Jožica GRICAR*

UDK 630*811.13

PREVODNI KAMBIJ

VASCULAR CAMBIUM

Izvleček: V prispevku so predstavljeni apikalni in lateralni meristemi v drevesu, s poudarkom na prevodnem kambiju. Podani so različni opisi zgradbe kambija. Opisana je sestava kambija, tipi celičnih delitev in periodično delovanje kambija. Na koncu je predstavljen še pomen uporabe ustreznih mikroskopskih tehnik za raziskave kambija na ultrasturkturni ravni.

Ključne besede: celične delitve, floem, inicialka, kambij, kambijeva aktivnost, les (ksilem), meristem, sekundarna rast

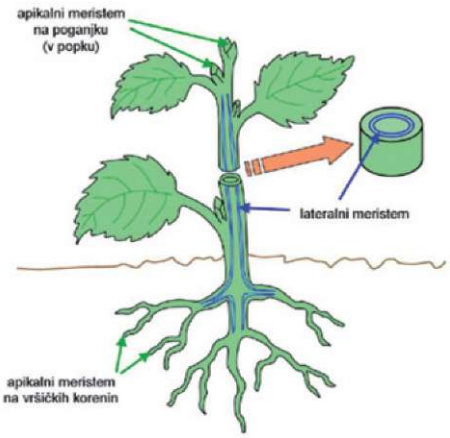
Abstract: In the paper, apical and lateral meristems in tree are presented with the emphasis on vascular cambium. Various explanations of cambial structure are given. Structure of cambium, types of cell division and periodical activity of cambium are described. At the end, importance of application of appropriate microscopical techniques for investigations of cambium at ultrastructural level are presented.

Key words: cell division, phloem, initial, cambium, cambial activity, wood (xylem), meristem, secondary growth

TKIVA IN MERISTEMI

V drevesu ločimo meristemska ali tvorna tkiva in trajna ali permanentna tkiva. Celice tvornih tkiv ali meristemov so se sposobne deliti in rasti, trajna rastlinska tkiva pa nastanejo iz tvornih tkiv, pri čemer celice izgubijo sposobnost delitve in se specializirajo za opravljanje določenih nalog. Rast rastlin torej poteka v omejenih področjih, ki se imenujejo meristemi. Sestavljeni so iz celic, ki so se zmožne aktivno deliti, s čimer dodajajo nove celice rastlinskemu telesu (Torelli, 1990). Po legi v rastlini ločimo apikalne (vršne) in lateralne (stranske) meristeme, po relativnem času nastanka in delovanja pa primarne in sekundarne meristeme (slika 1) (prim. Čufar, 2006).

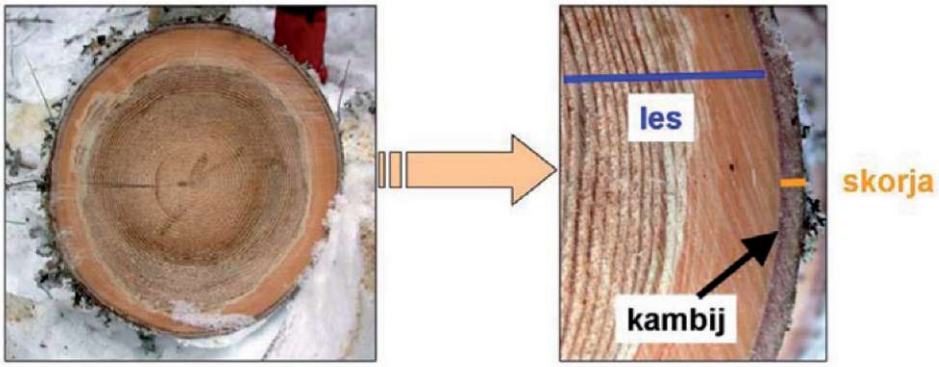
Apikalni ali vršni meristemi se nahajajo na vrhu stebla ali korenine in tvorijo primarna tkiva. Njihovo delovanje se kaže kot podaljševanje (elongacija) oziroma kot rast v višino ali globino. Ker tvorijo primarna tkiva, se imenujejo tudi primarni meristemi. Primarna rast na poganjku vodi do razvoja primarnih tkiv: povrhnjice (epiderma), primarne skorje stebla (korteksa), prevodnih tkiv (žil), osrednjega stržena in listov (Mauseth, 1988; Dengler, 2001).



Slika 1. Apikalni in lateralni meristemi na mladi lesnati rastlini.

