

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA LESARSTVO

Jožica GRIČAR

**VPLIV TEMPERATURE IN PADAVIN NA KSILOGENEZO PRI
JELKI (*Abies alba*) IN SMREKI (*Picea abies*)**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**EFFECT OF TEMPERATURE AND PRECIPITATION ON
XYLOGENESIS IN SILVER FIR (*Abies alba*) AND
NORWAY SPRUCE (*Picea abies*)**

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2006

Doktorska disertacija je zaključek podiplomskega študija lesarstva. Priprava vzorcev, priprava preparatov za svetlobno mikroskopijo z drsnim in rotacijskim mikrotomom, meritve s sistemom za analizo slike ter statistična obdelava podatkov so bili opravljeni na Katedri za tehnologijo lesa Oddelka za lesarstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Prepajanje vzorcev skorje, kambija in lesa z epoksi smolo je potekalo v Laboratoriju za histologijo in elektronsko mikroskopijo na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Priprava ultra tankih preparatov, kontrastiranje s kalijevim permanganatom za transmisijsko elektronsko mikroskopijo, priprava poltankih preparatov za svetlobno mikroskopijo in UV – mikrospektrofotometrijo ter vse potrebne analize so bile opravljene na Zveznem raziskovalnem centru za gozdarstvo in gozdne produkte, Inštitutu za lesno biologijo in zaščito lesa v Hamburgu (Bundesforschungsanstalt für Forst- und Holzwirtschaft, Institut für Holzbiologie und Holzschutz, Hamburg) in na Univerzi v Hamburgu, Oddelku za lesno biologijo (Ordinariat für Holzbiologie, Universität Hamburg).

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu senata Biotehniške fakultete in sklepu komisije za podiplomski študij Univerze z dne 17.9.2004 (po pooblastilu senata Univerze z dne 29.6.2004) ter z odločbo dekana BF je bilo potrjeno, da kandidatka izpolnjuje pogoje za neposreden prehod na doktorski študij (99. člen Statuta UL) in opravljanje doktorata znanosti iz področja lesarstvo. Za mentorico je bila imenovana prof. dr. Katarina Čufar in za somentorja doc. dr. Primož Oven.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Jožica Gričar

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dd
DK UDK 630*813.11:630*811.42:630*174.7 *Abies alba*, *Picea abies*
KG *Abies alba*/*Picea abies*/ksilogeneza/nastanek lesa/temperatura/padavine/lignin/
kambijeva aktivnost/diferenciacija/celična stena/traheide
AV GRIČAR, Jožica, univ. dipl. inž. lesarstva
SA ČUFAR, Katarina (mentorica)/OVEN, Primož (somentor)/ECKSTEIN, Dieter
(recenzent)/DERMASTIA, Marina (recenzentka)/ŠTRUS, Jasna (recenzentka)
KZ SI-1000 Ljubljana, Rožna dolina c. VIII/34
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo
LI 2006
IN VPLIV TEMPERATURE IN PADAVINA NA KSILOGENEZO PRI JELKI (*Abies alba*) IN SMREKI (*Picea abies*)
TD Doktorska disertacija
OP XX, 181 str., 30 pregl., 98 sl., 6 pril., 240 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Pri smreki (*Picea abies*) in jelki (*Abies alba*) smo z metodama odvzema intaktnih vzorcev tkiv ter pinig proučili dinamiko nastanka ksilemske branike v rastni sezoni 2003. Testne jelke smo izbrali na Ravniku, smreke pa na Sorškem polju in Pokljuki. Raziskali smo zvezo med temperaturo in padavinami ter tedenskim prirastkom ksilemskih celic. Nadalje smo proučili odziv dormantnega in aktivnega kambija na eksperimentalno nadzorovano ogrevanje in ohlajanje dela debela navadne smreke v Ljubljani. V letu 2004 smo izvedli enomesečna poskusa, v letu 2005 pa sta bila poskusa zastavljena tekom celotne vegetacije. Ugotovili smo, da sta obe metodi primerni za raziskave dinamike nastanka ksilemske branike pri smreki in jelki. V letu 2003 se je kambijeva aktivnost pri testnih jelkah na Ravniku začela konec aprila, pri smrekah na Sorškem polju nekaj dni kasneje in pri smrekah na Pokljuki sredi maja. Časovni zamiki med zaporednimi fazami ksilogeneze so bili pri smreki in jelki ne glede na rastišče enaki. Diferenciacija terminalnih traheid se je pri vseh drevesih zaključila najkasneje do sredine novembra. Pri smrekah na Sorškem polju je rastna sezona 2003 trajala 2 meseca in pol, pri smrekah na Pokljuki 2 meseca in pri jelkah na Ravniku 4 mesece in pol. Gompertzova funkcija je ustrezno opisala razvoj ksilemske branike v rastni sezoni 2003 na vseh ploskvah. V povprečju je bila največja dnevna dinamika celičnih delitev pri drevesih na Pokljuki in najmanjša na Sorškem polju. Za vzorčna drevesa na Ravniku je bila izračunana končna širina ksilemske branike 2003 okoli 70 celic, na Pokljuki 42 celic in na Sorškem polju 26 celic. Maksimalna celična produkcija je bila na Pokljuki in Ravniku okoli solsticija (21.6.), na Sorškem polju pa več kot mesec dni prej. Korelacijski koeficienti linearne regresije med povprečnimi tedenskimi prirastki celic ranega lesa in temperaturnimi spremenljivkami so bili ne glede na rastišče vedno pozitivni, nastanek kasnega lesa pa je bil vselej v negativni korelaciji s temperaturami. Koeficienti linearne regresije med kumulativno tedensko vsoto padavin in tedenskimi prirastki celic na nobenem rastišču niso pokazali statistično značilnih korelacij. Ogrevanje debela smreke v letu 2004 je sprožilo zgodnejše delitve v kambiju, in sicer najprej na floemski strani, v letu 2005 pa je povečalo celično produkcijo na začetku rastne sezone in nekoliko podaljšalo kambijevo aktivnost ob koncu vegetacije. Hlajenje debela smreke na višku vegetacije 2004 je povzročilo zgodnejši nastanek kasnega lesa in hitrejši zaključek kambijeve aktivnosti. Stalno znižane temperature so skrajšale kambijevo aktivnost in zmanjšale ksilemski prirastek v letu 2005. Na proces odlaganja sekundarne stene in lignifikacije ter na vsebnost lignina temperatura ni vplivala. Znižana oz. zvišana temperatura v letu 2004 ni vplivala na širino ali anatomsko zgradbo floemskih branik. V letu 2005 pa je bilo število celic kasnega floema pri hlajenju zmanjšano ter pri ogrevanju povečano. S temperaturo je mogoče vplivati na kambijevo aktivnost pri smreki, vendar pa se njen vpliv tekom vegetacije spreminja.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dd
DC UDC 630*813.11:630*811.42:630*174.7 *Abies alba*, *Picea abies*
CX *Abies alba*/*Picea abies*/xylogenesis/wood formation/temperatura/precipitation/
lignin/cambial activity/differentiation/cell wall/tracheids
AU GRIČAR, Jožica,
AA ČUFAR, Katarina (supervisor)/OVEN, Primož (co-supervisor)/ECKSTEIN, Dieter
(co-advisor)/DERMASTIA, Marina (co-advisor)/ŠTRUS, Jasna (co-advisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Rožna dolina c. VIII/34
PB Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo
PY 2006
TI EFFECT OF TEMPERATURE AND PRECIPITATION ON XYLOGENESIS IN
SILVER FIR (*Abies alba*) AND NORWAY SPRUCE (*Picea abies*)
DT Dissertation thesis
NO XX, 181 p., 30 tab., 98 fig., 6 ann., 240 ref.
LA sl
AL sl/en
AB In Norway spruce (*Picea abies*) and silver fir (*Abies alba*), we investigated seasonal dynamics of xylem growth ring formation in growth period 2003 using pinning and intact tissue sampling methods. Test silver firs were selected at Ravnik and Norway spruce at Sorško polje and Pokljuka. We studied relation between temperatures, precipitation and weekly xylem increments. We evaluated response of dormant and active cambium to experimental heating and cooling of stem portion of Norway spruce in Ljubljana. In the year 2004, we carried out monthly experiments, and in 2005 during entire vegetation period. Both methods proved to be appropriate for research of dynamics of xylem growth ring formation. Cambial activity in 2003 started first in investigated silver firs at Ravnik (end of April), few days later in Norway spruce at Sorško polje and in Norway spruce at Pokljuka in mid-May. Time lags of successive phases of xylogenesis did not vary with regard to different species or growth sites. Differentiation of terminal late wood tracheids was in all trees finished by mid-November. In Norway spruce at Sorško polje growth season lasted 2.5 months, in Norway spruce at Pokljuka 2 months and in silver firs at Ravnik 4.5 months. Gompertz function was used for estimating trend of xylem growth ring development in 2003 at all plots. Highest dynamics of cell divisions was recorded at Pokljuka and lowest at Sorško polje. Calculated total number of cells in xylem growth ring 2003 was estimated to 70 cells at Ravnik, to 42 cells at Pokljuka and to 26 cells at Sorško polje. Maximum cell production was in experimental trees at Ravnik and Pokljuka around summer solstice (21 June), but more than a month earlier at Sorško polje. Coefficients between average weekly increments of early wood cells and temperature variables using linear regression equation were in positive correlation with temperatures irrespective of growth site. Late wood formation was negatively correlated with temperature variables. At all plots, no significant correlations were detected between weekly cumulative sum of precipitation and average weekly xylem increment. Heating in 2004 caused earlier reactivation of cambium (first on phloem side). Heating in the year 2005 increased cell production in first part of growing season, but did not considerably prolonged cambial activity. Cooling in 2004 caused earlier formation of late wood and sooner cessation of cambial activity. Cooling in 2005 shortened regular cambial activity and reduced xylem increment. Temperature did not cause alterations in pattern of secondary wall formation and lignification or lignin content. Monthly heating and cooling in 2004 did not influence widths and structure of phloem growth increments. In the year 2005, the number of late phloem cells was in cool-treated sample reduced and in heat-treated sample increased. Temperature treatment can cause alterations in regular cambial activity in Norway spruce, but its influence varies over vegetation period.

KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	XI
KAZALO PRILOG	XIX
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 BIOLOGIJA NAVADNE SMREKE	2
2.2 BIOLOGIJA NAVADNE JELKE	3
2.3 PROPADANJE JELKE IN SMREKE	4
2.4 MIKROSKOPSKA ZGRADBA LESA JELKE IN SMREKE	7
2.4.1 Makroskopski opis jelovine in smrekovine	9
2.5 TOPOGRAFIJA CELIČNE STENE TRAHEID IGLAVCEV	9
2.6 GLAVNE KEMIJSKE KOMPONENTE CELIČNE STENE TRAHEID	12
2.6.1 Polioze	12
2.6.2 Pektini in proteini	14
2.6.3 Lignin	14
2.6.3.1 Lignifikacija	15
2.6.3.2 Porazdelitev lignina po celični steni	19
2.7 KSILOGENEZA	20
2.7.1 Kambij	21
2.7.2 Diferenciacija traheid	23
2.7.2.1 Sezonska dinamika kambijeve aktivnosti	25
2.7.2.2 Dormantno obdobje	25
2.7.2.3 Sezonska dinamika ksilogeneze	26
2.7.2.3.1 Mikro vzorčenje	27
2.7.2.3.2 Metoda pining in odziv kambija na vbod z iglo	28
2.7.2.3.3 Dendrometri	31
2.7.3 Vpliv endogenih dejavnikov na ksilogenezo	32
2.7.4 Vpliv eksogenih dejavnikov na ksilogenezo	35
2.7.5 Vpliv eksperimentalno nadzorovanih razmer na kambijevo aktivnost in celično diferenciacijo	38
3 MATERIAL IN METODE	39
3.1 IZBOR TESTNIH DREVES IN PLOSKEV ZA PROUČEVANJE SEZONSKE DINAMIKE KSILOGENEZE V LETU 2003	39
3.1.1 Navadna jelka	39
3.1.2 Navadna smreka	40
3.2 VZORČENJE	41
3.2.1 Metoda odvzema intaktnih vzorcev tkiv	41
3.2.2 Metoda pining	44
3.2.2.1 Priprava vzorcev iz eksperimenta pining v delavnici	45
3.3 PRIPRAVA TRAJNIH PREPARATOV ZA SVETLOBNO MIKROSKOPIJO Z DRSNIM MIKROTOMOM	46
3.4 ANALIZA SLIKE	46
3.5 HISTOMETRIČNE ANALIZE	47
3.5.1 Vzorci intaktnih tkiv	47

3.5.2	Pining	48
3.6	STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV IN UPORABA GOMPERTZOVE FUNKCIJE	49
3.6.1	Vzorci intaktnih tkiv	49
3.6.2	Pining	49
3.6.3	Gompertzova funkcija	50
3.7	KLIMATSKI PODATKI	51
3.7.1	Analiza posameznih klimatskih parametrov in ksilemskega prirastka	52
3.8	OGREVANJE IN HLAJENJE DREVES V LETU 2004	52
3.8.1	Izbor poskusnih dreves	52
3.8.2	Postavitev grelnega sistema	53
3.8.3	Postavitev hladilnega sistema	53
3.8.4	Vzorčenje	54
3.9	OGREVANJE IN HLAJENJE DREVES V LETU 2005	55
3.9.1	Izbor poskusnih dreves	55
3.9.2	Zastavitev eksperimentov ogrevanja in hlajenja	56
3.9.3	Priprava rezin za svetlobno mikroskopijo z rotacijskim mikrotomom	57
3.9.4	Prepajanje vzorcev z epoksi smolo za LM, TEM in UMSP	58
3.9.5	Priprava poltankih rezin za svetlobno mikroskopijo z ultramikrotomom	60
3.9.5.1	Postopek obarvanja s toluidin modrim	63
3.9.6	Priprava ultra tankih rezin za TEM z ultramikrotomom	63
3.9.6.1	Postopek priprave ultra tankih rezin za TEM	63
3.9.6.2	Kontrastiranje s kalijevim permanganatom	64
3.9.7	Priprava poltankih rezin za UMSP ter analize z UMSP	66
4	REZULTATI	69
4.1	PRIMERJAVA METODE PINING IN METODE ODVZEMA INTAKTNIH VZORCEV ZA RAZISKAVE SEZONSKE DINAMIKE KSILOGENEZE	69
4.1.1	Metoda pining	69
4.1.2	Rezultati odvzema intaktnih vzorcev	75
4.2	KSILOGENEZA PRI JELKI IN SMREKI NA RAZLIČNIH RASTIŠČIH	78
4.2.1	Ksilogeneza pri jelkah na Ravniku	78
4.2.1.1	Klimatske razmere na Ravniku v rastni sezoni 2003	78
4.2.1.2	Dinamika nastajanja ksilemske branike pri jelkah na Ravniku	79
4.2.2	Ksilogeneza pri smrekah na Sorškem polju	84
4.2.2.1	Klimatske razmere na Sorškem polju v rastni sezoni 2003	84
4.2.2.2	Dinamika nastajanja ksilemske branike pri smrekah na Sorškem polju	85
4.2.3	Ksilogeneza pri smrekah na Pokljuki	91
4.2.3.1	Klimatske razmere na Pokljuki v rastni sezoni 2003	91
4.2.3.2	Dinamika nastajanja ksilemske branike pri smrekah na Pokljuki	92
4.2.4	Število kambijevih celic tekom rastne sezone pri drevesih iz vseh treh rastišč	99
4.2.5	Primerjava modelnih Gompertzovih krivulj debelinske rasti vzorčnih dreves z vseh treh ploskev	100
4.2.6	Primerjava modelnih Gompertzovih krivulj debelinske rasti dreves na Sorškem polju in na Pokljuki v letih 2002 in 2003	102
4.3	VPLIV TEMPERATURE IN PADAVIN NA KSILOGENEZO PRI NAVADNI JELKI IN NAVADNI SMREKI NA RAZLIČNIH RASTIŠČIH	106
4.3.1	Vpliv temperature in padavin na ksilogenezo pri navadni jelki na Ravniku	106

4.3.2	Vpliv temperature in padavin na ksilogenezo pri navadni smreki na Sorškem polju	110
4.3.3	Vpliv temperature in padavin na ksilogenezo pri navadni smreki na Pokljuki	117
4.4	OGREVANJE IN HLAJENJE DELA DEBLA NAVADNE SMREKE V LETU 2004	122
4.4.1	Klimatske razmere med izvajanjem eksperimentov gretja in hlajenja	122
4.4.2	Poskus z ogrevanjem	123
4.4.3	Poskus z ohlajanjem	125
4.4.4	Anatomija ksilema in floema po zaključku rastne sezone	128
4.4.5	UV spektrofotometrija in TEM	129
4.5	OGREVANJE IN HLAJENJE DELA DEBLA NAVADNE SMREKE V LETU 2005	135
4.5.1	Klimatske razmere med izvajanjem eksperimentov gretja in hlajenja	135
4.5.2	Poskus z ogrevanjem	136
4.5.3	Poskus z ohlajanjem	139
4.5.4	Kontrolni poskus	142
4.5.5	Temperature v kambiju med ogrevanjem in ohlajanjem	145
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	146
5.1	RAZPRAVA	146
5.1.1	Pining in vzorčenje intaktnih vzorcev	146
5.1.2	Vpliv temperature in padavin na dinamiko nastanka ksilemske branike 2003 pri testnih jelkah na Ravniku in smrekah na Pokljuki ter Sorškem polju	147
5.1.3	Ogrevanje in ohlajanje dela debla navadne smreke	151
5.2	SKLEPI	156
6	POVZETEK	158
7	SUMMARY	162
8	VIRI	168

ZAHVALA
PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Strukturne značilnosti navadne jelke in navadne smreke (Grosser, 1977, Schweingruber, 1990, Fengel in Wegener, 1989).....	8
Preglednica 2: Poskusna drevesa z osnovnimi značilnostmi (arhiv Katedre za tehnologijo lesa).....	40
Preglednica 3: Datumi vzorčenja (odvzem intaktnih vzorcev in pining) iz dreves na Ravniku, Sorškem polju in Pokljuki v rastni sezoni 2003.	42
Preglednica 4: Datumi vzorčenja pri poskusu ogrevanja (A)in hlajenja (B) debela pri smreki v letu 2004.....	55
Preglednica 5: Datumi vzorčenja pri poskusu ogrevanja (A)in hlajenja (B) debela pri smreki v letu 2005.....	56
Preglednica 6: Postopek prepajanja vzorcev s parafinom.....	57
Preglednica 7: Postopek odstranjevanja parafina iz rezin.....	58
Preglednica 8: Postopek dehidracije tkiv z etanolom in acetonom za vklapljanje v umetno smolo Spurr.....	59
Preglednica 9: Priprava mešanice normalno trdega "Spurra".....	59
Preglednica 10: Postopek prepajanja vzorcev z umetno smolo Spurr.....	60
Preglednica 11: Postopek polimerizacije vzorcev z umetno smolo Spurr.....	60
Preglednica 12: Podatki o začetku in koncu kambijeve aktivnosti ter prehodu iz ranega v kasni les pri posameznih jelkah na Ravniku v letu 2003. KA – kambijeve aktivnost, RL – rani les, KL – kasni les.....	79
Preglednica 13: Podatki o začetku in koncu kambijeve aktivnosti ter prehodu iz ranega v kasni les pri smrekah na Sorškem polju v letu 2003. Smreke vzorčene z ITSM so označene s št. 1, 3, 4 in 5, smreke vzorčene s PM pa s št. 11, 12, 13, 14 in 15. KA – kambijeve aktivnost, RL – rani les, KL – kasni les, ITSM – vzorčenje intaktnih tkiv, PM - pining.....	86
Preglednica 14: Podatki o začetku in koncu kambijeve aktivnosti ter prehodu iz ranega v kasni les pri posamezni smreki na Pokljuki v letu 2003. Smreke vzorčene z ITSM so označene s št. 7, 9, 10 in 12, smreke vzorčene s PM pa s št. 1, 2, 3, 4 in 5. KA – kambijeve aktivnost, RL – rani les, KL – kasni les, ITSM – vzorčenje intaktnih tkiv, PM - pining.....	93
Preglednica 15: Prikaz posameznih parametrov Gompertzove funkcije za vse tri ploskve v rastni sezoni 2003. A – zgornja asimptota predstavlja maksimalno število celic, B – mesto na osi x in predstavlja začetek kambijeve aktivnosti, k – ocena dinamike rasti, r – št. celic/dan.....	100
Preglednica 16: Prikaz posameznih parametrov Gompertzove funkcije za Pokljuko in Sorško polje v rastnih sezonah 2002 in 2003. y – tedenska kumulativna vsota celic, t – datum, A – zgornja asimptota predstavlja maksimalno število celic, B – mesto na osi x in oceni začetek kambijeve aktivnosti, k – ocena dinamike rasti, r – št. celic/dan.....	103
Preglednica 17: Korelacijski koeficienti linearne regresije med tedenskimi prirastki za rani les in vremenskimi spremenljivkami za časovne zamike 1, 2, 3, 4, 5, 6 in 7 dni od dneva vzorčenja pri jelkah na Ravniku ($p < 0,05$). T_{pov} – povprečna tedenska temperatura zraka, T_{max} – odčitana tedenska maksimalna temperatura zraka, T_{min} – odčitana tedenska minimalna temperatura zraka, T_{max} – povprečna maksimalna tedenska temperatura zraka, T_{min} – povprečna minimalna tedenska temperatura zraka, P – tedenska vsota padavin, * - statistično značilne korelacije; največje vrednosti korelacije za tedenski prirastek in posamezni vremenski parameter so odebeljene (prim. preglednica 19).....	107

