

Bradavičasti sloj

Warty layer

avtorici **Jožica GRIČAR, Katarina ČUFAR**, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo, Rožna dolina, Cesta VIII/34, SI-1000 Ljubljana

izvleček / Abstract

Bradavičasti sloj pokriva notranji S3 sloj sekundarne celične stene ob lumnu. V članku je opisano odkritje bradavičastega sloja, kje ga najdemo in kakšen je njegov pomen. Podan je njegov nastanek ter morfološka in kemijska zgradba. Predlagane so tri alternativne hipoteze izvora bradavic.

Warty layer covers inner S3 layer of secondary cell wall. In paper, detection of warty layer, its occurrence and significance is described. Development of warty layer and morphological and chemical features are given. Three alternative hypotheses are offered to explain origin of warts.

Ključne besede: bradavičasti sloj, bradavice, celična stena, les, elektronska mikroskopija

Keywords: warty layer, warts, cell wall, wood, electron microscopy

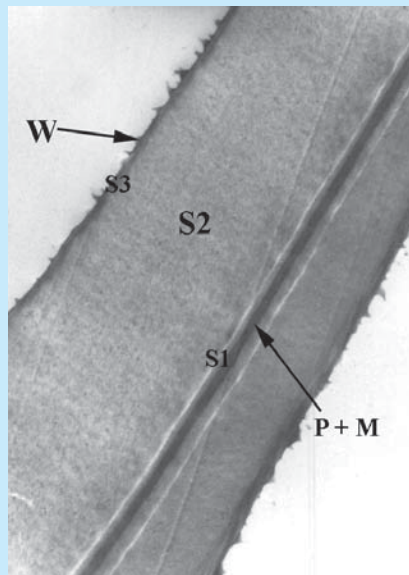
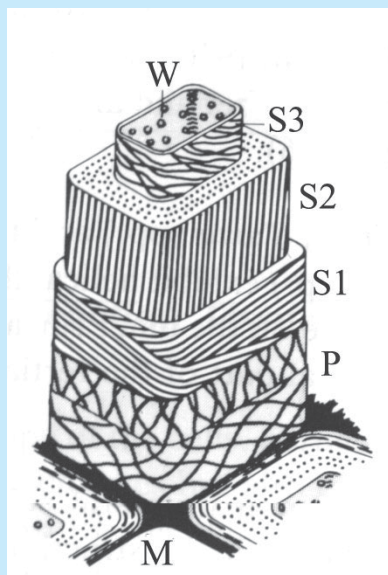
Kje najdemo bradavičasti sloj

Bradavičasti sloj je opazen v traheidah številnih iglavcev, v trahejah in včasih tudi v vlaknih nekaterih listavcev. Lahko se pojavi v lesnih celicah vzdolž celotnega drevesa, t.j. v ranem in kasnem lesu, v beljavi in jedrovini, v reakcijskem lesu, v deblu, vejah in koreninah. Oblikuje se na notranji strani sloja S3 sekundarne celične stene ob lumnu (slika 1). Najdemo ga tudi v celicah, ki imajo spiralne oziroma helikalne odebelitve, kjer bradavice pokrivajo tako celično steno kot odebelitve. Struktura je opazna v kamricah obokanih pikenj ter v kanalih enostavnih pikenj. Bradavice v piknjah so navadno manjše ter enotnejših velikosti (Liese 1965). Po Bairdu in sod. (1974) naj bi bile bradavice v celičnih stenah filogenetski znak. V traheidah iglavcev in celicah primitivnih listavcev naj bi bile bradavice šestokrat vidne, z evolucijskim razvojem in s specializacijo celic pa naj bi sloj pričel postopoma izginjati (Fengel in Wegener 1989, Fujita in Harada 1991).

Odkritje bradavičastega sloja

Bradavičasti sloj oziroma bradavice so v celični steni odkrili šele z uporabo transmissijskega elektronskega mikro-

