska gostota v preostalih dveh slojih sekundarne celične stene kaže na nekoliko nižjo koncentracijo lignina, kar potrjuje meritve UV-absorpcijskih vrednosti. Celična stena vlakna na sliki 1e je sestavljena iz dveh slojev, S1 in nastajajočega S2. Manjša elektronska gostota v že lignificiranem sloju S1 vlakna dokazuje, da je koncentracija lignina nekoliko manjša kot v celični steni traheje. V sloju S2 se je pričel odlagati celulozni skelet, nizke absorpcijske vrednosti izmerjene z UMSP (slika 1e) pa nakazujejo, da se je na perifernem delu S2 že pričel inkrustirati lignin. Popolnoma oblikovana vlakna smo s TEM opazili 20. junija 2006.

## RAZPRAVA DISCUSSION

Odvzem tkiv iz dreves v tedenskih razmakih tekom rastne sezone in svetlobna mikroskopija omogočata rekonstrukcijo nastajanja ksilemske branike ter ovrednotenje dinamike priraščanja. Okvirno je mogoče določiti posamezne faze nastajanja ksilemske branike. Vendar pa ločljivost konvencionalne svetlobne mikroskopije (največ 200 nm) omejuje podrobnejše raziskave celične stene (GOODHEW / HUMPHREYS / BEANLAND 2000).

Nastajanje lesa pri bukvi je bilo v preteklosti relativno malo raziskano. Tej temi so pozornost posvečali predvsem znanstveniki iz Nemčije (SCHMITT / MÖLLER / ECKSTEIN 2000) in Nizozemske (WERF van der / SASS-KLAASSEN / MOHREN 2007). Če primerjamo rezultate tujih raziskovalcev z našimi, lahko opazimo, da se rezultati razlikujejo predvsem v času reaktivacije in zaključka celičnih delitev v kambijeve coni, pa tudi po dinamiki priraščanja ksilemske branike. To bi lahko pojasnili predvsem z različnimi klimatskimi razmerami v Sloveniji in omenjenih državah.

Pri meritvah debeline celičnih sten lesnih celic tekom vegetacijske dobe smo opazili, da debelitev celične stene trahej poteka bistveno hitreje kot pri vlaknih. Naši rezultati so v skladu z ugotovitvami YOSHINAGE in sodelavcev (1997),



Slika 2: UV absorpcijski spektri različnih morfoloških področij ksilema bukve pri valovni dolžini med 240 in 400 nm. (CV) celični vogali, (CS-V) celična stena vlakna, (ZSL) združena srednja lamela med vlakni, (CS-T) celična stena traheje, (CS-AP) celična stena aksialnega parenhima.

Figure 2: UV absorbance spectra of different morphological regions of beech xylem at wavelengths from 240 to 400 nm. (CV) cell corners, (CS-V) fibre cell wall, (ZSL) compound middle lamella between fibres, (CS-T) vessel cell wall, (CS-AP) axial parenchyma cell wall.

ki so raziskovali debelitev in lignifikacijo ksilemskega tkiva v japonskem hrastu (*Quercus mongolica* Fischer var. *grosseserrata* Rehd. Et Wils.). Selektivno obarvanje preparatov je potrdilo, da lignifikacija trahej poteka hitreje. Vzrok je najverjetneje v težnji po čimprejšnjem prevzemu funkcije prevajanja vode (SASS 1993, YOSHINAGA / FUJITA / SAIKI 1997).