V lesnatih rastlinah že v prvem letu rasti primarna prevodna tkiva poganjkov in korenin nadomestijo sekundarna prevodna tkiva, ki jih tvorita lateralna meristema: prevodni ali vaskularni kambij (v nadaljevanju kambij) in plutni kambij ali felogen. Lateralni ali stranski meristemi tvorijo sekundarna tkiva, zato se imenujejo tudi sekundarni meristemi. Delitve in razvoj njihovih celic omogočaju drevesu rast v debelino in s tem večanje volumna prevodnega sistema

* dr., Gozdarski inštitut Slovenije, Oddelek za prirastoslovje in gojenje gozda, Večna pot 2, SI-1000 Ljubljana, e-pošta: jozica.gricar@gozdis.si



Slika 2. Kambij se kot tanek in nepretrgan obroč nahaja med lesom na notranji in skorjo na zunanji strani.

ter oblikovanje mehanskih in zaščitnih tkiv (Torelli, 1990). Kambij tvori v centrifugalni smeri celice ličja (sekundarnega floema), v centripetalni smeri pa celice lesa (sekundarnega ksilema) (slika 2). Felogen proizvaja tkiva sekundarnega krovnega tkiva (periderma) (Panshin in de Zeeuw, 1980; Larson, 1994). V normalnih rastnih razmerah je ksilemski prirastek praviloma največji in ponazarja najobsežnejši del debelinske rasti dreves. Izmed vseh sekundarnih tkiv v drevesu je les najbolj raziskan, predvsem zaradi njegovega velikega ekološkega in ekonomskega pomena.

KAMBIJ – RASTLINSKI MERISTEM, KI GA NAJMANJ POZNAMO

Kambij v strokovni literaturi v zadnjem času zelo pogosto opisujejo kot rastlinski meristem, ki ga najmanj poznamo (npr. Savidge, 2000a; Groover, 2005). Da sta njegovo delovanje in zgradba še vedno precejšnja uganka, lahko v veliki meri pripišemo tehničnim omejitvam, ki so povezane z raziskavami počasi rastočih odraslih dreves. Larson (1994) je v svoji knjigi (The vascular cambium: development and structure) na kratko povzel razvoj novih spoznanj o kambiju. Obravnavanje kambija kot »življenjskega soka« lahko zasledimo že v 14. stoletju. V 70. letih 17. stoletja je italijanski zdravnik in biolog Marcello Malpighi kambij opisal kot rastno območje lesa, ki se nahaja v živi skorji. Schwan in Scheiden sta leta 1834 razvila celično teorijo in kambij predstavila kot sloj celic med floemom in lesom. Na osnovi teh spozanj je Sanio le nekaj let kasneje razvil koncept kambijevih inicialk (oz. izvornih celic). Pogosto namreč lahko v posameznem radialnem nizu zasledimo štiri fuziformne oz. vretenaste kambijeve celice, ki so obdane z zunanjo primarno steno. Te celice so poznane kot »Saniove štiri«. Skupna stena nastane z delitvijo inicialke v periklini ravnini, pri čemer nastaneta dve materinski celici. Ena ostane inicialka, druga je materinska celica (ksilemska ali floemska) in se lahko še nekajkrat deli. Z njuno vnovično delitvijo nastanejo štiri hčerinske celice (Larson, 1994; Samuels in sod., 2006).

RAZLIČNE RAZLAGE ZGRADBE KAMBIJA

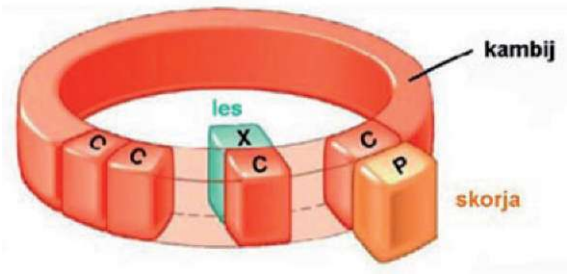
Ontogenetsko kambij izhaja iz prokambija, ki se razvije iz apikalnega meristema. Kot nepretrgan obroč leži med sekundarnim ksilemom na notranji strani in sekundarnim floemom na zunanji strani (slika 3) (Mauseth, 1988; Larson, 1994). Pri zelnatih rastlinah se prokambij diferencira v prevodno tkivo in kambij se ne razvije. Pri lesnatih rastlinah se del prokambija razvije v žilni ali fascikularni kambij. V parenhimu primarnih strženovih trakov pa se dodatno razvije medžilni ali interfascikularni kambij. Ta se lahko oblikuje sočasno z žilnim kambijem ali nekoliko za njim. Medžilni kambij se diferencira v obliki pasov, ki se počasi širijo od robov žilnega kambija. Ko se pasovi sosednjih žil staknejo, je oblikovan neprekinjen obroč kambija. Tako v steblu in vejah kot tudi v koreninah se kambij diferencira akropetalno, tj. v smeri proti vršičkom. Kambij je najstarejši v rastlini na stičnem mestu med steblom in korenino, deli nad ali pod tem območjem so progresivno mlajši (Dermastia, 2007).

