



GOZDARSKI INŠTITUT SLOVENIJE
SLOVENIAN FORESTRY INSTITUTE

Večna pot 2, 1000 Ljubljana, Slovenija
T: +386(0)1 200 78 00; F: +386(0)1 257 35 89

LABORATORIJ ZA LESNO ANATOMIJO

PORO ILO: Priprava trajnih preparatov bulic (hiperplazija) z debla navadne bukve (*Fagus sylvatica* L.) iz Stoperc, Haloze

Pripravili: doc. dr. Jožica Gričar, Gregor Skoberne, univ. dipl. inž. agr., dr. Tanja Mrak, dr. Peter Prislan

Naročnik:

Nenad Zagorac, univ. dipl. inž. gozd.
Zavod za gozdove Slovenije, OE Maribor

Ljubljana, oktober 2017

1. Uvod in namen dela

Decembra 2016 smo s posredovanjem dr. Nikice Ogrisa od Nenada Zagorca, univ. dipl. inž. gozd., prejeli vzorec bukove skorje z območja Stoperc, Haloze, z nenavadnimi bulastimi izrastki (hiperplazija) (Slika 1). Pripravili smo preparate skorjinih tkiv za svetlobno mikroskopijo (svetlo polje in UV-fluorescenca), da bi preverili njihovo anatomsko strukturo.



Slika 1: Deblo navadne bukve (*Fagus sylvatica* L.) iz Stoperc, Haloze, s številnimi bulastimi izrastki (Foto: N. Zagorac).

2. Priprava preparatov

Pripravili smo preparate pre njih prerezov skorjinih tkiv za opazovanja s svetlobnim mikroskopom. Vzorec skorje odvzet iz debla navadne bukve (*Fagus sylvatica* L.) smo shranili v fiksacijski raztopini FAA (mešanica formalina, očetne kisline in 50 % etanola), da bi ohranili strukturo celic in prepre ili njihovo razpadanje. Po približno enem tednu smo tkiva za nekaj dni potopili v 50 % etanol in v nadaljevanju v 70 % etanol. Iz vzorca smo na različnih delih odvzeli manjše kose za podrobna drevesno-anatomska opazovanja pod svetlobnim mikroskopom. Kose smo nato v tkivnem procesorju (Leica TP 1020) dehidrirali v etanolni vrsti (70 %, 90 %, 95 % in 100 %) in raztopini bio-clear ter jih prepojili s parafinom segretim na 60°C. Različno orientirane vzorce smo nato s pomočjo parafinskega dispenzerja (Leica EG 1120) vklopili v parafinske bloke. S polavtomatskim rotacijskim mikrotomom (Leica RM 2245) smo narezali rezine debeline 10 µm, ki smo jih za opazovanja v svetlem polju obarvali v vodni mešanici barvil safranin (0,04 %) in astra modro (0,15 %) ter prepojili z vklopnim medijem Euparal. Safranin lignificirana tkiva obarva rdečo, astra modro pa nelignificirana tkiva (celuloze, hemiceluloze) modro (Gričar 2007, Prislan in sod. 2014a, b). Za opazovanja s pomočjo UV-fluorescence smo rezine obarvali z barvilom akridin oranžno in vklopili v glicerin (Prislan in sod. 2009).