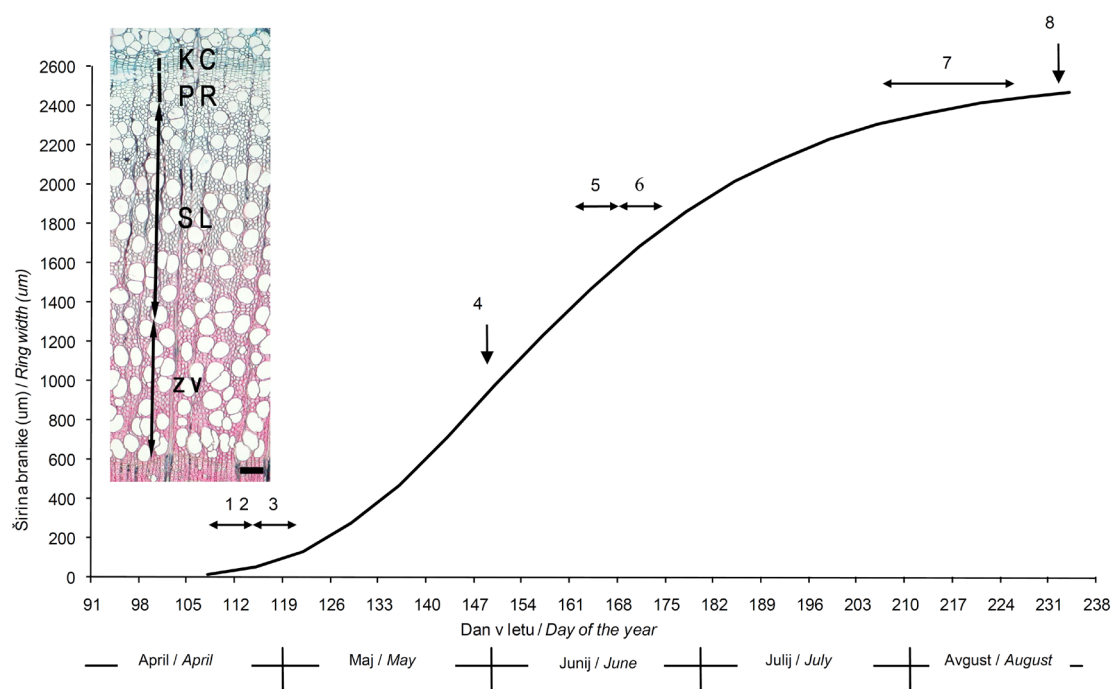
UV – mikrospektrofotometrija in transmisijska elektronska mikroskopija sta medsebojno dopolnjujoči mikroskopski tehniki (SCHMITT / MELCHER 2003, GRIČAR / ČUFAR 2004) in omogočata spremljanje nastajanja ksilemske branike ter topokemijske raziskave na subceličnem nivoju (KOCH / GRÜN WALD 2004).

UV – absorpcijski spektri različnih morfoloških področij ksilemske branike so pokazali razlike v sestavi lignina v celični steni trahej in vlaken. FERGUS in GORING (1970a, 1970b) in TERASHIMA (2000) so dokazali da je lignin v celični steni trahej sestavljen pretežno iz močno absorbirajočih gvajacilnih enot, medtem ko je celična stena vlaken sestavljena iz manj absorbirajočih siringilnih enot. Večja koncentracija siringilnih enot povzroči pomik lokalnega maksimuma proti nižjim vrednostim valovne dolžine (YOSHIDA / OHTA / YAMAMOTO 2002). UV absorpcijski spektri celičnih vogalov imajo največjo absorpcijsko vrednost (slika 2), ravno tako je gostota elektronov na TEM mikrografih tam največja (slika 1f), iz česar lahko sklepamo, da imajo največjo koncentracijo lignina, ki je pretežno sestavljen iz gvajacilnih enot, kar

je skladno s splošnim konceptom lignifikacije za listavce in iglavce (FRANKENSTEIN / SCHMITT / KOCH 2006).

V primerjavi s svetlobno mikroskopijo in selektivnim obarvanjem preparatov, omogoča UMSP 80 in skenirna funkcija bistveno natančnejšo določitev posameznih faz nastajanja ksilemske branike. Če smo na podlagi selektivnega obarvanja lahko le okvirno določili pričetek in konec lignifikacije posameznih celičnih tipov, je natančnost pri UV-mikrospektrofotometriji bistveno večja. GRIČAR s sodelavci (2005a) in GRIČAR (2007) so s to metodo spremljali diferenciacijo terminalnih traheid v lesu jelke in natančno določili zaključek lignifikacije. Ker pa tudi pri tej tehniki ločljivost ni veliko boljša kot pri svetlobni mikroskopiji, je koristno rezultate podkrepiti še s transmisijsko elektronsko mikroskopijo, ki omogoča ločljivost do 0,2 nm (GOODHEW / HUMPHREYS / BEANLAND 2000). Kakor prikazuje slika 1f, je mogoče s to tehniko spremljati lignifikacijo posameznih slojev celične stene.