Zgradba kambija je opisana na več načinov. Starejši, mehanistični nazori predpostavljajo, da je kambijeva rast določena vnaprej (npr. Larson, 1994), danes pa se čedalje bolj sprejema mnenje, da je njegov razvoj plastičen kot funkcija epigenetskega nadzora in fizikalno-kemijskega okolja (mikrookolja) v celici (Savidge, 1996, 2000b; Dengler, 2001). V literaturi so še vedno ustaljeni mehanistični nazori in terminologija osnovana na podlagi prvih svetlobno mikroskopskih raziskav o delovanju kambija in lesni anatomiji. Povsem se je uveljavil enoplastni koncept, da je kambij sestavljen iz ene plasti inicialk, kambijeva cona pa zajema kambijeve inicialke in materinske celice floema ter ksilema (Wilson, 1966; Schmid, 1976; Larson, 1994). Po večplastnem konceptu pa kambij obsega tako inicialke kot materinske celice ksilema in floema (Panshin in de Zeeuw, 1980; Larson, 1994; Lachaud in sod., 1999; Plomion in sod., 2001). V vsakem posameznem radialnem nizu kambija je torej ena izvorna celica (nekateri avtorji so skušali dokazati, da bi lahko bili dve), vse druge celice v

istem radialnem nizu pa so potomke te inicialke (Larson, 1994). Smer delitve inicialke (tj. bodisi na floemsko ali ksilemsko stran) naj bi bile nadzorovane z dogajanjem znotraj inicialke in do neke mere vnaprej določene. Hkrati se je inicialka sposobna obnavljati. Ker definicija temelji na periklinih delitvah, pri katerih nastajajo novi floemski in ksilemski elementi, je Savidge (2000b) inicialko poimenoval »periklina – delitvena inicialka«.

Savidge (1996, 2000b) zavrača mehanistični koncept razlage kambijevega delovanja, ki temelji na inicialkah in materinskih celicah in utemeljuje, da ni nobenega ustreznega pojasnila, zakaj pri periklinih delitvah ena celična potomka obdrži posebne inicialne sposobnosti, druga hčerinska celica pa jih opusti. Četudi je v kambijevi coni v vsakem radialnem nizu po tej teoriji le ena inicialna celica pozicijsko sposobna producirati tako ksilemske kot floemske derivate, te inicialne celice ne moremo določiti na osnovi njene ultrastrukture ali mitotske aktivnosti (npr. Catesson in sod., 1994; Larson, 1994; Samuels in sod., 2006). Sicer je mogoče kambijevo inicialko definirati tudi kot »antiklino – delitveno inicialko« (Savidge, 2000b). Z antiklinimi delitvami v kambiju nastanejo novi radialni nizi celic, s čimer lahko kambij sledi večanju obsega drevesa. Pri vrstah iz rodu Pinus spp. so dokazali, da se je več kot ena fuziformna kambijeva celica v radialnem nizu zmožna antiklino deliti in s tem ustvariti nov radialni niz. Po tej predpostavki so vse kambijeve celice (antikline – delitvene inicialke) enako kompetentne (Savidge, 2000a, b).

Novejše raziskave kažejo, da mehanizma nastanka ksilema in floema nista vnaprej določena (Savidge, 2000b). Kambij nastane in se ohranja s pomočjo bazipetalnega toka avksina in s fizikalnimi silami. Različno delovanje celic v kambiju in njihovo diferenciacijo v elemente ksilema ali floema je mogoče pojasniti s spremembami v mikrookolju posamezne celice, ki vpliva na gensko izražanje in katalizo encimov. Za vstop celice v proces ksilo- ali floemogeneze niso potrebne predhodne delitve. Vse fuziformne kambijeve celice istega radialnega niza se lahko neposredno diferencirajo v trahealne elemente, pri čemer ni nobena izvzeta iz terminalne diferenciacije. Če se bazipetalni tok avksina prekine, se vse kambijeve celice dediferencirajo v celice aksialnega parenhima, s čimer avtor dokazuje, da ni nobena celica v kambiju trajna (Savidge, 2000b). Izvorne celice potem določa njihov položaj v kambiju in komunikacijski signali med celicami (Dermastia, 2007).



Slika 3. Z aditivnimi delitvami kambijevih celic (C) nastanejo nove celice lesa (X) v centripetalni ter celice floema (P) v centrifugalni smeri. Z multiplikativnimi delitvami (c–c) se povečuje obseg kambija.

V nadaljevanju tega prispevka uporabljam izraz kambij, ki se nanaša na vse celice, ki so se zmožne deliti, tj. na izvorne celice in njihove neposredne derivate.

SESTAVA KAMBIJA IN CELIČNE DELITVE

Za razliko od ostalih meristemskih celic so kambijeve celice visoko vakuolizirane in bogate z organeli in celičnimi strukturami, ki imajo specifične funkcije (Larson, 1994). Kambij sestavljata dva tipa celic: fuziformne oz. vretenaste, iz katerih nastanejo aksialno usmerjeni elementi (npr. traheide, vlakna, traheje, aksialni parenhim) ter trakovne, iz katerih nastanejo radialno usmerjeni trakovi. Razmerje med radialnimi in vretenastimi celicami je odvisno od starosti kambija in drevesne vrste. Delež trakovnih celic znaša med 10 % in 40 % (Larson, 1994; Lachaud in sod., 1999). Jedra fuziformnih in trakovnih inicialk se med seboj razlikujejo po obliki, velikosti in včasih celo po številu, saj so nekateri avtorji zabeležili fuziformne inicialke z več jedri (Lachaud in sod., 1999).