skopa (TEM) v 50. letih prejšnjega stoletja. Na Japonskem sta bila pionirja na področju TEM Kobayashi in Utusumi, ki sta leta 1951 opazila membrano bradavic, a se ob tem nista zavedala, da sta odkrila novo celično strukturo. Prvi elektronski mikroskopisti so veliko novih nepoznanih struktur pripisovali artefaktom, predvsem zaradi slabe kvalitete tedanjih ultratankih rezin. Rezin so pripravljali s steklenimi noži, ki se zelo hitro obrabijo, zlasti pri trdih in nehomogenih strukturah, kot je npr. olesenela celična stena. Fischbein v bradavicah, ki jih je zasledil v območju obokanih pikenj sekoje *Sequoia sempervirens*, ni prepoznal nove strukture, pač pa je menil, da opazuje kapljice smole. Po vsej verjetnosti je bil to eden prvih elektronskih mikroposnetkov bradavičastega sloja pred letom 1950 (Coté 1981). Leta 1952 so Liese in Fahrenbrock v Nemčiji ter Harada in Miyazaki na Japonskem bistveno izboljšali postopek priprave ultratankih rezin in z večjim zaupanjem interpretirali strukture, ki so jih opazili na slikah. Pričeli so poročati o strukturi delcev (ang. "particle structure", nem. "kleine Erhebungen") oziroma o strukturi, podobni bradavicam (ang. "wart-like", nem. "warzenähnlich"). Kasneje jih je Liese poimenoval bradavičasta struk-



□ Slika 1. A – Model strukture celične stene (po Fengel in Wegener 1989). B – Slojevita celična stena traheid pri navadni jelki (*Abies alba*) s TEM (povečava: 11840-krat). M – srednja lamela, P – primarna celična stena, S1 – zunanji sloj sekundarne celične stene, S2 – srednji sloj sekundarne celične stene, S3 – notranji sloj sekundarne celične stene, W – bradavičasti sloj

tura (ang. “wart-structure”, nem. “Warzenstruktur”). Po podrobnejših raziskavah o njegovem izvoru ter značilnostih se je danes splošno uveljavil ustrenejši izraz bradavičasti sloj (ang. “warty layer” nem. “Warzenschicht”) (Liese 1963). Ko je bil bradavičasti sloj s TEM že poznan in raziskan, so ga prepoznali in opazovali tudi s klasičnim svetlobnim mikroskopom.

Morfološka zgradba

Velikost ter porazdelitev bradavic se v bradavičastem sloju spreminjata; prav tako tudi dodatni sloj. Bradavice so navadno okrogle oblike, velikosti med 0,01-1 mm in s premerom med 0,1-0,25 mm (Liese 1965). So lahko zelo gosto skupaj, ena ob drugi, ali pa so zelo na redko raztresene po celični steni in jih je težje opaziti. Redko se pojavi lokalno nakopičenje bradavic. Znotraj posamezne drevesne vrste se porazdelitev bradavic zelo spreminja, celo med dvema sosednjima celicama

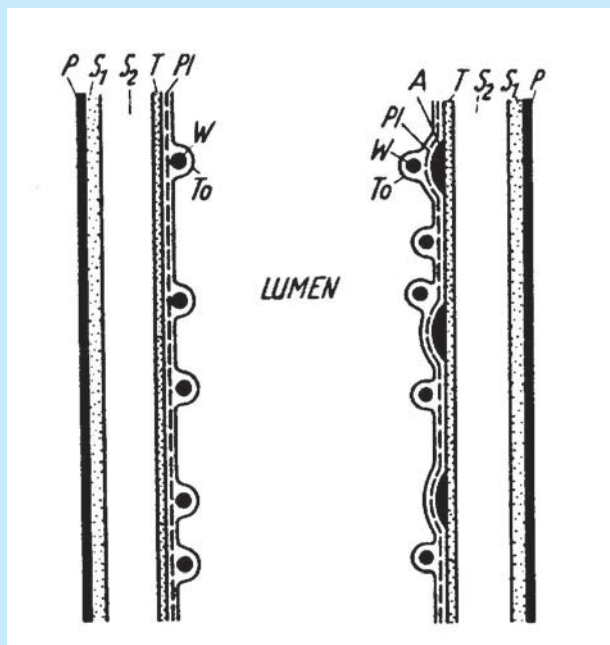
je mogoče zaslediti opazne spremembe (Liese 1965). Verhoff in Knigge (1976) sta na primeru jelke *Abies alba* raziskala velikost, število ter porazdelitev bradavic znotraj drevesa, znotraj branike ter v radialnih celičnih stenah traheid kasnega lesa. Znotraj branike so velikosti bradavic variirale. Zasledila sta dva maksimuma, enega v ranem lesu ter drugega v kasnem lesu, med 180-200 nm. Velikost bradavic je bila najmanjša v prehodnem lesu, med 135-145 nm. Pri juvenilnem lesu je bila ta razlika očitnejša kot v adultnem lesu. V neposredni bližini porusa obokanih pikenj so se bradavice opazno zmanjšale. Številčno je bilo največ bradavic v prehodnem lesu, med 390-410 na 25 mm². V ranem in kasnem lesu je bilo bradavic najmanj, med 270-310 na 25 mm². V adultnem lesu so bile razlike večje kot v juvenilnem lesu. V radialnih celičnih stenah traheid kasnega lesa so bile bradavice največje v bližini tangenci-