Različni avtorji so prišli do zaključkov, da se lignin prične odlagati v celičnih vogalih in združeni srednji lameli, medtem ko se oblikuje sloj S1. Lignifikacija se nato nadaljuje v centripetalni smeri, obenem pa se odlaga celulozni skelet v S2. Najbolj intenzivna je lignifikacija, ko se oblikuje S3 sloj. Lignifikacija se nadaljuje v smeri proti celičnem lumnu, dokler celotna stena ni lignificirana (TERASHIMA 2000, MELLE-ROWICZ *et al.* 2001, DONALDSON 2001). V naši raziska-



Slika 3: Dinamika in mejniki nastajanja ksilemske branike pri bukvi (*Fagus sylvatica*) s Panške reke med vegetacijsko dobo 2006 (dan v letu oz. koledarski datum) ter prečni prerez razvijajoče se branike na dan 191 (10. julij) 2006 (KC – kambijeva cona, PR – celice v fazi postkambialne rasti, SL – celice v fazi sinteze sekundarne stene in lignifikacije, ZV – zrele celice). (1) začetek delitev v kambijevi coni med 18. in 24. aprilom (dan 108- 114), (2) maksimalna širina kambijeve cone (okoli 24. aprila oz. okoli dneva 114), (3) pričetek odlaganja sekundarne celične stene med 24. aprilom in 2. majem (dan 114-122), (4) maksimalna celična produkcija (okoli 29. maja oz. okoli dneva 149), (5) prva dokončno diferencirana vlakna med 13. in 20. junijem (dan 164-171), (6) število celic v kambijevi coni se prične manjšati med 20. in 27. junijem (dan 171-178), (7) zaključek celičnih delitev med 25. julijem in 16. avgustom (dan 206-228), (8) dokončno izoblikovana ksilemska branika (22. avgusta; dan 234).

Figure 3: Dynamics and milestones of wood formation in beech (*Fagus sylvatica*) from the forest side Panška reka during the 2006 vegetation season (Day of the year and date) and cross-sections of the developing tree-ring on day 191 (10 July) 2006 (KC – cambial zone, PR – cells in phase of postcambial growth, SL – synthesis of secondary cell wall and lignification, MT – mature cells). (1) Onset of divisions in cambial zone between 18 and 24 April (day 108-114); (2) Maximum width of cambial zone (around 24 April or around day 114); (3) Begin of secondary wall formation between 24 April and 2 May (day 114-122); (4) Maximum dynamics of cell production (around 29 May or around day 149); (5) First fully differentiated fibres between 13 and 20 June (day 164-171); (6) Number of cells in cambial zone starts to decrease between 20 and 27 June (day 171-178); (7) Cessation of divisions in cambial zone between 25 July and 16 August (day 206-228); (8) Fully formed xylem (22 August or day 234).

vi smo prišli do podobnih ugotovitev, celoten proces pa smo postavili še v časovni okvir, s čimer smo lahko določili tudi kinematiko diferenciacije vlaken in trahej.