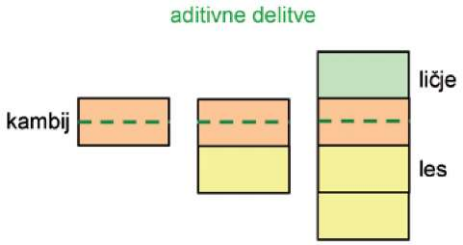
Kambij sodobnih semenk je bifacialen meristem, saj proizvaja celice na notranjo in zunanjo stran (slika 3). V kambiju potekata dve vrsti delitev; aditivne in multiplikativne. Aditivne delitve so perikline, tj. usmerjene tangencialno glede na deblo (slika 4) (Torelli, 1998). S temi delitvami nastajajo novi prevodni elementi lesa in ličja, s čimer se povečuje obseg drevesa. So najpogostejše delitve kambijevih celic, saj predstavljajo približno 90 % vseh mitoz. Kambij povečuje svoj obseg z multiplikativnimi delitvami in tako sledi debelitvi drevesa in ohranja svojo kontinuiteto (Panshin in De Zeeuw, 1980; Larson, 1994). V evolucijsko primitivnejšem kambiju z dolgimi fuziformnimi celicami so multiplikativne delitve psevdotransverzalne, pri naprednejšem kambiju s kratkimi fuziformnimi celicami pa radialne antikline(slika 5) (Torelli, 1998; Čufar, 2006).

Aktiven kambij je izpostavljen stalnim spremembam v številu, obliki in velikosti celic, razporejenih v radialnih nizih. V obdobju mirovanja je v kambiju le nekaj celic (navadno 4 – 8 slojev), ko pa se celice začnejo deliti, se število znatno poveča (tudi na 16 slojev), temu pa sledi diferenciacija derivatov v odrasle elemente sekundarnega ksilema oziroma sekundarnega floema. Kambijeve celice so totipotentne, saj se lahko iz njihovih derivatov razvijejo različni tipi celic lesa in floema.

Kambij je torej dinamična populacija celic, v kateri delujejo različni regulatorni mehanizmi: a) mehanizem, ki določa, katere celice bodo delovale kot kambijeve izvorne celice, b) mehanizem, ki te celice vzdržuje kot izvorne, c) mehanizem, ki določa diferenciacijo v ksilemske ali floemske celice in d) mehanizem, ki vzdržuje ravnovesje med izvornimi celicami in njhovimi potomkami. Ti mehanizmi naj bi delovali podobno kot pri apikalnem meristemu poganjka (Dermastia, 2007). Prevodni kambij deluje vse življenje rastline in je za razliko od apikalnih meristemov nenadomestljiv, saj nima tkivnih ekvivalentov, ki bi se aktivirali ob prenehanju njegovega delovanja, kot so npr. zalistni meristemi brstov v poganjku. Iz tega razloga so vse posebnosti meristemov, ki so se v evoluciji razvile za čim boljšo zaščito meristemov, v kambiju še posebej poudarjene. Podobno kot v apikalnih meristemih tudi izvorne celice kambija niso vir vseh celic sekundarnega telesa. Izvorne celice z občasnimi delitvami prispevajo nediferencirane potomke, ki se delijo hitreje. Občasne delitve izvornih celic zmanjšujejo možnost nastanka in kopičenja mutacij. Po drugi strani pa je potomk veliko, delujejo kratek čas, zato morebitne genske napake v njih za rastlino niso usodne (Dermastia, 2007).

DELITVE V KAMBIJU SO V NASPROTJU Z ERREROVIM ZAKONOM

Perikline oz. aditivne delitve fuziformnih kambijevih celic, ki so pri iglavcih dolge od 1 mm do 9 mm, »kljubujejo«



Slika 4. Aditivne delitve kambijevih celic in nastanek novih celic lesa in ličja (prečni prerez). črtkana črta predstavlja smer delitvene ravnine in mesto nastanka nove celične stene

Slika 5. Multiplikativne delitve kambijevih celic, s katerimi se povečuje obseg kambija. črtkana črta predstavlja smer delitvene ravnine in mesto nastanka nove celične stene.

Errerovemu zakonu iz leta 1888 (Chaffey, 2002). Zakon namreč pravi, da naj bi delitve v celicah potekale vzdolž najmanjše površine, kar naj bi bilo za celice najmanj potratno v časovnem, materialnem in energetskem smislu. Po tej razlagi trakovne kambijeve celice upoštevajo ta zakon, medtem ko ga fuziformne celice »kršijo«. Vendar pa je potrebno upoštevati, da je smer delitev kambijevih celic omejena, zato bi celice v primeru delitev vzdolž najmanjše površine še dodatno porabljale energijo, ki bi jo potrebovale za odrivanje drugih celic. Wulkowicz je leta 2002 na internetni strani objavil svojo razlago o smereh delitve kambijevih celic. Meni, da se Errerov zakon nanaša na celice, ki niso omejene z rastjo in se lahko delijo in rastejo praktično v vseh ravninah, za razliko od kambija, kjer je rast omejena. V drevesu so sosednje celice med seboj tesno povezane, zato se pri delitvah kambijevih celic notranje lesne celice ne morejo veliko stisniti, vendar pa zunanje floemske celice ne morejo potiskati nazaj z enako (vendar nasprotno) veliko silo. Celice v kambiju se torej delijo vzdolž površine, ki zahteva najmanj odpora. Znanstvenik (Wulkowicz, 2002) pojasnjuje »ignoranco« kambijevih celic Errerovega zakona s tem, da delovanja kambija ne moremo razumeti zgolj z vidika učinkovitosti posamezne celice. Namreč ravno to navidez »neučinkovito« delovanje kambiju omogoča, da ohranja obliko raztezajočega se cilindra. Krožna oblika lesnega valja je najboljša geometrijska oblika v smislu nadaljnje rasti in zaščite. V matematiki je osnovna definicija kroga ploščina, ki je obdana z najmanjšim možnim obsegom. V drevesu tako les predstavlja ploščino, kambij pa obseg kroga. Drevesa so torej rezultat delitev tankega sloja celic, ki so disciplinirane in zveste konceptu raztezajočega se cilindra. To ureditev in strukturo celice vzdržujejo vse življenje. V primeru določenih zunanjih sprememb in dražljajev (veter, fototropizem itd.) sicer lahko pride do rahlega odstopanja od tega modela (npr. pri nastanku reakcijskega lesa) pri čemer se oblika kroga popači, vendar pa se v normalnih pogojih delitve vršijo po prej omenjeni zakonitosti (Wulkowicz, 2002).