- Preglednica 18: Korelacijski koeficienti linearne regresije med tedenskimi prirastki za kasni les in vremenskimi spremenljivkami za časovne zamike 1, 2, 3, 4, 5, 6 in 7 dni od dneva vzorčenja pri jelkah na Ravniku ($p < 0,05$). T_{pov} – povprečna tedenska temperatura zraka, T_{max} – odčitana tedenska maksimalna temperatura zraka, T_{min} – odčitana tedenska minimalna temperatura zraka, P – tedenska vsota padavin, * - statistično značilne korelacije; največje vrednosti korelacije za tedenski prirastek in posamezni vremenski parameter so odebeljene (prim. preglednica 20) 108
- Preglednica 19: Koeficienti linearne regresije med tedenskimi prirastki celic ranega lesa pri jelkah na Ravniku ter temperaturnimi spremenljivkami za časovni zamik, ko je bila dosežena najvišja vrednost. T_{pov} – povprečna tedenska temperatura zraka, T_{max} – odčitana tedenska maksimalna temperatura zraka, T_{min} – odčitana tedenska minimalna temperatura zraka, P – tedenska vsota padavin, * - statistično značilne korelacije; največje vrednosti korelacije za tedenski prirastek in posamezni vremenski parameter so odebeljene (prim. preglednica 17) 108
- Preglednica 20: Koeficienti linearne regresije med tedenskimi prirastki celic kasnega lesa pri jelkah na Ravniku ter temperaturnimi spremenljivkami za časovni zamik, ko je bila dosežena najvišja vrednost. T_{pov} – povprečna tedenska temperatura zraka, T_{max} – odčitana tedenska maksimalna temperatura zraka, T_{min} – odčitana tedenska minimalna temperatura zraka, P – tedenska vsota padavin, * - statistično značilne korelacije; največje vrednosti korelacije za tedenski prirastek in posamezni vremenski parameter so odebeljene (prim. preglednica 18) 109
- Preglednica 21: Korelacijski koeficienti linearne regresije med tedenskimi prirastki za rani les in vremenskimi spremenljivkami za časovne zamike 1, 2, 3, 4, 5, 6 in 7 dni od dneva vzorčenja pri smrekah na Sorškem polju ($p < 0,05$). T_{pov} – povprečna tedenska temperatura zraka, T_{max} – odčitana tedenska maksimalna temperatura zraka, T_{min} – odčitana tedenska minimalna temperatura zraka, P – tedenska vsota padavin, * - statistično značilne korelacije; največje vrednosti korelacije za tedenski prirastek in posamezni vremenski parameter so odebeljene (prim. preglednica 23) 111
- Preglednica 22: Korelacijski koeficienti linearne regresije med tedenskimi prirastki za kasni les in vremenskimi spremenljivkami za časovne zamike 1, 2, 3, 4, 5, 6 in 7 dni od dneva vzorčenja pri smrekah na Sorškem polju ($p < 0,05$). T_{pov} – povprečna tedenska temperatura zraka, T_{max} – odčitana tedenska maksimalna temperatura zraka, T_{min} – odčitana tedenska minimalna temperatura zraka, P – tedenska vsota padavin, * - statistično značilne korelacije; največje vrednosti korelacije za tedenski prirastek in posamezni vremenski parameter so odebeljene (prim. preglednica 24) 112
- Preglednica 23: Koeficienti linearne regresije med tedenskimi prirastki celic ranega lesa pri smrekah na Sorškem polju ter temperaturnimi spremenljivkami za časovni zamik, ko je bila dosežena najvišja vrednost. T_{pov} – povprečna tedenska temperatura zraka, T_{max} – odčitana tedenska maksimalna temperatura zraka, T_{min} – odčitana tedenska minimalna temperatura zraka, P – tedenska vsota padavin, * - statistično značilne korelacije; največje vrednosti korelacije za tedenski prirastek in posamezni vremenski parameter so odebeljene (prim. preglednica 21) 112

Preglednica 24: Koeficienti linearne regresije med tedenskimi prirastki celic kasnega lesa pri smrekah na Sorškem polju ter temperaturnimi spremenljivkami za časovni zamik, ko je bila dosežena najvišja vrednost. T_{pov} – povprečna tedenska temperatura zraka, T_{max} – odčitana tedenska maksimalna temperatura zraka, T_{min} – odčitana tedenska minimalna temperatura zraka, T_{pov} – povprečna tedenska temperatura zraka, linearna enačba: $prirastki = a + b * (T_{pov}, T_{max}, T_{min})$ (prim. preglednica 22)	113
Preglednica 25: Korelacijski koeficienti linearne regresije med tedenskimi prirastki za kasni les (med 20.6. in 18.7.2003) in vremenskimi spremenljivkami za časovne zamike 1, 2, 3, 4, 5, 6 in 7 dni od dneva vzorčenja pri smrekah na Sorškem polju ($p < 0,05$). P – tedenska vsota padavin, * - statistično značilne korelacije	113
Preglednica 26: Korelacijski koeficienti linearne regresije med tedenskimi prirastki za rani les in vremenskimi spremenljivkami za časovne zamike 1, 2, 3, 4, 5, 6 in 7 dni od dneva vzorčenja pri smrekah na Pokljuki ($p < 0,05$). T_{pov} – povprečna tedenska temperatura zraka, T_{max} – odčitana tedenska maksimalna temperatura zraka, T_{min} – odčitana tedenska minimalna temperatura zraka, T_{pov} – povprečna tedenska temperatura zraka, P – tedenska vsota padavin, * - statistično značilne korelacije; največje vrednosti korelacije za tedenski prirastek in posamezni vremenski parameter so odebeljene (prim. preglednica 28)	118
Preglednica 27: Korelacijski koeficienti linearne regresije med tedenskimi prirastki za kasni les in vremenskimi spremenljivkami za časovne zamike 1, 2, 3, 4, 5, 6 in 7 dni od dneva vzorčenja pri smrekah na Pokljuki ($p < 0,05$). T_{pov} – povprečna tedenska temperatura zraka, T_{max} – odčitana tedenska maksimalna temperatura zraka, T_{min} – odčitana tedenska minimalna temperatura zraka, T_{pov} – povprečna tedenska temperatura zraka, P – tedenska vsota padavin, * - statistično značilne korelacije; največje vrednosti korelacije za tedenski prirastek in posamezni vremenski parameter so odebeljene (prim. preglednica 29)	119
Preglednica 28: Koeficienti linearne regresije med tedenskimi prirastki celic ranega lesa pri smrekah na Pokljuki ter temperaturnimi spremenljivkami za časovni zamik, ko je bila dosežena najvišja vrednost. T_{pov} – povprečna tedenska temperatura zraka, T_{max} – odčitana tedenska maksimalna temperatura zraka, T_{min} – odčitana tedenska minimalna temperatura zraka, T_{pov} – povprečna tedenska temperatura zraka, linearna enačba: $prirastki = a + b * (T_{pov}, T_{max}, T_{min})$ (prim. preglednica 26)	119
Preglednica 29: Koeficienti linearne regresije med tedenskimi prirastki celic kasnega lesa pri smrekah na Pokljuki ter temperaturnimi spremenljivkami za časovni zamik, ko je bila dosežena najvišja vrednost. T_{pov} – povprečna tedenska temperatura zraka, T_{max} – odčitana tedenska maksimalna temperatura zraka, T_{min} – odčitana tedenska minimalna temperatura zraka, T_{pov} – povprečna tedenska temperatura zraka, linearna enačba: $prirastki = a + b * (T_{pov}, T_{max}, T_{min})$ (prim. preglednica 27)	120
Preglednica 30: Temperature v kambiju v izoliranem delu debla ter nad in pod njim. Zabeležene so bile med nadzorovanim ogrevanjem in ohlajanjem.	145

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Naravna razširjenost smreke v Evropi (Brus, 2004).....	3
Slika 2: Razširjenost naravne jelke v Evropi (Brus, 2004).....	4
Slika 3: Zaporedja širin branik navadnih jelk z Ravnika, vzorčenje 1997. Razred A (tanka črta), B (=B2, črtkana črta) in C (debela črta) (arhiv Katedre za tehnologijo lesa).....	7
Slika 4: Anatomska zgradba lesa jelke. A – prečni; B – radialni; C tangencialni prerez. Daljica = 100 µm.....	8
Slika 5: Anatomska zgradba lesa smreke. A – prečni; B – radialni; C tangencialni prerez. Daljica = 100 µm.....	9
Slika 6: Zgradba celične stene iglavca. A – Shematski prikaz (Panshin in de Zeeuw, 1980); B – Večslojna celična stena traheid navadne jelke posneta s transmissijskim elektronskim mikroskopom (orig.). ZLS – združena srednja lamela, CV – celični vogal, ML – srednja lamela, P – primarna stena, S1, S2, S3 – sloji sekundarne celične stene, W – bradavičasti sloj.....	11
Slika 7: Shema usmerjenosti celuloznih mikrofibril v primarni (P) in sekundarni (S) celični steni traheide (A) ter delež posameznega sloja (B) - (Wardrop, 1965).....	11
Slika 8 A: Shematski diagram glavnih strukturnih komponent primarne celične stene ter njihova razporeditev. Celulozne mikrofibrile so obdane s hemicelulozami in povezane v trden pletež. Pektini oblikujejo matriksni gel in najverjetneje vzajemno delujejo s strukturnimi proteini. B: Strukturni model celulozne mikrofibrile. Mikrofibrila vsebuje območje visoke kristaliničnosti pomešane z amorfnimi področji. Hemiceluloze vezane na površino celulozne molekule so lahko ujete znotraj mikrofibrilnega pleteža. C: Shema sinteze celuloznih mikrofibril v rozetah. Sinteza je najverjetneje vodena z mikrotubuli. D: Model celulozne sinteze v rozeti, ki vsebuje celulozo sintazo. UDP (uridin difosfat)-glukoza dodaja glukozne enote rastoči glukanski verigi. Saharoza sintaza najverjetneje prenaša glukozo iz saharoze do UDP-glukoze. Ali pa je UDP-glukoza pridobljena neposredno iz citoplazme. E: Shematski prikaz sinteze in dovoda matričnih polisaharidov v celično steno. Polisaharidi so encimsko sintetizirajo v Golgijevem aparatu ter nato izločijo v plazemsko membrano z združitvijo membranskih veziklov (Teiz in Zeiger, 2002).....	13
Slika 9: Glavni trije monolignoli v nativnem ligninu (Hatfield in Vermerris, 2001).	15
Slika 10: Shematski prikaz biosinteze lignina v celični steni (Taiz in Zeiger, 2002).....	16
Slika 11: Shematski prikaz odlaganja lignina v primarni steni in srednji lameli (A) ter v slojih sekundarne celične stene, kjer so celulozne mikrofibrile usmerjene (Donaldson, 1994).....	16
Slika 12: Shema in prečni prerez mikroskopskega preparata navadne jelke prikazujeta posamezne faze ksilogeneze po obarvanju kambija in ksilemskega tkiva z barviloma safranin in astra modro: kambijeve celice imajo majhne radialne dimenzije in tanke, nelignificirane primarne stene, ki so obarvane modro. V lumnih je prisotna citoplazma. V fazi postkambijske rasti se radialne dimenzije celic povečajo, tanka primarna stena je modro obarvana in nelignificirana, v lumnih je prisotna citoplazma. V fazi sinteze večslojne sekundarne stene in lignifikacije se celična stena prične debeliti. V centripetalni smeri proti lumnu z lignifikacijo rdeča barva nadomešča modro, v lumnih je še vedno prisotna citoplazma. Za zrele traheide je značilna rdeče obarvana, lignificirana celična stena, lumni pa so prazni (Uggla in Sundberg, 2002).....	20