## ZAKLJUČKI CONCLUSIONS

Svetlobna mikroskopija (svetlo polje in polarizirana svetloba) in sistem za analizo slike sta primerna za spremljanje nastajanja branike na celičnem nivoju. Selektivno obarvanje s safraninom in astra modrim ter polarizirana svetloba omogočajo okvirno določitev posameznih faz nastajanja celic ksi-

lemske branike. Za natančnejše raziskave diferenciacije celičnega tkiva na subceličnem nivoju sta se izkazali za zelo primerni dopolnjujoči se UV – mikrospektrofotometirja (UMSP) in transmisijiska elektronska mikroskopija (TEM). Točkovne meritve UV – mikrospektrofotometra omogočajo spektralno analizo posameznih morfoloških področij. Na podlagi oblike spektrov lahko sklepamo o kemični sestavi lignina, absorpcijska vrednost pa poda informacije o njegovi koncentraciji v tkivu in celičnih stenah posameznih celic. Absorpcijske vrednosti pri konstantni valovni dolžini, poljubnega področja ksilemske branike lahko izmerimo s pomočjo skenirne funkcije naprave in tako dobimo vpogled v porazdelitev lignina na



izbranem morfološkem področju. Transmisijska elektronska mikroskopija in kontrastiranje s kalijevim permanganatom omogočata le kvantitativno določanje lignina, vendar lahko zaradi visoke ločljivosti in povečav opazujemo tudi proces diferenciacije posameznih slojev celičnih sten.

Vse tri metode v kombinaciji omogočajo da lahko na tedensko odvzetih vzorcih tkiv natančno rekonstruiramo nastanjanje kislemske branike tekom vegetacijske dobe. Tovrsten pristop je bil v pričujočem članku prvič uporabljen za študij nastanka lesa na celičnem in subceličnem nivoju. Ugotovili smo, da so se delitve v kambiju začele konec aprila in končale od konca julija do sredine avgusta. Pretežni del branike je nastal od maja do julija. Razvoj prvih trahej je trajal približno en mesec, prvih vlaken pa približno dva meseca.

## SUMMARY

We studied wood formation in beech (*Fagus sylvatica*) using the intact tissue samples containing xylem, cambial zone and phloem. They were collected at weekly intervals during the 2006 vegetation period from living trees at the forest site Panška reka (400 m a.s.l.), near Ljubljana, Slovenia. We present the results obtained by using three microscopy techniques: light microscopy (LM), UV – microspectrophotometry (UMSP), and transmission electron microscopy (TEM). For LM (transmission and polarized light modes) we embedded the samples in paraffin, cut the slides with a rotary microtome (thickness 10  $\mu\text{m}$ ), and stained them with safranin and astra blue. For TEM and UMSP the parallel samples were embedded in epoxy resin (according to Spurr) and then semi thin (1  $\mu\text{m}$ ) and ultra thin (90 – 100 nm) slides were prepared. The semi-thin sections stained with toluidin blue were observed and analysed under the light microscope and the unstained ones with UMSP. Ultra-thin sections were stained with potassium permanganate for detection of lignin and observed with TEM. We investigated the cambial activity and followed the xylem formation. With LM the differentiation of individual cells was determined by using selective staining (detection of lignin) and polarized light (detection of cellulose). UMSP enabled us observation of the differentiating tissue and semi-quantitative determination of lignin content. With TEM we followed the deposition of cell wall layers and their lignification. The combination of the described methods enabled us to study the formation of cells and their cell-walls during the vegetation period. LM revealed that cell divisions in cambium started at the end of April and ended from the

end of July till mid August. The main part of the growth ring was formed in three months (May, June and July). UMSP and TEM showed that the lignification dynamics differed in the fibres and in the vessels. The cell walls of the first formed vessels were completed in approx. one month and the fibre cell walls in two months.

Acknowledgement. The work was supported by the Slovenian Research Agency and by SOCRATES / ERASMUS bilateral agreement between the University of Ljubljana and University of Hamburg. The work was conducted in the laboratories of the Department of Wood Science and Technology and Department of Biology-Laboratory of Histology and Electron Microscopy (Biotechnical Faculty, University of Ljubljana) and in the laboratories of the Institute for Wood Biology at the (Johann Heinrich von Thünen- Institute and University of Hamburg). We thank Marko Beber, Luka Krže, Tanja Potsch, Dr. Jasna Štrus, Dr. Magda Tušek Žnidarič, and Martin Zupančič for their great help and support during various phases of our work.