DELOVANJE KAMBIJA

Za drevesne vrste zmernega pasu je značilno sezonsko menjavanje obdobij fiziološke aktivnosti in mirovanja (dormance) meristemov, ki je v splošnem povezano z menjavami hladnih in toplih ali pa deževnih in sušnih obdobij (Barnett, 1971; Larcher, 2003). Ciklično delovanje kambija je povezano s spremembami kambijevih celic v ultrastrukturi, debelini celičnih sten ter razporeditvi kortikalnih mikrotubulov (Chaffey, 1999). Meristemska aktivnost se navadno prične spomladi s celičnimi delitvami in zaključi pozno poleti s popolnim razvojem zadnjih nastalih celic v braniki. Doba mirovanja se zaključi, ko si

kambij postopoma znova pridobi sposobnost produciranja novih vaskularnih tkiv ob ugodnih zunanjih pogojih (Lachaud in sod., 1999).

Proces prilagajanja kambija na hladno obdobje se pojavi na začetku dormantnega obdobja. Mirujoč kambij sestavlja manjše število celic z nekoliko debelejšimi stenami (slika 6). Celice imajo številne vakuole in gosto citoplazmo (Barnett, 1992; Farrar in Evert, 1997). Med dormantnim obdobjem se ob ugodnih pogojih vzdržujejo pomembne metabolne aktivnosti. Citoplazmatski tok prestane in za nekaj tednov po vsej verjetnosti upočasni medcelično izmenjavo.

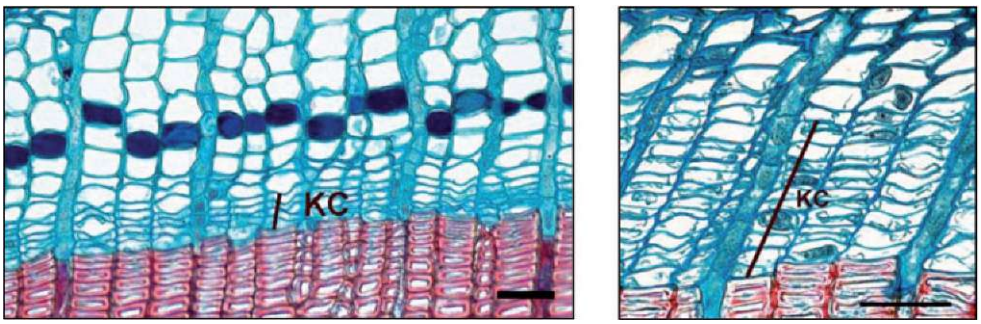
Spomladanska reaktivacija kambija je povezana z njegovo povečano občutljivostjo na rastne hormone, zlasti avksin. Majhne vakuole se prično stapljati v eno veliko in citoplazma zavzema le še ozko plast ob steni (Barnett, 1992; Farrar in Evert, 1997). Citoplazemski tok je močan, aktinski svežnji pa so jasno izraženi. Porazdelitev mikrotubulov je odvisna od faze celičnega cikla. V nedelečih celicah so mikrotubuli kortikalni in so različno orientirani. V delečih se celicah mikrotubuli oblikujejo vretenasti sistem in fragmoplast (Farrar in Evert, 1997). Število celic v kambiju se poveča, njihove stene pa postanejo tanjše.

Število celic v kambiju v vegetacijskem obdobju nakazuje ravnovesje med stopnjo produkcije (številom novonastalih celic) in stopnjo diferenciacije kambijevih derivatov (številom celic v procesu razvoja v odrasle elemente). Na začetku rastne sezone poteka delitev celic hitreje kot diferenciacija, zato širina kambija naraste (slika 6). Dokler se ohranja ravnovesje med stopnjo celične delitve ter stopnjo diferenciacije, je širina kambija bolj ali manj konstantna. Ko je stopnja diferenciacije hitrejša od stopnje delitve, se kambij začne ožati. Slednjič celične delitve popolnoma izostanejo. Večina kambijevih derivatov se ob koncu vegetacijske dobe diferencira bodisi v celice floema ali ksilema in kambij je takrat širok le nekaj celic.