Slika 13: A – Možne smeri delitev kambijeve fuziformne inicialke: a – antikline ali multiplikativne delitve, p – perikline oziroma aditivne delitve, ki dodajajo nove celice ksilemskemu ali floemskemu tkivu, t – transversalne oziroma prečne delitve, ki vodijo do nastanka trakovnih inicialk; B – Antikline (C-C) in perikline (C-P ali C-X) delitve v kambiju (Barlow in sod., 2002).	23
Slika 14: Shematski prikaz oblikovanja slojev sekundarne celične stene v diferencirajoči celici. Faze diferenciacije so med seboj povezane. Debelitev celične stene (1) se v osrednjem delu celice prične, preden se rast celice v vršičkih ustavi. Lignifikacija se prične, preden je celična stena dokončno formirana (Wardrop, 1965).	24
Slika 15: Shema nastanka celične stene. ML – srednja lamela, P – primarna stena, S1, S2, S3 – sloji sekundarne celične stene, CC – celični vogali, CML – združena srednja lamela, SW – sekundarna stena, H – p-hidroksifenilpropanske enote, G – gvajacilpropanske enote, S – siringilpropanske enote, FA – ferulska kislina, CA – p-kumaridna kislina, PVX – traheja protoksilema (Terashima, 2000, Takabe, 2002).	24
Slika 16: Shema treh različnih obdobij dormance, kot so jih predlagali Lang in sodelavci (1987).	26
Slika 17: Eden najnovejših specifičnih orodij za odvzem mikro izvrtkov je Trephor, ki ga je razvila italijanska skupina raziskovalcev iz Padove (Rossi in sod., 2006a) (Foto: L. Marion).	28
Slika 18: Shema nastanka travmatskega smolnega kanala pri <i>Tsuga sieboldii</i> po: (I) treh dneh, (II) desetih dneh in (III) enem mesecu po poškodovanju. C.I. – kambijeve inicialke, X.M. – ksilemske materinske celice, prekinjena črta – položaj kambijevih inicialk v trenutku poškodovanja (Kuroda in Shimaji, 1983).	29
Slika 19: Shema odziva tkiv na vbod z iglo pri <i>Pinus taeda</i> : (a) neposredni odziv na vbod z iglo, (b) odziv po nekaj dneh, (c) odziv po desetih dneh in (d) odziv po enem mesecu. (1) domnevni položaj kambijevih inicialk v trenutku ranitve, (2) domnevni položaj celic v fazi odlaganja sekundarne celične stene v času ranitve. P – floem, R – trakovni parenhim, Ca – vrzel nastala z vbodom (Yoshimura in sod., 1981a).	30
Slika 20: Shematski prikaz odziva tkiv na vbod z iglo pri <i>Pinus taeda</i> v radialni ravnini: a) neposreden vbod z iglo; b) odziv po izvleku igle; X – ksilem, P – floem, G – odprtina nastala z vbodom, AR – letnica med tekočo braniko in braniko prejšnjega leta (Kuroda in Shimaji, 1984b).	31
Slika 21: Shema lokacije kambija v času poškodbe na prečnem prerezu pri <i>Chamaecyparis obtusa</i> . Pa – kalusne celice, Tr – traheide poranitvenega lesa (Kuroda in Kiyono, 1997).	31
Slika 22: Shematski prikaz porazdelitve avksina, karbohidratov in aktivnosti saharoznih presnovnih encimov v kambiju, diferencirajočih se in zrelih derivatih ranega in kasnega lesa (Uggla in sod., 2001). FP – floemske celice, Suc – saharoza, Fru – fruktoza, Glu – gluktoza, Susy – saharozna sintaza, SPS – Suc-fosfatna sintaza, Al – kislinska invertaza, FP – floem, CZ – kambij, ET – traheide v postkambijski rasti, EW (l) – traheide ranega lesa v procesu odlaganja sekundarne celične stene in lignifikacije, EW(d) – zrele traheide, LW(l) – traheide kasnega lesa v procesu odlaganja sekundarne celične stene in lignifikacije	35
Slika 23: A – Zdrava jelka iz razreda A; B – Prizadeta jelka iz razreda C (Foto: arhiv Katedre za tehnologijo lesa).	39
Slika 24: A – Gozdovi navadne smreke na Pokljuki; B – Rastišče, na katerem so bila izbrana vzorčna drevesa (Foto: M. Zupančič).	40

Slika 25: A – Sestoj navadne smreke na Sorškem polju; B – Eno izmed vzorčnih dreves (Foto: M. Zupančič).....	41
Slika 26: Shematski prikaz odvzema intaktnih vzorcev tkiv: A – Odstranitev odvečnega ritidoma in najstarejšega dela žive skorje, vertikalna vzporedna reza z Olfa nožem; B – Horizontalna vzporedna zaseka z dletom pod kotom približno 45°; C – Horizontalna zaseka z dletom pod pravim kotom; D – S strižno silo smo ločili vzorec od preostalega tkiva in ga izvlekli iz debla. Velikost vzorca je bila 1 x 1 x 3 cm ³	43
Slika 27: A – Vzorec tik pred odvzemom iz debla drevesa; B – Vzorec ločen od preostalega tkiva; C – Prikaz razporeditve vzorčenja po obodu drevesa (Foto: M. Zupančič).....	43
Slika 28: Metoda pinig: A – Shematski prikaz nivojev vbodov z iglo. B – Označena mesta vbodov z različnimi barvami (Foto: M. Zupančič).....	44
Slika 29: Metoda pinig: A – Shematski prikaz z iglo prebodenih tkiv v prečnem prerezu. B – Shematski prikaz razporeditve vbodov v prečnem prerezu debla. Zaporedne številke ustrezajo datumom v preglednici 3.....	45
Slika 30: Priprava vzorcev lesa iz eksperimenta pinig. A – Razrez dela debla na kolute; B – Označeni vzorci (Foto: M. Zupančič).	45
Slika 31: Trajno shranjeni intaktni vzorci tkiv v penicilinkah v 70% etanolu (Foto: M. Zupančič).....	46
Slika 32: Posamezne faze ksilogeneze na prečnem prerezu. KC – kambijeve celice; PR – traheide v fazi postkambijske rasti; SL – sinteza sekundarne celične stene in lignifikacija; MT – zrele traheide. Daljica = 100 µm	47
Slika 33: Prikaz analiziranih mest in znakov na vzorcu; BST1, BST2 – število nastalih celic v braniki 2003; SST1, SST2, SST3 – število nastalih celic do datuma vboda.	48
Slika 34: Vremenska postaja Davis postavljena na Ravniku (Foto: M. Zupančič).	52
Slika 35: A – Postavitev distančnikov in grelnega kabla okrog dela debla drevesa. Vmes je nameščen temperaturni senzor. B – Postavljen in izoliran grelni sistem (Foto: M. Zupančič).	53
Slika 36: A – Postavitev distančnikov in bakrenih cevi okrog dela debla drevesa. Vmes je nameščen temperaturni senzor. B – Postavljen in izoliran hladilni sistem (Foto: M. Zupančič).	54
Slika 37: Merjenje temperature v kambijevem območju (Foto: M. Zupančič).....	57
Slika 38: Shematski prikaz obrezovanja in oblikovanja bloka. Vzorec tkiva črne barve je v principu mogoče s petimi glavnimi rezi oblikovati v trapez. Rez 1 je narejen paralelno s površino rezanja in odstrani presežni vklopni medij ter izravna površino rezanja. Rezi 2-5 so narejeni pod določenimi koti na površino rezanja in dokončno oblikujejo prirezano piramido. Reza 2 in 3 predstavljata glavni stranici trapeza, ki morata biti med seboj paralelni. Reza 4 in 5 predstavljata stranski stranici trapeza, ki morata biti pod istim kotom glede na osnovni stranici (Robinson in sod., 1987).	61
Slika 39: A – Stekleni nož s plastično banjico pritrjeno z voskom; B – Ostrina steklenega noža. Območje S se za rezanje ne uporablja, ker ima zelo slabo ostrino. Območje Z je najostrejša in predstavlja približno 1/3 noža. Območje E je manjše ostrine in se največkrat uporablja za predpripravo površine za rezanje; C – Diamantni nož vključen v kovinsko ogrodje z banjico (Robinson in sod., 1987).	61
Slika 40: Prikaz odrezovanja; a – c Ustrezna postavitev bloka vzorca tkiv glede na rezilo noža z različnih pogledov; d – Geometrijski parametri pri odrezovanju (Robinson in sod., 1987).	62
Slika 41: Shema pobiranja rezin iz banjice; a – Razdelitev traku rezin na krajše odseke s pomočjo trepalnice pritrjene na palčki; b – Pobiranje rezin iz banjice na mrežo v	