alnih celičnih sten, nato je velikost bradavic postopoma padala. Pri ozkih lumnih ter ozkih radialnih celičnih stenah je bil prehod še očitnejši.

Opaznost bradavic se med drevesnimi vrstami spreminja. Največkrat so bradavice pokrite z dodatnim slojem (Liese 1965). Ta sloj ima amorfnost, včasih tudi fibrilarno strukturo. Zaradi tega notranji sloj S3 sekundarne celične stene ni viden, ravno tako so zakrite bradavice. V drugih primerih bradavice niso prekrite, ležijo neposredno na sloju S3 sekundarne celične stene in so dobro vidne. Bradavičasti sloj naj bi bil po Lieseju (1965) sestavljen iz dveh membran, med kateri so vključena okrogla telesa – bradavice. Pri nekaterih drevesnih vrstah zrnato strukturo na notranji površini celičnih sten pripisujejo lokalnim odebelitvam celičnih sten. Te t.i. inkrustracije na S3 sloju, ki so različne gostote, kot je dejanska celična stena, so po velikosti večje od bradavic (slika 2). Lokalne inkrustracije na celični steni naj bi se oblikovale simultano z nastankom bradavičastega sloja ali pred njim in naj bi bile drugačne sestave od lignificirane celične stene (Liese 1965).

Kemijska zgradba

Kemijska zgradba bradavic in membran je različna, saj le bradavice absorbirajo UV svetlobo (Liese 1965). Elektronska gostota bradavic je bila pri kontrastiranju s kalijevim permanganatom in opazovanjem s TEM velika, kar naj bi bila posledica velike vsebnosti lignina oziroma ligninu podobnim snovem. Sloj je kemično zelo težko raztopiti. Pri maceraciji celične stene pa ga je lažje hidrolizirati kot druge sloje celične stene, kar naj bi nakazovalo, da so zraven različni tipi polisaharidov. Sloj naj bi vseboval visok delež manana ter ksilana in nekaj pektinskih substanc. Odporen je tudi na okužbe z glivami, ki povzročajo



□ **Slika 2. Shema bradavičastega sloja z Inkrustacijami in brez njih (po Liese 1965). P – primarna celična stena, S1 – zunanji sloj sekundarne celične stene, S2 – srednji sloj sekundarne celične stene, T – notranji sloj sekundarne celične stene, W – bradavice, PI – plazmalema, To – tonoplast, A – Inkrustacije**

rdečo trohno (Liese 1965, Sachs 1965, Fengel in Wegener 1989, Fujita in Harada, 1991).

Nastanek in izvor

Četudi je bila ultrastruktura bradavičastega sloja podrobneje raziskana, izvor njegovega nastanka še vedno ni v celoti pojasnjen. Kutscha in Schwarzmann (1975) sta proučevala proces lignifikacije v traheidah jelke *Abies balsamea* in zasledila bradavice, preden se je notranji sloj S3 sekundarne celične stene popolnoma lignificiral. Pri jelki *Abies balsamea* naj bi bila vsebnost lignina glede na zelo temno obarvanje bradavičastega sloja s kalijevim permanganatom večja kot v drugih slojih sekundarne celične stene. Bradavice sta opazila tudi na obeh straneh pikenjskega oboka pri popolnoma diferencirani traheidi (Kutscha in Schwarzmann 1975). Po Bairdu in sod. (1974) so se bradavice pojavile šele po zaključku lignifikacije sloja S3 sekun-

darne stene. Bradavice se v celični steni niso pojavile nenadoma, pač pa so se oblikovale postopoma. Analogno prostorskemu modelu odlaganja lignina v celično steno so se tudi bradavice najprej oblikovale v celičnih vogalih ter nato v radialnih in tangencialnih celičnih stenah skorajda hkrati. Bradavice so se najprej pojavile kot majhni kupi, ki so se s kalijevim permanganatom obarvali nekoliko temneje kot preostala sekundarna celična stena, kar naj bi nakazovalo hkratno oblikovanje bradavic ter njihovo lignifikacijo. V nadaljevanju so bradavice rasle, po končanem procesu diferenciacije pa so se skupaj z amorfnim slojem intenzivneje kontrastirale s kalijevim permanganatom kot sosednji sloji sekundarne celične stene. V nekaterih primerih so bili zunanji deli bradavic temneje obarvani kot notranji, kar naj bi nakazovalo heterogeno zgradbo bradavičastega sloja (Baird in sod. 1974).