Najnovejše raziskave kažejo, da se delitve v kambiju spomladi začnejo istočasno na ksilemski in floemski strani (Gričar, 2007), kar je v nasprotju z nekaterimi starejšimi spoznanji (npr. Larson, 1994). Razlike v navajanju začetka kambijeve aktivnosti so deloma tudi posledica različnih definicij kambijeve aktivnosti in posameznih faz ksilo- in floemogeneze (Larson, 1994). Razvoj floemske branike namreč poteka nekoliko drugače kot razvoj ksilemske branike. Na floemski strani kambija se spomladi 1 – 2 zunanji plasti floemskih derivatov navadno pričneta diferencirati v odrasle elemente brez predhodnih delitev, torej pred kambijevo reaktivacijo (Alfieri in Evert, 1968, 1973; Gričar in Čufar, 2008). Celične delitve v kambiju se na floemski in ksilemski strani zaključijo istočasno, medtem ko diferenciacija zadnjih nastalih floemskih in ksilemskih celic poteka še nekaj tednov po zaključku delitev v kambiju (Gričar, 2007).

MODELI KAMBIJEVE REAKTIVACIJE V DREVESU

Za opis kambijeve reaktivacije na začetku vegetacijske dobe pri difuzno poroznih in venčasto poroznih drevesnih vrstah sta znana dva modela (slika 7). Pri venčasto poroznih vrstah je reaktivacija kambija po celotnem drevesu zelo hitra ali celo istočasna (Panshin in de Zeeuw, 1980; Lachaud in sod., 1999). Pri mladem in starejšem hrastu je v enoletnem poganjku mogoče slediti potek reaktivacije kambija v bazipetalni smeri, ko napreduje od vrha proti bazi poganjka. V deblu in vejah, starejših od enega leta, pa je reaktivacija kambija skorajda istočasna. Pri bukvah, mlajših od 15 let (difuzno porozna vrsta), se kambijeva aktivnost začne najprej na bazi nabreklih brstov in nato postopoma napreduje v bazipetalni smeri tudi v ostalih delih drevesa. Pri starejših bukvah je način reaktivacije kambija podoben kot pri hrastih:v mladih vejah poteka v bazipetalni smeri, v starejših vejah in deblu pa skoraj istočasno. Reaktivacija kambija pri hrastu in bukvi poteka na dva različna načina; v bazipetalni smeri (iz nabreklih brstov v ostale dele drevesa) ali pa se zgodi istočasno po celotnem drevesu. Če se aktivnost kambija začne na bazi nabreklih brstov in se nato v bazipetalni smeri po deblu



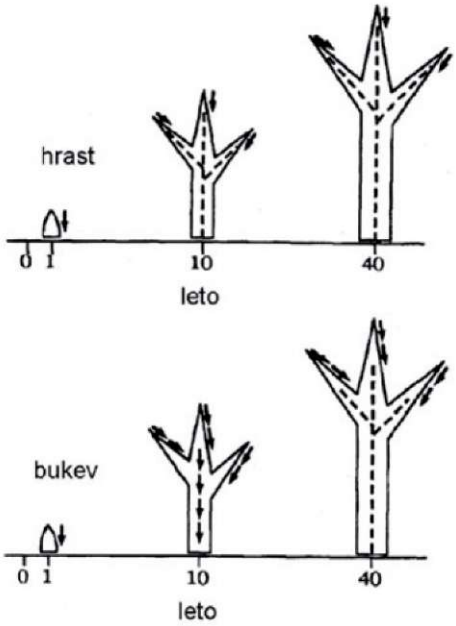
Slika 6. Dormantni (A) in aktivni (B) kambij pri jelki. V aktivnem kambiju je število celic večje. KC – kambijeve celice. Daljica = 50 pm

reaktivira, potem je odvisna od rasti popkov, pri istočasnem načinu reaktivacije pa ne. Razlika med difuzno poroznimi in venčasto poroznimi vrstami je v tem, da se pri pri bukvi aktivnost kambija začne istočasno po drevesu šele pri starejših drevesih, medtem ko je pri mladih in starejših hrastih način reaktivacije podoben. Do podobnih ugotovitev so prišli tudi pri proučevanju drugih drevesnih vrst (Lachaud in sod., 1999).

Pri iglavcih se aktivnost kambija ravno tako začne na bazi nabreklih brstov, vendar pa model še ni v celoti pojasnjen. Razlike v reaktivaciji kambija pri različnih vrstah iglavcev so najverjetneje povezane s tem, da so iglavci pretežno vednozeleni, zato se lahko avksin sintetizira tudi v starih iglicah še pred razvojem novih. Iz tega razloga je začetek celičnih delitev v vejah in deblu pri iglavcih odvisen tudi od porazdelitve starih iglic (Panshin in de Zeeuw, 1980).