prikazani smeri; c – Osušitev mreže s koščkom filtrirnega papirja (Robinson in sod., 1987).....	64
Slika 42: Barvanje rezin z lebdjenjem mrežic na kapljicah kalijevega permanganata (Robinson in sod., 1987).....	66
Slika 43: Prečni prerezi poškodovanega tkiva pri navadni smreki pri vbodu z iglo. A – Nastanek kalusa (C), travmatskih smolnih kanalov (TRC) in poranitvenega lesa (W-W) kot odziv na poškodbo, B – Tangencialna ureditev TRC (črni puščici) ter njihov nastanek v kalusu (modra puščica); C, E – Ostanke kambijevih celic (zeleni puščici) in celice v postkambijski rasti (vijolični puščici) v kalusu. Pod kalusom so dobro vidne celice v fazi odlaganja sekundarne celične stene in lignifikacije (roza puščica) in zrele traheide (rjava puščica). D – Reaktivacija kambija po prenehanju redne meristemske aktivnosti kot odziv na vbod. Daljica = 100 µm	71
Slika 44: A – Ksilemski prirastek 2003 nastal do trenutka ranitve. B – Začetek kambijeve delitvene aktivnosti. V kalusu so vidne prve celice v postkambijski rasti neposredno ob braniki 2002. C – Konec kambijeve aktivnosti. D – Raztrgano tkivo v kalusu. Daljica = 100 µm.....	72
Slika 45: Nastanek ksilemske branike 2003 pri navadni smreki. A – Datum ranitve 9.5.2003. Kambijeva aktivnost se še ni pričela; B – Datum ranitve 16.5.2003. Kambijeva aktivnost se še ni pričela; C – Datum ranitve 23.5.2003. Začetek kambijeve aktivnosti; D – Datum ranitve 30.5.2003. Celice ranega lesa v fazi postkambijske rasti; E – Datum ranitve 6.6.2003. Sinteza sekundarne celične stene in lignifikacija traheid ranega lesa; F – Datum ranitve 13.6.2003. Traheide ranega lesa v procesu diferenciacije. Daljica = 100 µm.....	73
Slika 46: Nastanek ksilemske branike 2003 pri navadni smreki. A - Datum ranitve 20.6.2003. Prve odrasle traheide ranega lesa; B – Datum ranitve 27.6.2003. Začetek nastajanja prehodnega lesa; C – Datum ranitve 4.7.2003. Pričetek nastajanja kasnega lesa; D – Datum ranitve 11.7.2003. Nastajanje traheid kasnega lesa; E – Datum ranitve 18.7.2003. Traheide kasnega lesa v procesu diferenciacije; F – Datum ranitve 25.7.2003. Nastanek zadnjih traheid kasnega lesa branike 2003. Daljica = 100 µm.	74
Slika 47: Nastanek ksilemske branike 2003 pri navadni smreki. Datum ranitve 1.8.2003. Konec kambijeve aktivnosti. Terminalne traheide kasnega lesa pod kalusom so v zaključnih fazah diferenciacije. Daljica = 100 µm.	75
Slika 48: A – Dormanten kambij pri jelki sestavljen iz 7 do 8 slojev celic z majhnimi radialnimi dimenzijami in debelejšimi celičnimi stenami. B – Ob kambijevi aktivnosti se je število celic v kambiju podvojilo. KC – kambijeve celice; daljica = 50 µm	76
Slika 49: Faze nastajanje ksilemske branike pri smreki in jelki. A – Širok kambij in prve oblikovane ksilemske celice v postkambijski rasti. B – Lignifikacija celičnih sten traheid se je pričela v celičnih vogalih in in smo jo prepoznali po rdečem obarvanju. C – Meja med fazo postkambijske rasti in sinteze sekundarne stene je bila najbolj jasna pod polarizirano svetlobo. D – Število celic v kambiju se je med nastajanjem kasnega lesa začelo zmanjševati. Zrele traheide z rdeče obarvanimi celičnimi stenami in praznimi lumni. E – Po zaključku kambijeve aktivnosti je razvoj zadnjih nastalih traheid kasnega lesa še nekaj časa potekal. F – Popolnoma oblikovana ksilemska branika 2003. KC – kambijeve celice, PR – ksilemske celice v postkambijski rasti, SL – ksilemske celice v fazi odlaganja sekundarne celične stene in lignifikacije, MT – zrele traheide; daljica = 100 µm.....	77
Slika 50: Povprečne, maksimalne in minimalne dnevne temperature zraka ter količina padavin na Ravniku (600 m n.m.) v rastni sezoni 2003.....	78

Slika 51: Povprečna dinamika nastajanja ksilemske branike in posameznih faz ksilogeneze pri vseh proučevanih jelkah na Ravniku v rastni sezoni 2003 raziskovana z metodo odvzema intaktnih vzorcev. KC – kambijeve celice, PR – celice v postkambijski rasti, SL – celice v fazi sinteze sekundarne celične stene in lignifikacije, M – zrele traheide, T – skupno število nastalih ksilemskih celic	80
Slika 52: Dinamika nastanka ksilemske branike pri posameznih proučevanih jelkah na Ravniku v rastni sezoni 2003.	81
Slika 53: Prikaz variabilnosti v številu celic v ksilemski braniki 2003 po obodu drevesa pri posamezni jelki na Ravniku. Vzorci so bili odvzeti po zaključku kambijeve aktivnosti, ko diferenciacija zadnjih nastalih traheid še ni bila zaključena.	82
Slika 54: Model (rdeča črta) dinamike nastajanja ksilemske branike pri jelkah na Ravniku v rastni sezoni 2003. Črne pike označujejo dejanske povprečne vrednosti, modra črta pa izračunan tedenski prirastek celic. G – Gompertzova funkcija, W – tedenski prirastki, T – dejanski prirastki	83
Slika 55: Prikaz razporejenosti ostankov v pasu -3 do +3 za modelno funkcijo. V tem primeru je le ena vrednost večja kot 2, vendar manjša od 3.	84
Slika 56: Povprečne, maksimalne in minimalne dnevne temperature zraka ter količina padavin na Sorškem polju (350 m n.v.) v rastni sezoni 2003.	85
Slika 57: Povprečna dinamika nastajanja ksilemske branike in posameznih faz ksilogeneze pri vseh proučevanih smrekah na Sorškem polju v rastni sezoni 2003 z metodo odvzema intaktnih vzorcev. KC – kambijeve celice, PR – celice v postkambijski rasti, SL – celice v fazi sinteze sekundarne celične stene in lignifikacije, M – zrele traheide, T – skupno število nastalih ksilemskih celic, ITSM – vzorčenje intaktnih tkiv, PM - pinning	86
Slika 58: Povprečna dinamika nastajanja ksilemske branike pri vseh proučevanih smrekah na Sorškem polju v rastni sezoni 2003 ugotovljena z metodo pinning.	87
Slika 59: Dinamika nastanka ksilemskih celic pri vseh proučevanih smrekah na Sorškem polju v rastni sezoni 2003 ugotovljena z dvema metodama. Smreke vzorčene z ITSM so označene s št. 1, 3, 4 in 5, smreke vzorčene s PM pa s št. 11, 12, 13, 14 in 15. ITSM – vzorčenje intaktnih tkiv, PM - pinning	88
Slika 60: Prikaz variabilnost v številu celic v ksilemski braniki 2003 po obodu drevesa pri posamezni smreki na Sorškem polju. Vzorci so bili odvzeti po zaključku kambijeve aktivnosti, ko se je diferenciacija zadnjih nastalih traheid še nadaljevala.	89
Slika 61: Model (rdeča črta) dinamike nastajanja ksilemske branike pri smrekah na Sorškem polju v rastni sezoni 2003. Črne pike označujejo dejanske povprečne vrednosti, modra črta pa izračunan tedenski prirastek celic. G – Gompertzova funkcija, W – tedenski prirastki, T – dejanski prirastki	90
Slika 62: Prikaz razporejenosti ostankov v pasu -3 do +3 za modelno funkcijo. V tem primeru je le ena vrednost večja kot 2, vendar manjša od 3.	91
Slika 63: Povprečne, maksimalne in minimalne dnevne temperature ter količina padavin na Pokljuki (1200 m n.v.) v rastni sezoni 2003.	92
Slika 64: Povprečna dinamika nastajanja ksilemske branike in posameznih faz ksilogeneze pri vseh proučevanih smrekah na Pokljuki v rastni sezoni 2003 z metodo odvzema intaktnih vzorcev. KC – kambijeve celice, PR – celice v postkambijski rasti, SL – celice v fazi sinteze sekundarne celične stene in lignifikacije, M – zrele traheide, T – skupno število nastalih ksilemskih celic, ITSM – vzorčenje intaktnih tkiv, PM - pinning	93
Slika 65: Povprečna dinamika nastajanja ksilemske branike pri vseh proučevanih smrekah na Pokljuki v rastni sezoni 2003 ugotovljena z metodo pinning.	94

Slika 66: Dinamika nastanka ksilemskih celic pri vseh proučevanih smrekah na Pokljuki v rastni sezoni 2003 ugotovljena z dvema metodama. Smreke vzorčene z ITSM so označene s št. 7, 9, 10 in 12, smreke vzorčene s PM pa s št. 1, 2, 3, 4 in 5. ITSM – vzorčenje intaktnih tkiv, PM - pinning.....	95
Slika 67: Prikaz variabilnost v številu celic v ksilemski braniki 2003 po obodu drevesa pri posamezni smreki na Pokljuki. Vzorci so bili odvzeti po zaključku kambijeve aktivnosti, ko se je diferenciacija zadnjih nastalih traheid še nadaljevala.	97
Slika 68: Model (rdeča črta) dinamike nastajanja ksilemske branike pri smrekah na Pokljuki v rastni sezoni 2003. Črne pike označujejo dejanske povprečne vrednosti, modra črta pa izračunan tedenski prirastek celic. G – Gompertzova funkcija, W – tedenski prirastki, T – dejanski prirastki	98
Slika 69: Prikaz razporejenosti ostankov v pasu -3 do +3 za modelno funkcijo. V tem primeru sta 2 vrednosti večja od 2, vendar ni nobene večje od 3.	99
Slika 70: Povprečno št. kambijevih celic tekom rastne sezone pri drevesih z vseh treh ploskev.	100
Slika 71: Izračunano število nastalih ksilemskih celic na dan na posamezni ploskvi v letu 2003.....	102
Slika 72: Model (rdeča črta) dinamike nastajanja ksilemske branike pri smrekah na Pokljuki v rastni sezoni 2002. Črne pike označujejo dejanske povprečne vrednosti, modra črta pa izračunan tedenski prirastek celic. G – Gompertzova funkcija, W – tedenski prirastki, T – dejanski prirastki	104
Slika 73: Modelna krivulja (rdeča črta) dinamike nastajanja ksilemske branike pri smrekah na Sorškem polju v rastni sezoni 2002. Črne pike označujejo dejanske povprečne vrednosti, modra črta pa izračunan tedenski prirastek celic. G – Gompertzova funkcija, W – tedenski prirastki, T – dejanski prirastki	104
Slika 74: Izračunano število nastalih ksilemskih celic na dan na posameznih ploskvah v letih 2002 in 2003.....	105
Slika 75: Povprečni dejanski tedenski prirastki jelk in povprečna, maksimalna in minimalna dnevna temperatura zraka na Ravniku tekom rastne sezone.....	109
Slika 76: Povprečni tedenski prirastki jelk na Ravniku in temperaturne spremenljivke zraka za časovne zamike, ki so pokazali najvišje korelacije: 1, 5 in 7 dni od dneva vzorčenja. T_{av} – povprečna tedenska temperatura zraka, T_{max} – odčitana tedenska maksimalna temperatura zraka, T_{min} – odčitana tedenska minimalna temperatura zraka, T_{max} – povprečna maksimalna tedenska temperatura zraka, T_{min} – odčitana tedenska minimalna temperatura zraka, T_{min} – povprečna minimalna tedenska temperatura zraka.....	110
Slika 77: Povprečni dejanski tedenski prirastki smrek in povprečna, maksimalna in minimalna dnevna temperatura zraka na Sorškem polju tekom rastne sezone.	114
Slika 78: Povprečni dejanski tedenski prirastki smrek in skupna dnevna količina padavin na Sorškem polju tekom rastne sezone.....	115
Slika 79: Povprečni tedenski prirastki smrek na Sorškem polju in temperaturne spremenljivke zraka za časovne zamike, ki so pokazali najvišje korelacije: 1, 3 in 7 dni od dneva vzorčenja. T_{av} – povprečna tedenska temperatura zraka, T_{max} – odčitana tedenska maksimalna temperatura zraka, T_{min} – odčitana tedenska minimalna temperatura zraka, T_{max} – povprečna maksimalna tedenska temperatura zraka, T_{min} – odčitana tedenska minimalna temperatura zraka, T_{min} – povprečna minimalna tedenska temperatura zraka.....	116
Slika 80: Povprečni tedenski prirastki smrek na Sorškem polju in tedenska količina padavin za časovne zamike 1, 2, 3, 4, 5, 6 in 7 dni od dneva vzorčenja pri smrekah na Sorškem polju. P – tedenska vsota padavin.....	117
Slika 81: Povprečni dejanski tedenski prirastki smrek in povprečna, maksimalna in minimalna dnevna temperatura zraka na Pokljuki tekom rastne sezone.....	120