## ZAHVALA

Delo je financirala ARRS Javna agencija za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije in SOCRATES / ERASMUS bilateralni sporazum med Univerzo v Ljubljani in Univerzo v Hamburgu. Raziskave so bile opravljene na Katedri za tehnologijo lesa Oddelka za lesarstvo in v Laboratoriju za histologijo in elektronsko mikroskopijo Oddelka za biologijo (Biotehniška fakulteta Univerza v Ljubljani) ter na Oddelku za lesno biologijo (Inštitut Johann Heinrich von Thünen in Univerza v Hamburgu). Pri različnih fazah raziskav so nam bili v veliko pomoč Marko Beber, Luka Krže, Tanja Potsch, dr. Jasna Štrus, dr. Magda Tušek Žnidarič, in Martin Zupančič. Za njihovo pomoč se jim iskreno zahvaljujemo.

## VIRI

## REFERENCES

- ČUFAR, K., 2006. Anatomija lesa. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo, 185 s.
- ČUFAR, K. / PRISLAN, P. / DE LUIS, M. / GRIČAR, J., 2008. Tree-ring variation, wood formation and phenology of beech (*Fagus sylvatica*) from a representative site in Slovenia, SE Central Europe. Trees, In print
- DONALDSON, L. A., 1992. Lignin distribution during latewood formation in *Pinus radiata* D. Don. IAWA Bulletin, 13: 381-387
- DONALDSON, L. A., 2001. Lignification and lignin topochemistry - an ultrastructural view. Phytochemistry, 57: 859-873
- FERGUS, B. J. / GORING, D. A. I., 1970a. The distribution of lignin in birch wood as determined by ultraviolet microscopy Holzforschung, 24: 118-124