UPORABA RAZLIČNIH MIKROSKOPSKIH POSTOPKOV IN TEHNIK ZA RAZISKAVE KAMBIJA

Uporaba primernih mikroskopskih postopkov in tehnik za raziskave kambija je ključna za verodostojnost pridobljenih podatkov. Vzorce, ki jih želimo opazovati npr. s svetlobnim ali elektronskim mikroskopom, moramo predhodno ustrezno obdelati, pri čemer jih skušamo čim manj poškodovati ali spremeniti. Z uporabo različnih metod stremimo k temu, da bi celice ohranili čim bliže stanju in vivo, vendar se je potrebno zavedati, da različni postopki priprave tkiv za opazovanje pod mikroskopom nemalokrat poškodujejo in s tem spremenijo organizacijo celice (Samuels in sod., 2006). Temu se je v praksi težko izogniti. Analiza vzorca pri opazovanju nam da končno oceno kvalitete uporabljenih postopkov. Pri tem ocenjujemo predvsem obliko in velikost celic, razporeditev in število opazovanih organelov ter drugih sestavnih elementov celic oz. tkiv. Fiksacija tkiv predstavlja prvi korak pri pripravi vzorca. Ustrezna in kvalitetna fiksacija je zelo pomembna zlastiv elektronski mikroskopiji (Lutar, 2009). Z ustrezno fiksacijo ohranimo v vzorcu kar največ informacij, z neprimerno pa vzorec lahko uničimo še pred nadaljevanjem.



Slika 7. Modela kambijeve reaktivacije pri hrastu in bukvi (po Lachaud in sod., 1999). Način reaktivacije pri mladih in starih hrastih je podoben: bazipetalen v enoletnih poganjih in istočasen v starejših delih drevesa. Pri mladih bukvah se kambijeva aktivnost začne najprej na bazi nabreklih brstov in nato postopoma napreduje v bazipetalni smeri tudi v ostalih delih drevesa. Pri starejših bukvah je način reaktivacije kambija podoben kot pri hrastih.

Fiksacija je postopek, ki ustavi življenjske funkcije in stabilizira strukturo vzorca. Danes imamo na voljo dve skupini postopkov fiksacije: kemijske in fizikalne (Lutar, 2009). Kemijski postopki so v uporabi praktično od začetka mikroskopije, so zelo razširjeni in prilagojeni različnim biološkim vzorcem. Pri kemijski fiksaciji fiksativ povzroči celično smrt in prepreči avtolitične spremembe. Fiksativ mora prodreti v vzorec v najkrajšem možnem času, da lahko reagira z nespremenjenimi strukturami v vzorcu. S fizikalnimi metodami fiksacije se vsem neželjenim spremembam izognemo. Fizikalni postopki so danes v glavnem zamrzovalne metode, medtem ko je uporaba drugih postopkov (npr. uporaba mikrovalov) še vedno zelo omejena. S fizikalno metodo vzorec stabiliziramo zelo hitro (v tisočinki sekunde) brez kakršnih koli kemičnih reakcij. Celice takšnega, globoko zamrznjenegavzorce, so ob primernem postopku odtajevanja sposobne preživeti, medtem ko celice s kemičnimi postopki fiksacije ubijemo. Glavni problem in slaba stran zamrzovanja je nastanek kristalov, ki pa se jih da pod elektronskim mikroskopom prepoznati (Lutar, 2009).

Najnovejše raziskave z uporabo naprednih mikroskopskih tehnik (npr. krio-fiksacije) kažejo, da so nekatera starejša spoznanja o strukturi kambija na ultrastrukturnem nivoju vprašljiva. Tankostene in visoko vakulozirane celice kambija so namreč zelo občutljive in zato zelo podvržene nastanku neželenih artefaktov, ki so nastali pri uporabi konvencionalnih postopkov in tehnik v elektronski mikroskopiji (Rensing in sod., 2002; Samuels in sod., 2006). Kambijeve celice imajo v obdobju mirovanja številne vakuole in gosto citoplazmo, kar se v živih celicah zelo dobro vidi. Kemijska fiksacija za elektronsko mikroskopijo pa lahko popolnoma spremeni morfologijo vakuol tako, da so se zdele manj številčne in večje (Rao in Catesson, 1987).

Poleg tega je oblika plazmaleme postala zavita in začele so se tvoriti invaginacije plazmaleme, ki so se vrivale v vakuolo, potiskale tonoplast v notranjost ter nazadnje prodrle v vakuolo (Farrar in Evert, 1997). Ko so raziskovalci opazovali preparate, so menili, da naj bi bile te invaginacije vključene v neposredni transport materiala iz apoplasta v vakuolo. Proces naj bi služil kot neklasično sredstvo za ločevanje proteinov ter usmerjanje v vakuolo (Farrar in Evert, 1997). Predvidevali so, da bi bil lahko povezan z akumulacijo skladiščnih produktov v kambijevih celicah, ki predstavljajo še drug očiten znak prehoda kambija v dormantno stanje (Lachaud in sod., 1999).

Novejša uporaba fizikalne fiksacije z zamrzovanjem pa je pokazala popolnoma drugačno strukturo dormantnih celic (Rensing in Samuels, 2004). Plazmalema je bila v obrisu gladka, vakuole pa so bile številne in majhne, take kot so jih zasledili pri živih celicah. Te ugotovitve potrjujejo, da je uporaba primernih mikroskopskih postopkov in tehnik za študij kambija ključna za verodostojnost podatkov in ustrezno interpretacijo rezultatov.