- Slika 82: Povprečni tedenski prirastki smrek na Pokljuki in temperaturne spremenljivke zraka za časovna zamika, ki so pokazali najvišje korelacije: 1 in 7 dni od dneva vzorčenja. T_{av} – povprečna tedenska temperatura zraka, T_{max} – odčitana tedenska maksimalna temperatura zraka, T_{min} – odčitana tedenska minimalna temperatura zraka, T_{max} – povprečna maksimalna tedenska temperatura zraka, T_{min} – odčitana tedenska minimalna temperatura zraka, T_{min} – povprečna minimalna tedenska temperatura zraka..... 121
- Slika 83: Povprečne, maksimalne in minimalne dnevne temperature zraka ter količina padavin v Ljubljani (323 m n.v.) v letu 2004 med izvajanjem gretja in hlajenja dela debela navadne smreke. Obdobje izvajanja obeh eksperimentov je označeno s puščicama..... 122
- Slika 84: Odziv kambija na eksperimentalno ogrevanje. A – Dormanten kambij, sestavljen iz 4 do 5 plasti kambijevih celic; B – Floemske celice nastale po 10 dneh ogrevanja; C – Floemske in ksilemske celice v postkambijski rasti nastale po 20 dneh ogrevanja; D – Floemske in ksilemske celice v postkambijski rasti ter fazi odlaganja sekundarne celične stene in lignifikacije nastale po 30 dneh ogrevanja; E – Pričetek redne kambijeve aktivnosti pri kontrolnem drevesu po 30 dneh; F – floemske celice, KC – kambijeve celice, PR – ksilemske celice v postkambijski rasti, SL – ksilemske celice v fazi odlaganja sekundarne celične stene in lignifikacije; A: daljica = 50 μm ; B, C, D, E: daljica = 100 μm 124
- Slika 85: Odziv kambija na eksperimentalno ohlajanje. A – Stanje v floemu, kambiju in ksilemu ob pričetku eksperimenta v sredini junija; B – Stanje v floemu, kambiju in ksilemu pri kontrolnem in hlajenem vzorcu po 10 dneh hlajenja; C, D – Po 20 dneh hlajenja ni bilo opaziti nobenih razlik na anatomskem nivoju med kontrolnim (C) in hlajenim (D) vzorcem; F – floemske celice, KC – kambijeve celice, PR – ksilemske celice v postkambijski rasti, SL – ksilemske celice v fazi odlaganja sekundarne celične stene in lignifikacije; A, C, D: daljica = 50 μm , B: daljica = 100 μm 126
- Slika 86: Odziv kambija na eksperimentalno ohlajanje po 30 dneh. A – Nastanek kasnega lesa pri hlajenem vzorcu; B – Rani oziroma prehodni les nastal pri kontrolnem drevesu; C – Kambij širok le 5 plasti celic pri hlajenem vzorcu; F – floemske celice, KC – kambijeve celice, PR – ksilemske celice v postkambijski rasti, SL – ksilemske celice v fazi odlaganja sekundarne celične stene in lignifikacije; B, C: - daljica = 50 μm , A: daljica = 100 μm 127
- Slika 87: Prečni prerezi ksilemskih branik 2004 po zaključku rastne sezone. A – ogrevani vzorec; B – hlajeni vzorec z zmanjšanim deležem kasnega lesa; C – kontrolno drevo. Daljica = 100 μm 128
- Slika 88: UV-absorpcijski spektri, izmerjeni v notranjih področjih sekundarne celične stene pri ogrevanem, hlajenem in kontrolnem vzorcu smreke kažejo tipični absorpcijski maksimum pri 280 nm valovne dolžine. Nizke absorpcijske vrednosti nakazujejo nezaključen proces lignifikacije..... 129
- Slika 89: 3D profili celičnih sten diferencirajočih traheid ranega lesa ogrevanega vzorca skeniranega z geometrično resolucijo 0,25 μm^2 . Barvna lestvica izraža različne UV absorpcijske vrednosti pri 280 nm valovne dolžine. A – 4-5 tangencialna celična stena traheid od kambija, B – 5-6, C – 6-7, D – 7-8, E – 8-9, F – 9-10, G – 10-11 in H – 11-12 celična stena traheid od kambija. 131
- Slika 90: UV posnetek ksilemskega tkiva ogrevanega vzorca. Vsebnost lignina v celičnih stenah traheid z oddaljenostjo od kambija narašča..... 132
- Slika 91: TEM posnetki tangencialnih celičnih sten traheid pri kontrolnih in ogrevanih oziroma hlajenih vzorcih. A – Ogrevani vzorec po 30 dneh, traheidi ranega lesa s tankimi celičnimi stenami v bližini kambija, združena srednja lamela, sloj S1 ter zunanje področje S2 so lignificirani, notranji sloj S2 je nelignificiran; B –

- Ogrevani vzorec po 30 dneh, pri 8 in 9 traheidi od kambija je debelina sekundarne celične stene narasla; C – Hlajeni vzorec po 30 dneh, 9 in 10 celična stena traheid od kambija je nepopolnoma oblikovana; D – Hlajen vzorec po 30 dneh, 13-14 sekundarna stena celic od kambija, ki so prve z dokončno oblikovano sekundarno celično steno; E – Kontrolni vzorec po 30 dneh, sekundarna stena traheid 6-7 celic od kambija ni popolnoma oblikovana; F – Kontrolni vzorec po 30 dneh, sekundarna celična stena traheid 9-10 celic od kambija je debeljša od mlajših, a še vedno ni v celoti oblikovana. 134
- Slika 92: Povprečne, maksimalne in minimalne dnevne temperature zraka ter količina padavin v Ljubljani (323 m n.m.) v letu 2005 med izvajanjem eksperimentov hlajenje in ogrevanja. Obdobje izvajanja obeh eksperimentov je označeno s puščicama. 135
- Slika 93: Odziv kambija navadne smreke na nadzorovano ogrevanje na prečnih prerezi tkiv pod svetlobnim mikroskopom; A – Na dan začetka poskusa, 26.4.2005, so se delitve v kambiju že začele; B – Datum odvzema vzorca 17.5.2005. Prve nastale traheide ranega lesa so bile popolnoma oblikovane; C – Datum odvzema vzorca 7.6.2005. Nastajanje celic ranega lesa.; D – Datum odvzema vzorca 28.6.2005. Nastajanje celic prehodnega lesa. F – floemske celice, KC – kambijeve celice, PR – ksilemske celice v postkambijski rasti, SL – ksilemske celice v fazi odlaganja sekundarne celične stene in lignifikacije, MT – zrele traheide; Daljica = 100 μ m. 137
- Slika 94: A – Datum odvzema vzorca 19.7.2005. Nastajanje celic prehodnega in kasnega lesa; B – Datum odvzema vzorca 9.8.2005. Kambijeva aktivnost se počasi zaključuje, nastajajo celice kasnega lesa; C – Datum odvzema vzorca 30.8.2005. Delitve v kambiju so se ustavile. Terminalne traheide v procesu odlaganja sekundarne celične stene in lignifikacije; D – Datum odvzema vzorca 20.9.2005. Terminalne traheide še niso popolnoma oblikovane; E – Datum odvzema vzorca 11.10.2005. Razvoj ksilemske branike 2005 je zaključen. F – floemske celice, KC – kambijeve celice, PR – ksilemske celice v postkambijski rasti, SL – ksilemske celice v fazi odlaganja sekundarne celične stene in lignifikacije, MT – zrele traheide; Daljica = 100 μ m. 138
- Slika 95: Odziv kambija navadne smreke na nadzorovano hlajenje viden na prečnih prerezi tkiv pod svetlobnim mikroskopom; A – Na dan začetka poskusa, 26.4.2005, so se delitve v kambiju že začele; B – Datum odvzema vzorca 17.5.2005. V postkambijski rasti 4 do 5 slojev ksilemskih celic; C – Datum odvzema vzorca 7.6.2005. Ksilemske celice v procesu sinteze sekundarne stene; D – Datum odvzema vzorca 28.6.2005. Delitve v kambiju so se upočasnile. Zrelih traheid še ni bilo zaslediti; E – Datum odvzema vzorca 19.7.2005. Prve popolnoma oblikovane ksilemske celice; F – floemske celice, KC – kambijeve celice, PR – ksilemske celice v postkambijski rasti, SL – ksilemske celice v fazi odlaganja sekundarne celične stene in lignifikacije, MT – zrele traheide. Daljica = 100 μ m. 140
- Slika 96: A – Datum odvzema vzorca 9.8.2005. Kambijeva aktivnost se je zaključila; B – Datum odvzema vzorca 30.8.2005. Terminalne traheide v zaključnih fazah diferenciacije; C, D – Datum odvzema vzorca 20.9.2005 oziroma 11.10.2005. Popolnoma oblikovana ozka ksilemska branika 2005. F – floemske celice, KC – kambijeve celice, PR – ksilemske celice v postkambijski rasti, SL – ksilemske celice v fazi odlaganja sekundarne celične stene in lignifikacije; MT – zrele traheide. Daljica = 100 μ m. 141
- Slika 97: Nastanek ksilemske branike 2005 pri kontrolnem drevesu; A – Na dan začetka poskusa, 26.4.2005, so se delitve v kambiju že začele; B – Datum

odvzema vzorca 17.5.2005. Traheide ranega lesa v postkambijski rasti; C – Datum odvzema vzorca 7.6.2005. Prve popolnoma oblikovane ksilemske celice; D – Datum odvzema vzorca 28.6.2005. Delitve v kambiju so se upočasile. F – floemske celice, KC – kambijeve celice, PR – ksilemske celice v postkambijski rasti, SL – ksilemske celice v fazi odlaganja sekundarne celične stene in lignifikacije, MT – zrele traheide; Daljica = 100 µm.....	143
Slika 98: A – Datum odvzema vzorca 19.7.2005. Nastajanje celic prehodnega lesa; B – Datum odvzema vzorca 9.8.2005. Kambijeva aktivnost se je zaključila; C – Datum odvzema vzorca 30.8.2005. Delitve v kambiju so se ustavile. Terminalne traheide v procesu odlaganja sekundarne stene in lignifikacije; D – Datum odvzema vzorca 20.9.2005. Terminalne traheide še niso popolnoma oblikovane; E – Datum odvzema vzorca 11.10.2005. Razvoj ksilemske branike 2005 je zaključen. F – floemske celice, KC – kambijeve celice, PR – ksilemske celice v postkambijski rasti, SL – ksilemske celice v fazi odlaganja sekundarne celične stene in lignifikacije, MT – zrele traheide; Daljica = 100 µm	144

KAZALO PRILOG

- Priloga A: Preglednica povprečnega števila celic ksilemskega prirastka za posamezno drevo na dan vzorčenja z metodo pinning in odvzemom intaktnih vzorcev tkiv na Pokljuki v letu 2003. Smreke št. 1, 2, 3, 4, 5 – pinning, smreke št. 7, 9, 10, 12 – odvzem intaktnih vzorcev
- Priloga B: Preglednica povprečnega števila celic ksilemskega prirastka za posamezno drevo na dan vzorčenja z metodo pinning in odvzemom intaktnih vzorcev tkiv na Sorškem polju v letu 2003. Smreke št. 1, 3, 4, 5 – odvzem intaktnih vzorcev, smreke št. 11, 12, 13, 14, 15 – pinning
- Priloga C: Preglednica povprečnega števila celic ksilemskega prirastka za posamezno drevo na dan vzorčenja z metodo odvzema intaktnih vzorcev tkiv na Ravniku v letu 2003.
- Priloga D: Preglednica povprečnega števila celic v posameznih fazah ksilogeneze za posamezno drevo na dan vzorčenja z metodo odvzema intaktnih tkiv na Pokljuki v letu 2003.
- Priloga E: Preglednica povprečnega števila celic v posameznih fazah ksilogeneze za posamezno drevo na dan vzorčenja z metodo odvzema intaktnih tkiv na Sorškem polju v letu 2003.
- Priloga F: Preglednica povprečnega števila celic v posameznih fazah ksilogeneze za posamezno drevo na dan vzorčenja z metodo odvzema intaktnih tkiv na Ravniku v letu 2003.