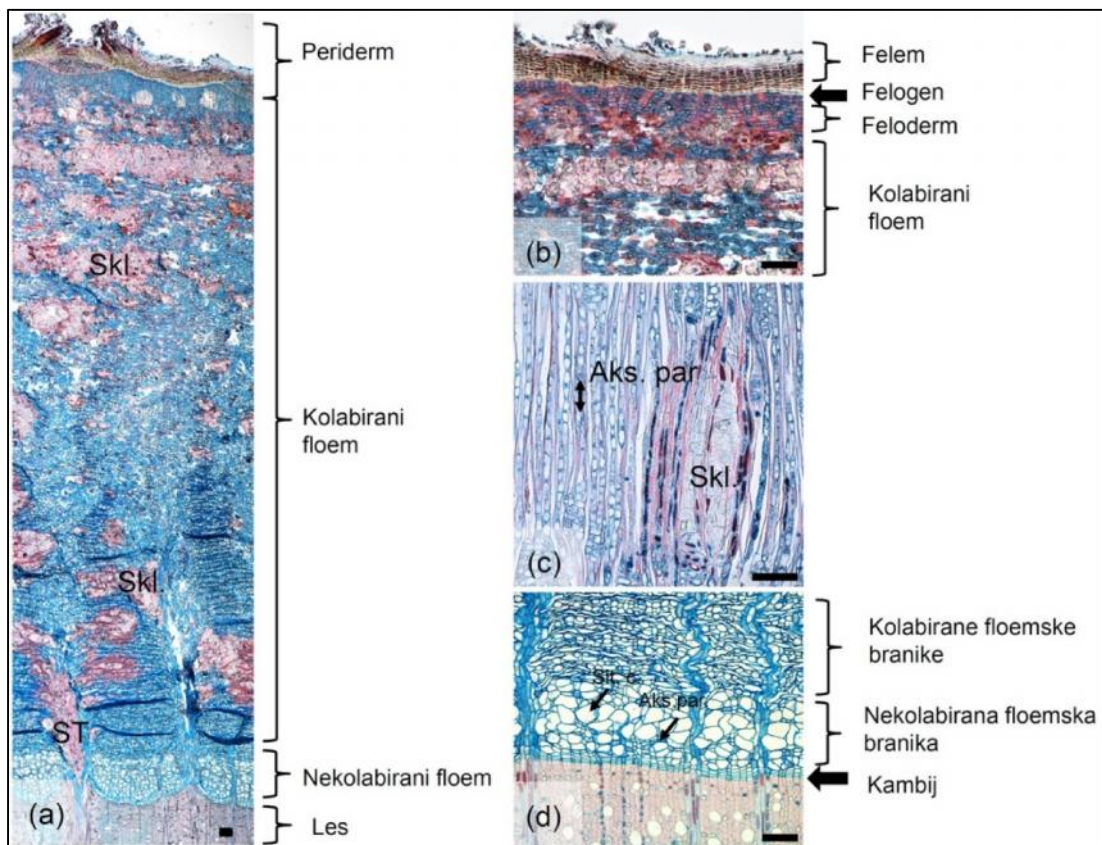
Za klasično anatomsko opazovanje smo uporabili svetlo-poljsko mikroskopijo, za dokazovanje prisotnosti polifenolov (npr. suberina in lignina) pa UV-fluorescentno tehniko. Suberin in lignin namreč izkazujeta UV-fluorescenco in se svetita. Raziskave v svetlem polju smo opravili s svetlobnim mikroskopom Leica DM 4000 B/M ter fotografije zajeli s sistemom za analizo slike (kamero Leica DMC 4500 in programom Leica LAS). Za UV-fluorescentno tehniko smo uporabili mikroskop ZEISS AxioObserver.Z1 in modro UV-svetlobo ob uporabi kombinacije vzpodbujevalnega filtra 390-420 nm in emisijskega filtra 450-4095 nm (Prislan in sod. 2009). V UV-svetlobi je vidna rumeno-zelena fluorescenca lignina in modra fluorescenca suberina.

3. Anatomske analize in zaključki

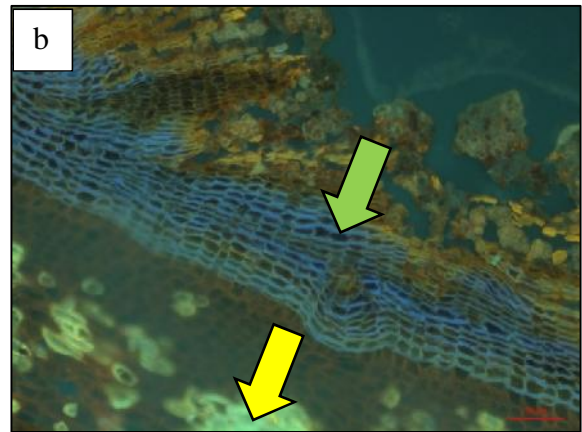
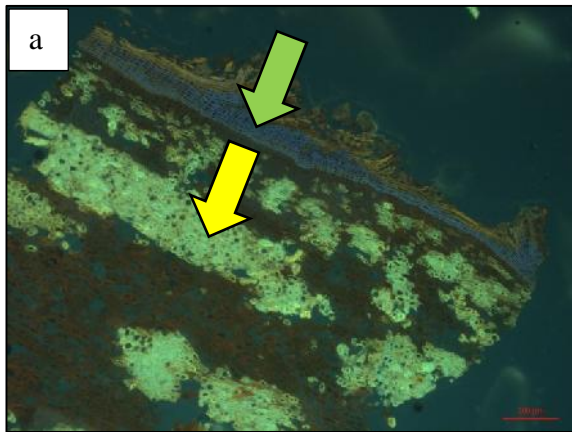
Vzorci skorjinih tkiv bukve kažejo izrazito anomalno anatomsko strukturo na mestu bulic v primerjavi z normalno skorjo (Slika 2, 4). Netipična zgradba je omejena na periderm (sekundarno krovno tkivo) in zunanji kolabirani del floema (starejši del floema). V obeh tkivih je na opazovanem (prizadetem) delu število celic večje (hiperplazija) in njihova razporeditev neobičajna (Slika 4a-e). V osrednjem delu bulic lahko na prečnem prerezu opazimo konkavno razporeditev slojev periderma, med katere so ujete tudi skupine sklereid, ki so sicer značilne za floemsko tkivo. Z UV-fluorescenco je videti, da so peridermska tkiva močno suberizirana (modrikasta svetle a barva). Tkiva sekundarnega floema so močno nelignificirana (rumeno-zelena svetle a barva). Oblika in velikost posameznih celic v floemu in peridermu se ne razlikuje od tistih v normalni skorji (Slika 2, 3, 4f-j). **Sklepamo lahko, da gre za lokalizirano neobičajno reakcijo (v smislu povečane produkcije celic – hiperplazija) plutnega kambija**