ZAHVALA

Prispevek je bil pripravljen v okviru raziskovalnega programa Gozdna biologija, ekologija in tehnologija P4-0107.

VIRI

1. **Alfieri F.J., Evert R.F. (1968)** Seasonal development of the secondary phloem in Pinus. American Journal of Botany, 55: 518-528
2. **Alfieri F.J., Evert R.F. (1973)** Structure and seasonal development of the secondary phloem in the Pinaceae. Botanical Gazette, 134: 17-25
3. **Barnett J.R. (1971)** Winter activity in the cambium of Pinus radiata. New Zealand Journal of Forestry Science, 1: 208-222
4. **Barnett J.R. (1992)** Reactivation of the cambium in Aesculus hippocastanum L.: Transmission electron microscope study. Annals of Botany, 70: 169-177
5. **catesson A.M., Funada R., Robert-Baby D., Quinet-Szely M., chu-Ba J., Goldberg R. (1994)** Biochemical and cytochemical cell wall changes across the cambial zone. IAWA Journal, 15: 91-101
6. **chaffey N. (1999)** Cambium: old challenges - new opportunities. Trees, 13: 138-151
7. **chaffey N. (2002)** Why is there so little research into the cell biology of the secondary vascular system of trees? New Phytologist, 153: 213-223
8. **čufar K. (2006)** Anatomija lesa. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Ljubljana, 185
9. **dengler N.G. (2001)** Regulation of vascular development. Journal of Plant Growth Regulation, 20: 1-13
10. **dermastia M. (2007)** Pogled v rastline. Nacionalni inštitut za biologijo, Ljubljana, 237
11. **Farrar J.J., evert R.F. (1997)** Ultrastructure of cell divison in the fusiform cells of the vascular cambium of Robinia pseudoacacia. Trees, 11: 203-215
12. **Gričar 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
13. **Gričar J., čufar. k. (2008)** Seasonal dynamics of phloem and xylem formation in silver fir and Norway spruce as affected by drought. Russian Journal of Plant Physiology, 55: 538-543
14. **groover A.T. (2005)** What genes make a tree a tree? Trends in Plant Science, 10: 210-214
15. **Lachaud S., catesson A.M., Bonnemain J.L. (1999)** Structure and functions of the vascular cambium. Life Sciences, 322: 633-650
16. **Larcher W. (2003)** Physiological plant ecology. Ecophysiology and stress physiology of functional groups. Fourth edition. Springer - Verlag Berlin, Heidelberg, 513
17. **Larson P.R. (1994)** The vascular cambium. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 725
18. **Lutar M. (2009)** Priprava vzorcev halofilnih nitastih gliv za vrstično elektronsko mikroskopijo. Diplomsko delo, univerzitetni študij, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana 52
19. **Mauseth J.D. (1988)** Plant anatomy. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. Menlo Park, California, 560
20. **Panshin A.J., de Zeeuw c. (1980)** Textbook of wood technology. Fourth edition. New York, McGraw-Hill, 722
21. **Plomion c., Leprovost G., Stokes A. (2001)** Wood formation in trees. Plant Physiology, 127: 1513-1523
22. **Rao K.S., catesson A.M. (1987)** Changes in the membrane components of nondividing cambial cells. Canadian Journal of Botany, 65: 246-254
23. **Rensing K.H., Samuels A.L., Savidge R.A. (2002)** Ultrastructure of vascular cambial cell cytokinesis in pine seedlings preserved by cryofixation and substitution. Protoplasma, 220: 39-49
24. **Rensing K.H., Samuels A.L. (2004)** Cellular changes associated with rest and quiescence in winter-dormant vascular cambium of Pinus contorta. Trees, 18: 373-380
25. **Samuels A.L., Kaneda M., Rensing K.H. (2006)** The cell biology of wood formation: from cambial divisions to mature secondary xylem, Canadian Journal of Forest Research, 84: 631-639
26. **Savidge R.A. (1996)** Xylogenesis, genetic and environmental regulation - a review. IAWA Journal, 17: 269-310
27. **Savidge R.A. (2000a)** Intristic regulation of cambial growth. Journal of Plant Growth Regulation, 20: 52-77
28. **Savidge R.A. (2000b)** Biochemistry of seasonal cambial growth and wood formation - an overview of the challenges. V: Cell and Molecular Biology of Wood Formation. Savidge RA (Ur.), Barnett JR (Ur.), Napier R (Ur.), BIOS Scientific Publishers Limited, Oxford, UK, 1-30
29. **Schmid R. (1976)** The elusive cambium - another terminological contribution. IAWA Bulletin, 4: 51-59
30. **Torelli N. (1990)** Les in skorja. Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo, Ljubljana, 70
31. **Torelli N. (1998)** Zunajkambijska rast v lesu dvokaličnic. Les, 50: 293-298
32. **Wilson B.F. (1966)** Mitotic activity in the cambial zone of Pinus strobus. American Journal of Botany, 53: 364-372
33. **Wulkowicz B. (2002)** http://www.enteract.com/~bobw/whytrees.html