1 UVOD

Rast in razvoj dreves nadzorujejo zunanji in notranji dejavniki. Za drevesne vrste zmerne pasu je značilno periodično menjavanje obdobj rasti in mirovanja. Les ali sekundarni ksilem se oblikuje v procesu ksilogeneze, ki se prične s periklinimi delitvami celic vaskularnega (prevodnega) kambija. Sledi proces diferenciacije, kjer se novo nastale osne traheide specializirajo za mehansko in prevajalno vlogo v lesnem tkivu. Širina letnih prirastnih plasti, struktura in lastnosti lesa so odvisne od dinamike in trajanja posameznih faz ksilogeneze (Larson, 1994, Kozlowsky in Pallardy, 1997, Plomion in sod., 2001). Proces nastanka lesa ni vnaprej določen, temveč je plastičen produkt interakcij med genotipom in okoljem (Savidge, 1996, 2000a, b). Okolje določa fizikalne pogoje in energijo za ksilogenezo. Zunanji dejavniki uravnavajo začetek, konec in stopnjo posameznih razvojnih procesov (Wodzicki, 2001). Vpliv določenih klimatskih dejavnikov na mehanizem nastanka ksilemske branike je mogoče proučevati na drevesih, ki rastejo v naravnem okolju ali pa v eksperimentalno nadzorovanih razmerah (Antonova in Stasova, 1997, Oribe in Kubo, 1997, Oribe in sod., 2001, 2003, Deslauriers in sod., 2003a, b, Rossi in sod., 2003, 2006b, Deslauriers in Morin, 2005). O dinamiki in trajanju kambijeve aktivnosti ter nastanku ksilemske branike pri navadni jelki (*Abies alba*) in navadni smreki (*Picea abies*), gospodarsko pomembnima drevesnima vrstama v Sloveniji, ni veliko znanega. Še slabše je raziskan vpliv temperatur in padavin na proces ksilogeneze.

Cilji disertacije so bili:

- proučiti uporabnost metode pining ter metode odvzemanja intaktnih vzorcev za študije nastanka ksilemske branike in ju med seboj primerjati;
- proučiti in primerjati dinamiko in trajanje ksilogeneze pri navadni jelki (*Abies alba*) na Ravniku in navadni smreki (*Picea abies*) na Sorškem polju ter Pokljuki v rastni sezoni 2003;
- pridobiti teoretične modele rasti dreves za posamezna rastišča na različnih nadmorskih višinah;
- ugotoviti zvezo med temperaturo in padavinami ter nastankom ksilemske branike 2003 pri jelki in smreki;
- proučiti odziv dormantnega in aktivnega kambija in celične diferenciacije na eksperimentalno nadzorovano ogrevanje (23-25°C) in ohlajanje (9-11°C) dela debla navadne smreke v letih 2004 in 2005.

Postavili smo naslednje hipoteze:

- proces ksilogeneze pri navadni jelki ter navadni smreki poteka identično;
- trajanje in dinamika ksilogeneze je pri jelki in smreki odvisna od temperature in padavin;
- z vidika ksilogeneze in klimatskih dejavnikov, ki nanjo vplivajo, med navadno jelko in navadno smreko ni razlik;
- eksperimentalno nadzorovano ogrevanje dela debla navadne smreke bo pospešilo in podaljšalo kambijevo delitveno aktivnost;
- eksperimentalno nadzorovano ohlajanje dela debla navadne smreke bo skrajšalo in upočasnilo delitve v kambiju;
- eksperimentalno nadzorovano ogrevanje in ohlajanje dela debla navadne smreke bo vplivalo na porazdelitev in vsebnost lignina v celičnih stenah traheid.

2 PREGLED OBJAV

2.1 BIOLOGIJA NAVADNE SMREKE

Navadna smreka (*Picea abies* Karst.) spada v družino borovk (*Pinaceae*). Je značilna borealno-alpska vrsta, ki ji ugaja hladnejše celinsko podnebje z obilo padavinami, ki ohranjajo sveža tla in vlažno ozračje. V severni Evropi raste predvsem v nižinah in sega skoraj do severa Skandinavije in daleč proti vzhodu v Rusijo, kjer sklenjeno prehaja v areal sibirске smreke (slika 1). V srednji in južni Evropi je gorska vrsta in raste predvsem v Alpah, Karpatih in Dinarskem gorovju, kjer uspeva do 2200 m n.m. Pri nas je montanska oziroma subalpinska vrsta. Naravna rastišča v Sloveniji so le v gorskih predelih (npr. v Alpah, Kravankah in na Pohorju), v zelo hladnih dolinah nižjih leg in v visokokraških mraziščih (npr. v Trnovskem gozdu, okrog Snežnika in na Kočevskem), kjer še najdemo precej strnjene avtohtone populacije. V Alpah tvori slabo izražen vegetacijski pas (*Piceetum subalpinum*), kjer je spodaj primešana jelka, pa tudi bukev, v višjih predelih pa macesen. V Dinarskem gorstvu zaradi vpliva toplega sredozemskega podnebja višinski smrekov pas ni razvit, smreka se pojavlja v mraziščnih dolinah in vrtačah, kjer se zadržuje hladen in vlažen zrak. Kratka vegetacijska doba mrazišč oziroma spomladanske in jesenske zmrzali otežkočajo pomlajevanje in rast v mladosti, hkrati pa povsem onemogočajo konkurenčni vrsti bukev in jelko. V preteklosti sajena in pospeševana smreka danes raste po vsej Sloveniji, izjema so le močvirna rastišča v panonskem svetu, obrečne nižine in suhi predeli sredozemskega sveta. Širni smrekovi gozdovi na Pokljuki, Jelovici in Pohorju so se razvili pod gospodarskim vplivom v zadnjih nekaj stoletjih in so antropogenega nastanka (Mlakar, 1985, Brus, 2004).

Smreka ima najraje sveža in zračna tla na vseh podlagah. Tla so lahko plitva ali globoka. Je med tistimi drevesnimi vrstami, ki prenese tudi kisla tla. Potrebe po svetlobi so odvisne od nadmorske višine in kvalitete tal. V nižjih in toplejših legah, na dobrih tleh, je sencozadržna, medtem ko je v višjih legah polsvetloljubna vrsta. Potrebuje visoko zračno vlago in skozi vse leto enakomerno porazdeljene padavine. Ustrezajo ji hladnejša poletja, slabo pa prenaša sušo in vročino ter onesnažen zrak. V nižinah je občutljiva na spomladanske pozebe. Smreka precej vpliva na mikroklimo svojega rastišča. Z gosto krošnjo preprečuje dostop svetlobi in toploti do tal. Ravno tako zadržuje velik del padavinske vode, tako da so tla pogosto precej suha. Vse skupaj ovira razkroj drevesnega odpada, zaradi česar se razvije surovi humus. Na takih tleh je otežkočeno pomlajevanje, zlasti drugih drevesnih vrst. V visokogorskem svetu je smreka marsikje graditeljica varovalnih gozdov na strmih rastiščih na območju gozdne meje, na nekaterih rastiščih je pionirska vrsta. V nižjih predelih včasih raste v ekološko nestabilnih monokulturah (Mlakar, 1985, Brus, 2004).

Smreka je do 50 m visoko in do preko 1 m debelo zimzeleno drevo. Krošnja je stožčasta. Veje izraščajo v izrazitih vejnih vencih. V zgornjem delu krošnje so veje ukrivljene navzgor, v spodnjem delu pa navzdol. Deblo je gladko in polnolesno, skorja je sprva tanka, rdečkasto rjava, pozneje pa začne odstopati v obliki okroglastih ploščic. Že zgodaj razpoka in se lušči v obliki okroglih ali poligonalnih lusk. Koreninski sistem je plitek, le do 30 cm globok, pokriva pa veliko površino. Iglice so v prečnem prerezu rombaste in so na poganjku razmeščene spiralno. Iz vejice izraščajo na značilnih nastavkih in na drevesu ostanejo 5-7 let. V zgornjem, osvetljenem delu krošnje so ščetkasto razporejene okrog vejice, v zasenčenih delih so iglice razčesane. Storži se med zorenjem povesijo, dozoriijo

oktobra, odpirati se začnejo februarja naslednje leto in odpadejo poleti (Mlakar, 1985, Brus, 2004).



Slika 1: Naravna razširjenost smreke v Evropi (Brus, 2004).

2.2 BIOLOGIJA NAVADNE JELKE

Navadna jelka (*Abies alba* Mill.) spada v družino borovk (*Pinaceae*). V Evropi raste v Alpah, Vogezih in Juri, na Balkanskem polotoku in v Karpatih (slika 2). Manjša območja razširjenosti so še na Apeninskem polotoku, Korziki, v Centralnem masivu in v Pirenejih. Najpogostejše raste v med 800 in 1500 m n.m. (Mlakar, 1985, Brus, 2004). Večinoma v mejah naravne razširjenosti samoniklo raste po vsej Sloveniji, največ v dinarskem in predalpskem svetu. Značilna je za visokogorski kras dinarskega sveta, pogosta je na Pohorju. Je gorska drevesna vrsta, v Sloveniji raste v pasu med 800 in 1200 m n.m., včasih se spusti do 300 m n.m. Največkrat raste v mešanih gozdovih z bukvijo, s katero tvori gospodarsko eno najpomembnejših gozdnih združb *Omphalodo-Fagetum* (sin. *Abieti-Fagetum din.*) v Sloveniji. Lahko se pojavi tudi v sestojih s smreko ali rdečim borom. Čisti jelovi gozdovi so redkejši in večinoma posledica močnega pospeševanja v preteklosti. Jelka je ob bukvi naravno najbolj razširjena drevesna vrsta dinarskega kraškega sveta v Sloveniji in pomembna graditeljica mnogih gozdnih združb (Mlakar, 1985, Brus, 2004).