Po Wardropu in Daviesu (1962, cit. po Baird in sod. 1974) naj bi celotna bradavičasta struktura nastala iz lokaliziranih odebelitev celične stene, ki naj bi jih pokrivali ostanki citoplazmatskih komponent. V nastajajoči celični steni naj bi avtorja zasledila oblikovanje bradavicam podobnih izbočin kot integralnega dela notranjega S3 sloja sekundarne celične stene. Ob celični smrti naj bi se citoplazmatski membrani zrušili skupaj, med njiju ujeti ostanki organelov pa se posušili na površini celične stene v obliki bradavic. Številni avtorji so tem teorijam nasprotovali, predvsem zaradi taksonomske zveze z bradavičasto strukturo. Po Cranshawu (1965) naj bi se bradavičasta struktura razvila na zunanji strani plazmaleme med zadnjo stopnjo celične diferenciacije ločeno od S3 sloja. Po njegovi teoriji bradavičasti sloj ni niti del S3 sloja niti ne pomeni posušenih ostankov citoplazme na notranji površini celične stene. Pač pa naj bi struktura nastala iz žive citoplazme pred njenim razpadom. To teorijo je nekoliko kasneje podprl tudi Kutscha (1968, cit. po Baird in sod. 1974), ki naj bi opazil podobnost med konicami bradavic ter nekaterimi membransko vezanimi vezikli in temneje obarvanimi delci v citoplazmi. Scurfield in Sitva (1969) sta domnevala, da so bradavice kopija invaginacij plazemske membrane, skozi katere je bil stenski material aktivno izločan v času celične smrti. Bradavice naj bi bile sestavljene iz stenskih komponent ter produktov, nastalih med avtolizo protoplazme, kar naj bi bile v glavnem fenolne substance (Baird in sod. 1974). Po Lieseju (1965) naj bi bil dejanski bradavičasti sloj ostanek razpadajočega protoplasta, celične žive vsebine. Oblikoval naj bi se v terminalni stopnji celične diferenciacije, po razgradnji protoplasta v celičnem lumnu, pri čemer je smrt celične prvi pogoj za njegov nastanek. V

diferencirajočih se vaskularnih celicah protoplast oblikuje v tanko cevko okrog velike centralne vakuole, ki je omejena z eno membrano na vsaki strani; plazmalemo in tonoplastom. Z napredovanjem diferenciacije se v citoplazmi oblikujejo elektronsko gostejši delci okrogle oblike. Njihov izvor je nepoznan. Lahko bi nastali z zgoščevanjem določenih plazemskih komponent. Vendar pa ni nobenih dokazov, da bi se tvorili iz specifičnih celičnih organelov, kot so npr. plastidi ali mitohondriji. Ko je celična stena dokončno oblikovana in se tonoplast sesede na plazmalemo, so ti delci ujeti med membrani in v lumen nastanejo nekakšni mošnjički, ki ustrezajo bradavicam. Sloj, ki pokriva bradavice, pa nastane iz tonoplasta. Ker so v diferencirajoči se celici včasih citoplazmatske komponente bolj skoncentrirane v celičnih vogalih, je tudi več bradavic v teh področjih. Po tej hipotezi je izključen nastanek sloja S3 sekundarne celične stene predvsem iz ostankov protoplaste. Bradavičasti sloj je obravnavan kot samostojna struktura, ki nastane iz ostankov protoplaste. Razlog, da se sloj ne oblikuje pri vseh drevesnih vrstah, Liese (1965) pripisuje različnim procesom protoplazmatske dezintegracije. Po Bairdu in sod. (1974) naj bi se v celičnih stenah traheid jelke *Abies balsamea* bradavice tvorile na zunanji strani plazmaleme pred avtolizo protoplaste, ko je bila torej celica še živa. Ko so bile bradavice formirane, je protoplazma razpadla in ni pustila nobenih ostankov na notranji strani celične stene. Teorijo, da bradavičasti sloj sestoji iz posušenih membran citoplazme z organeli, ki so ujeti med njiju (bradavicami), so ponovno ovrgli. Ravno tako niso našli nobenega organela, ki bi bil specifično povezan z nastankom bradavic, kljub temu pa avtorji te možnosti ne izključujejo. Po končanem procesu diferenciacije ni