(felogena) in živih celic (parenhimskih celic) v okoliškem tkivu. Vzroka za tovrstno reakcijo na podlagi anatomskih analiz ni mogoče določiti.

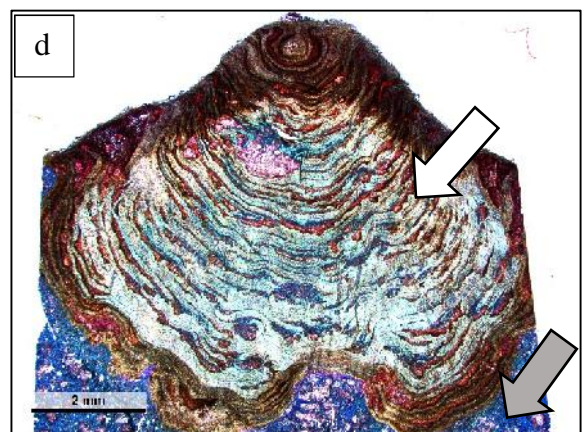
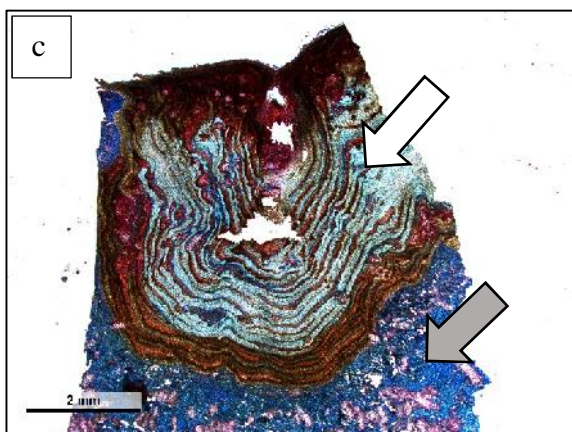
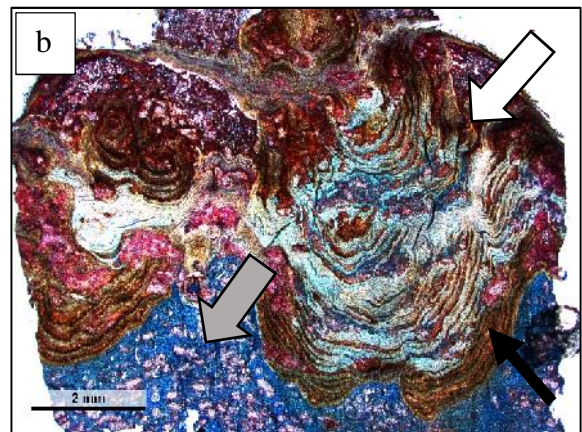
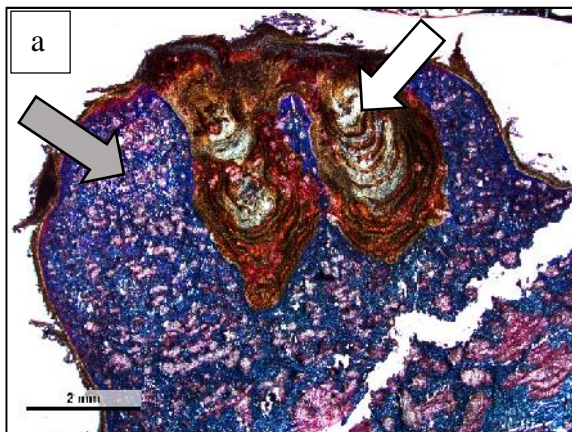
Bulice ali veje izrastke na drevesih pogosto opisujemo kot rastne anomalije. Dostikrat jih imenujemo tudi tumorji, saj so velikokrat povezani s patološkim razvojem tkiva, z značilno nenormalno, povečano rastjo, ki, kot kaže, ni več pod nadzorom prvotnega genskega zapisa drevesa (Richter 2015). Vzrok za nastanek bulic je lahko infekcija kambija s patogenim organizmom ali neobičajen nastanek epikormskih poganjkov na deblu, ki se razvijejo iz zavrtih ali adventivnih popkov (Torelli 1990, Richter 2015).