- FERGUS, B. J. / GORING, D. A. I., 1970b. The location of guaiacyl and syringyl lignins in birch xylem tissue. *Holzforschung*, 24: 113-117
- FRANKENSTEIN, C. / SCHMITT, U. / KOCH, G., 2006. Topochemical studies on modified lignin distribution in the xylem of poplar (*Populus* spp.) after wounding. *Annals of Botany*, 97: 195-204
- GOODHEW, P. J. / HUMPHREYS, J. / BEANLAND, R., 2000. Electron microscopy and analysis. Third edition. London, New York, Taylor and Francis, 251 s.
- GRIČAR, J., 2006. Vpliv temperature in padavin na ksilogenezo pri jelki (*Abies alba*) in smreki (*Picea abies*). Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelke za lesarstvo, 181 s.
- GRIČAR, J., 2007. Ksilolo- in floemogeneza pri beli jelki (*Abies alba* Mill.) in navadni smreki (*Picea abies* (L.) Karst.). Ljubljana, Gozdarski inštitut Slovenije, 106 s.
- GRIČAR, J. / ČUFAR, K., 2004. Uporaba transmisivne elektronske mikroskopije ter UV-mikrospektrofotometrije za določanje lignina v celični steni iglavcev. *Zbornik gozdarstva in lesarstva*, 73: 89 - 104
- GRIČAR, J. / ČUFAR, K. / OVEN, P. / SCHMITT, U., 2005a. Differentiation of terminal latewood tracheids in silver fir trees during autumn. *Annals of Botany*, 95: 959-965
- GRIČAR, J. / OVEN, P. / ČUFAR, K., 2005a. Sezonska dinamika ksilogeneze in floemogeneze pri navadni jelki (*Abies alba* Mill.). *Zbornik gozdarstva in lesarstva*, 78: 57-68
- GRIČAR, J. / OVEN, P. / ČUFAR, K., 2005b. Vpliv eksogenih in endogenih dejavnikov na ksilogenezo. *Les*, 57: 228-233
- GRIČAR, J. / OVEN, P. / ČUFAR, K., 2006. Metode za raziskave sezonske dinamike kambijeve aktivnosti. *Les*, 58: 272-277
- GRIČAR, J. / ZUPANČIČ, M. / ČUFAR, K. / OVEN, P., 2005b. Odziv kambija navadne smreke (*Picea abies*) na ogrevanje in hlajenje debla. *Zbornik gozdarstva in lesarstva*, 75: 13-146
- KOCH, G. / GRÜNWARD, C., 2004. Application of UV microspectrophotometry for the topochemical detection of lignin and phenolic extractives in wood fibre cell walls. V: *Wood fibre cell walls: methods to study their formation, structure and properties* (Ured: Schmitt, U., et al.). Uppsala, Sweden: Swedish University of Agricultural Sciences, 119 - 129
- KOCH, G. / KLEIST, G., 2001. Application of Scanning UV Microspectrophotometry to Localise Lignins and Phenolic Extractives in Plant Cell Walls. *Holzforschung*, 55: 563-567
- MARION, L. / GRIČAR, J. / OVEN, P., 2007. Wood formation in urban Norway maple trees studied by the micro-coring method. *Dendrochronologia*, 25: 97-102
- MELLEROWICZ, E. J. / BAUCHER, M. / SUNDBERG, B. / BOERJAN, W., 2001. Unravelling cell wall formation in woody dicot stem. *Plant Molecular Biology*, 47: 239 - 274
- MURMANIS, L. / SACHS, B. I., 1973. Cell wall formation in secondary xylem of *Pinus strobus* L. *Wood Science and Technology* 7: 173-188
- PLOMION, C. / LEPROVOST, G. / STOKES, A., 2001. Wood formation in trees. *Plant physiology*, 127: 1513 - 1523
- RODER, T. / KOCH, G. / SIXTA, H., 2004. Application of confocal Raman spectroscopy for the topochemical distribution of lignin and cellulose in plant cell walls of beech wood (*Fagus sylvatica* L.) compared to UV microspectrophotometry. *Holzforschung*, 58: 480-482
- SASS, U., 1993. Die Gefäße der Buche als ökologische Variable - Bildanalytische Erfassung, dendroklimatologische Prüfung, ökologische Bewertung. Doktorarbeit. Hamburg, Universität Hamburg, 172 s.
- SCHMITT, U. / GRÜNWARD, 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
- SCHMITT, U. / MELCHER, E., 2003. Section staining with potassium permanganate for transmission electron microscopy: a useful tool for lignin localisation. V: *Wood fibre cell walls: methods to study their formation, structure and properties* (Ured: Schmitt, U., et al.). Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden, 105-118
- SCHMITT, U. / MÖLLER, R. / ECKSTEIN, D., 2000. Seasonal wood formation dynamics of beech (*Fagus sylvatica* L.) and black locust (*Robinia pseudoacacia* L.) as determined by the "pinning" technique. *Journal of Applied Botany*, 74: 10-16
- SPURR, A. R., 1969. A low viscosity embedding medium for electron microscopy. *Journal of Ultrastructural Research*, 26: 31 - 43
- TERASHIMA, N., 2000. Formation and ultrastructure of lignified plant cell walls. V: *New horizons in wood anatomy. Proceedings of the 4th Pacific Regional Wood Anatomy Conference* (Ured: Kim, Y. S.). Chonnam National University Press, Kwangju, South Korea 169-180
- WERF, van der G. W. / SASS-KLAASSEN, U. / MOHREN, G. M. J., 2007. The impact of the 2003 summer drought on the intra-annual growth pattern of beech (*Fagus sylvatica* L.) and oak (*Quercus robur* L.) on a dry site in the Netherlands. *Dendrochronologia*, 25: 103-112
- YOSHIDA, M. / OHTA, H. / YAMAMOTO, H., 2002. Tensile growth stress and lignin distribution in the cell walls of yellow poplar (*Liriodendron tulipifera* Linn.). *Trees - Structure and Function*, 16: 457-464
- YOSHINAGA, A. / FUJITA, M. / SAIKI, H., 1997. Secondary wall thickening and lignification of oak xylem components during latewood formation. *Mokuzai Gakkaishi*, 43: 377 - 383