bilo mogoče zaslediti nobenih citoplazmatskih ostankov na celični steni. V tem času se je citoplazma skupaj z organeli in membranama razpadla. Na osnovi teh opazovanj so Baird in sod. (1974) ponudili tri alternativne hipoteze, ki naj bi razložile nastanek bradavičastega sloja v traheidah jelke *Abies balsamea*. Po prvi hipotezi naj bi bradavice pomenile ostanke materiala, transportiranega iz citoplazme do nastajajoče celične stene. Ko je celična stena oblikovana, presežek materiala na teh lokacijah vodi do nastanka bradavic. Po drugi hipotezi naj bi bradavice nastale z odlaganjem produktov avtolize umirajoče celice na zunanjih področjih plazmaleme. Po tretji hipotezi naj bi nastanek bradavic na posameznih območjih celične stene povzročil visok osmotski potencial zaradi prodora materiala iz celične stene v lumen. Lignin in hemiceluloze, ki se odlagajo v celično steno, naj bi zasedle prostor vodi in ob tem nastali tlak bi lahko povzročil lokalno notranje raztezanje ter prodor plazmaleme. Izmed vseh predlaganih hipotez se zdi avtorjem zadnja še najmanj verjetna. Vendar pa nobene od predlaganih hipotez v svojih študijah niso uspeli potrditi (Baird in sod. 1974).

Pomen bradavičastega sloja

Bradavičasti sloj deluje kot terminalna lamela celične stene. Lahko bi domnevali, da vpliva na določene lastnosti celične stene, kot je npr. difuzivnost vode, zaščitnih sredstev in drugih tekočin ter na povečanje odpornosti proti biološkemu razkroju. Lahko bi bila spremenjena adhezivnost ter fiksacija kemikalij. Liese (1965) je proučil številne evropske drevesne vrste in sklepal, da sistematično klasificiranje drevesnih vrst v družine, rodove in vrste glede na to, ali najdemo bradavičasti sloj ali ne, ni mogoče. Z izjemo *Pinus* je pri

iglavicah s smolnimi kanali sloj navadno manj izrazit. Pri *Pinus* je sloj dobro razvit pri *Dyiploxylonih*, pri *Haploxylo-*
nylonih pa le redko. V splošnem je mogoče razlikovati med vrstami oziroma rodovi brez bradavic, z nekaj bradavicami ter s številnimi bradavicami. Njihova variabilnost v velikosti in razporeditvi zmanjšuje pomen sloja pri identifikaciji. Kljub temu naj bi bilo dejstvo, ali bradavičasti sloj pri določenih drevesnih vrstah najdemo ali ne, skupaj z drugimi anatomskimi znaki pomembno za identifikacijo (Liese 1965). □

literatura

1. Baird W.M., Parham R.A., Johnson M.A. 1974. Development and composition of the warty layer in balsam fir. I. development. Wood and Fiber, 6, 2: 114-125
2. Côté W.A. 1981. Ultrastructure – critical domain for wood behaviour. Wood Science and Technology, 15: 1-29
3. Fengel D., Wegener G. 1989. Wood: chemistry, ultrastructure, reactions. Berlin, Walter de Gruyter: 613 str.
4. Fujita M., Harada H. 1991. Ultrastructure and formation of wood cell wall. In: David N.-S.Hon, Shiraishi N. (eds.) Wood and cellulosic chemistry. Marcel Dekker Inc., New York: 3-58
5. Kutscha N.P., Schwarzmann J.M. 1975. The lignification sequence in normal wood of balsam fir. Holzforschung, 29, 3: 79-84
6. Liese W. 1965. The warty layer. 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: 251-269
7. Sachs J.B. 1965. Evidence of lignin in tertiary wall of certain wood cells. 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: 335-339
8. Verhoff S., Knigge W. 1976. Untersuchungen über Größe, Anzahl und Verteilung der Warzen auf der Radialwand der Tracheiden der Tanne (*Abies alba* M.) Holz als Roh- und Werkstoff, 34, 5: 175-180