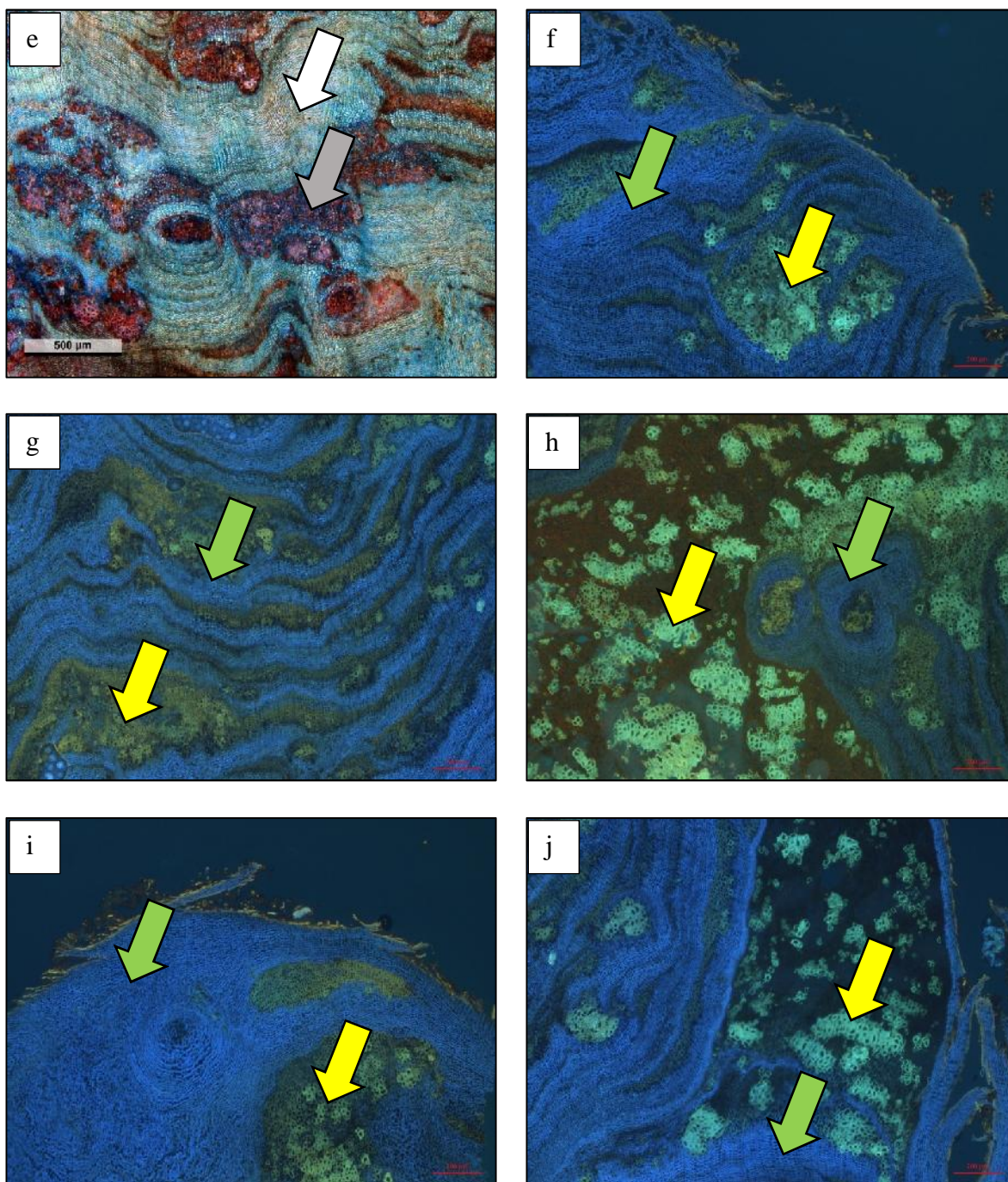


Slika 2: Tipi na skorjina tkiva pri bukvi: (a) Prečni prež skozi celotno skorjo. Na vrhu slike je viden periderm (sekundarno krovno tkivo), sledi kolabirani floem, najmlajši nekolabirani floem, kambij in najmlajša branika v lesu. Sklerenhimski ep (ST) predstavlja skleroziran floemski trak, ki se nadaljuje v les. (b) Periderm je sestavljen iz felogena, ki v centrifugalni smeri proizvaja celice felema oz. plute, v centripetalni smeri pa celice feloderma. (c) Radialni prež floemskega tkiva, kjer je razvidna dolžina aksialnih parenhimskih floemskih celic in sklereid (Skl.), ki so obdane s kolabiranimi stenami sitastih celic. (d) Najmlajša nekolabirana floemska branika s sitastimi cevmi (Sit. c.) in aksialnimi parenhimskimi celicami (Aks. par.), ki so številne v kasnem delu floema. Daljica = 100 µm (iz: Prislan 2012).



Slika 3: Obi ajna starejša skorjina tkiva bukve z UV-fluorescenco. Peridermska tkiva so suberizirana (modrikasta svetle a barva) in ozna ena z zeleno puš ico, sklereide starejšega sekundarnega floema pa lignificirane (rumeno-zelena svetle a barva) in ozna ena z rumeno puš ico.





Slika 4: Starejša skorjina tkiva bukve z bulicami v svetlem polju (a-e) in z UV-fluorescenco (f-j). Peridermska tkiva so morda no suberizirana (modrikasta svetle a barva) in označena z belo (a-e) ali zeleno puščico (f-j), sklereide starejšega sekundarnega floema pa so lignificirane (rumeno-zelena svetle a barva) in označene s sivo (a-e) ali rumeno puščico (f-j).

4. Viri:

GRI AR J. (2007) Xylo- and phloemogenesis in silver fir (*Abies alba* Mill.) and Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.). *Studia forestalia Slovenica, Professional and Scientific Works*, Ljubljana, 106

PRISLAN P., MERELA M., ZUPAN I M., KRŽE L., UFAR K. (2009) Uporaba izbranih svetlobno mikroskopskih tehnik za raziskave lesa in skorje *Les*, 61: 222-229.

PRISLAN P. (2012) Ve letno in sezonsko nastajanje ksilema in floema pri bukvi (*Fagus sylvatica* L.) z dveh rastiš v Sloveniji. Doktorska disertacija, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Ljubljana. 143 str.

PRISLAN P., GRI AR J., UFAR K. (2014a) Wood sample preparation for microscopic analysis. Ljubljana: University of Ljubljana, Department of Wood Science and Technology: Slovenian Forestry Institute: University of Zaragoza, Department of Geography and Regional Planning. http://streess-cost.eu/images/stories/Documents/protocol_wood_sample_preparation_for_microscopic_analysis.pdf.

PRISLAN P., MARTINEZ DEL CASTILLO E., KRŽE L., HABJAN P., MERELA M., REIJNEN H. (urednik). (2014b) Wood sample preparation for microscopic analysis: based on a protocol by Peter Prislan. Ljubljana: University of Ljubljana, Department of Wood Science and Technology: Slovenian Forestry Institute: University of Zaragoza, Department of Geography and Regional Planning. http://streess-cost.eu/images/stories/films/STReESS_Film_Peter_Prislan.mp4.

RICHTER C. (2015) Wood characteristics: description, causes, prevention, impact on use and technological adaptation. Cham: Springer International Publishing, Švica. 222 str.

TORELLI N. (1990) Les in skorja. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo, Katedra za tehnologijo lesa. 70 str.