Jelka uspeva na svežih, globokih, humoznih, s hranilnimi snovmi bogatih tleh na karbonatni in nekarbonatni matični podlagi. Potrebuje dovolj zračne vlage in je občutljiva na spomladansko pozebo in poletno sušo. Precej je odporna proti vetru. V mladosti je zelo sencovzdržna in tako lahko preživi več kot 200 let, kasneje pa za rast potrebuje več svetlobe. Ustrezajo ji hladnejša poletja, zimski mraz pa slabše prenaša kot smreka (Mlakar, 1985, Brus, 2004).

Jelka je 40-60 m visoko in do 2 m debelo zimzeleno drevo. Krošnja je v mladosti stožčasta, pri starejših drevesih pa postane valjasta ali jajčasta. Veje izraščajo vodoravno iz debla, v zgornjem delu krošnje so nekoliko obrnjene navzgor, v spodnjem delu pa nekoliko navzdol. Jelka raste v mladosti praviloma zelo počasi, zlasti v senci starejših dreves ali na večjih nadmorskih višinah. Do hitreje rasti pride nekako po 15 letih in se približno po 200 letih zopet upočasni, tako da vrh zaostaja v rasti za stranskimi vejami. Zato imajo stare

jelke pogosto značilen gnezdast ali potlačen vrh, t.i. štorkljino gnezdo. Deblo je ravno in polnolesno, skorja je v mladosti tanka, gladka in siva s smolnimi mešički. V starosti razpoka v okrogle luske. Koreninski sistem je srednje globok, ob nekaj stranskih je pogosto močno razvita tudi glavna korenina. Iglice so ploščate, v zgornjem delu krošnje zašiljene, v spodnjem delu na vrhu izrezane in na spodnjih zasenčenih vejah razporejene v dveh redih. Na zgornji strani so temno zelene in bleščeče, spodaj imajo dve značilni beli prog. Če je drevo zdravo, ostanejo na drevesu 8-12 let, sicer manj. Zreli in debeli storži, pri katerih krovne luske z zašiljeno konico gledajo izpod plodnih lusk, razpadejo na drevesu (Mlakar, 1985, Brus, 2004).



Slika 2: Razširjenost naravne jelke v Evropi (Brus, 2004).

2.3 PROPADANJE JELKE IN SMREKE

Propadanje jelke (*Abies alba*) in smreke (*Picea abies*) so v preteklih desetletjih zabeležili v nekaterih evropskih državah. Številne raziskave so poskušale pojasniti vzroke tega pojava (Bauch, 1986, Fengel in Schutz, 1986, Fink, 1986, Frühwald, 1986, Požgaj in Kurjatko, 1986, Schweingruber, 1986, Shortle in Bauch, 1986, Torelli in sod., 1986, Dobbartin, 2005). Propadanje jelke se v Evropi periodično ponavlja že od leta 1500. Pojav je prisoten tudi v Sloveniji, kjer so sestoji največkrat pripadali dinarskemu jelovemu bukovju (Torelli in sod., 1986, Levanič, 1996, 1997, Torelli in sod., 1996, 1999). V letu 2002 je bilo v Sloveniji do 30,5% celotnega poseka sanitarne narave pri treh najpomembnejših iglavcih; navadni smreki (*Picea abies*), navadni jelki (*Abies alba*) in rdečemu boru (*Pinus sylvestris*) (Boncina in sod., 2003). Vzroki za propadanje jelke in smreke niso v celoti pojasnjeni, zagotovo pa so rezultat vzajemnega delovanja neugodnih klimatskih dejavnikov (suše, zmrzali), onesnaževanja okolja, zakisovanja tal, pomanjkanja mineralnih snovi, konkurence dreves v sestoji, neustreznega gospodarjenja z gozdovi, obžiranja jelovega mladja, napada insektov, patogenih organizmov ipd. (Levanič, 1996, Wimmer, 2002, Bigler in sod., 2004). Ena izmed možnih predispozicij za umrljivost naj bi bila tudi nezadostna genetska variabilnost ter nizka sposobnost prilagodljivosti navadne jelke, ki raste v osrednji in zahodni Evropi (Bigler in sod., 2004).

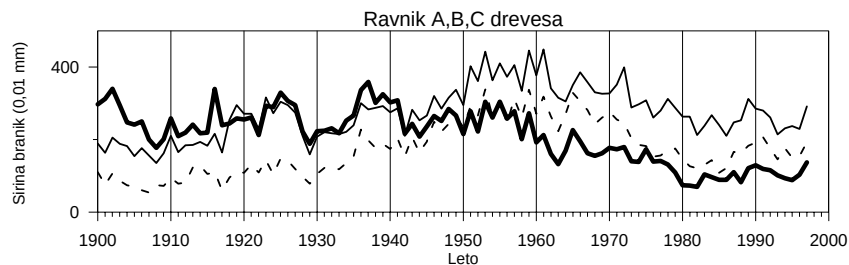
Eden najpomembnejših kazalnikov stanja gozdnih sestojev je vitalnost dreves. Vitalnosti drevesa ni mogoče neposredno izmeriti, pač pa jo je mogoče določiti na podlagi ocene

stanja krošnje, rasti (debelinske ali višinske) drevesa, meritve električne upornosti kambijevega območja, meritev velikosti in oblike iglic idr. (Dobbertin, 2005). Shigo (1990, cit. po Dobbertin, 2005) razlikuje med rastnostjo in vitalnostjo drevesa. Rastnost je genetskega izvora in se je ne da spremeniti. Predstavlja potencialno zmožnost odpora proti negativnim dejavnikom. Vitalnost je sposobnost dreves, da rastejo v danem okolju. Lahko se spreminja. Odpornost dreves na stresne dejavnike okolja je pomemben kriterij za ovrednotenje vitalnosti. Optimalne vitalnosti za posamezno drevesno vrsto ni mogoče definirati, lahko se določi le minimalna vitalnost drevesa, ki predstavlja smrt drevesa (Dobbertin, 2005). Ožji ksilemski prirastek, kot eden izmed prvih znakov zmanjšanja vitalnosti drevesa, kaže na uporabnost ksilemskih branik za rekonstrukcijo rastne zgodovine posameznega drevesa ter za presojo tveganja umrljivosti (Bigler in sod., 2004). Za dokaj zanesljivo oceno vitalnosti posameznega drevesa ter napovedi umrljivosti sta Bigler in Bugmann (2004) razvila posebne logistične modele, ki zajemajo stopnjo rasti, rastno tendenco in relativno rast drevesa kot neodvisne spremenljivke, ki naj bi nakazale neizbežno smrt drevesa. Te modele sta avtorja uspešno uporabila na različno vitalnih drevesih navadne smreke, rdečega bora in navadne jelke. Tovrstne študije bi lahko bile v pomoč pri gospodarjenju z gozdom, saj bi se lahko ocenjevalo in nadzorovalo tveganje umrljivosti dreves v gozdnih sestojih (Bigler in sod., 2004).

Najočitnejša znaka prizadetosti drevesa sta propadanje krošnje, izguba in rumenenje iglic ter zmanjševanje širin ksilemskih branik, kot posledica ožjega kambija in krajše kambijeve aktivnosti (Fink, 1986, Oven, 1993, Križaj, 1997). Zmanjšana aktivnost kambija in ožje ksilemske branike so se pri prizadetih jelkah pojavili bistveno prej, preden so simptomi propadanja postali očitni tudi na krošnjah (Torelli in sod., 1986). Pri prizadetih drevesih se zaradi nezadostne oskrbe kambija s hranilnimi ter drugimi ravnimi snovmi zmanjša ksilemski prirastek (Križaj, 1997), s tem pa se zmanjša tudi razmerje med številom nastalih ksilemskih in floemskih celic v prirastni plasti (Oven, 1993, Oven in sod., 1995). Pri smreki zmanjšan prirastek dostikrat ni sovpadal s stanjem krošnje (Bauch, 1986, Schweingruber, 1986). Fink (1986) je opravil histološke in histokemijske študije na vzorcih lesa, kambija in skorje pri navidezno zdravih in prizadetih navadnih jelkah (*Abies alba*) ter navadne smreke (*Picea abies*), ki so bili odvzeti na prizadetih območjih. V splošnem so imela prizadeta drevesa manjši letni prirastek v ksilemu ter ožji kambij (Fink, 1986, Oven, 1993), pri čemer so bile razlike med zdravimi in poškodovanimi jelkami veliko bolj izrazite kot pri navadni smreki (Fink, 1986). Na ksilemski prirastek pri jelki ugodno vplivajo mile in s padavinami bogate zime ter nekoliko hladnejša poletja z nadpovprečnimi količinami padavin. Hladne pomladi zavirajo kambijevo aktivnost ter zmanjšujejo debelinski prirastek. Na intenzivno sečnjo so se drevesa odzvala z zmanjšanjem ksilemskega prirastka (Levanič, 1996). V splošnem se pri iglavcih z zoževanjem ksilemskih branik povečuje delež kasnega lesa. Te zveze pri prizadetih jelkah in smrekah ni bilo mogoče vedno potrditi. Torelli in sodelavci (1986) so ugotovili, da sta delež kasnega lesa ter dolžina traheid pri poškodovanih jelkah ostala nespremenjena. Podobno so ugotovili tudi pri smreki (Eckstein in sod., 1981). Nasprotno so Eckstein in sodelavci (1981) zabeležili povečan delež kasnega lesa pri jelki, Liese in sodelavci (1975) pa pri smreki. Bosshard in sodelavci (1986, cit. po Bauch, 1986) pa so zasledili manjši delež kasnega lesa v ozkih branikah prizadetih jelk. Radialne dimenzije traheid ranega lesa prizadetih smrek naj bi bile zmanjšane, ravno tako debeline celičnih sten kasnega lesa (Bauch, 1986). Pri prizadetih in zdravih smrekah ni bilo nobenih razlik v vsebnosti

celuloze, hemiceluloz ali lignina. Pri prizadetih jelkah in smrekah je bila razporeditev in vsebnost lignina po celični steni enaka kot pri zdravih drevesih (Bauch, 1986, Fengel in Schutz, 1986, Fink, 1986, Gričar, 2001, Schmitt in sod., 2003).

Jelka je občutljiva drevesna vrsta in se zelo hitro odzove na poslabšanje rastnih razmer, zato se v stresnih situacijah pojavljajo neskljene ranke ali pride celo do popolnega izostanka prirastka. Pojav izpadlih ranik je močno povezan s stanjem drevesa in je indikator njegovega propadanja (Čufar, 1990, Levanič, 1996). Drevesa, v katerih so beležili več let zapored manjkajoče in neskljene ranke, dolgoročno niso preživela. Na Katedri za tehnologijo lesa je bila opravljenih vrsta raziskav o stanju jelovih gozdov na več območjih enotah Zavoda za gozdove Slovenije: v Kočevju, Ljubljani, Mariboru in Postojni (Čufar, 1997). Pojav propadanja jelke so med drugim podrobneje raziskali tudi na poskusni ploskvi Ravnik pri Planini, ki pripada dinarskemu jelovemu bukovju. Raziskave so vključevale spremljanje stanja jelke s pomočjo merjenja električne upornosti, anatomske in fiziološke interpretacije meritev električne upornosti, upadanje rasti in ksilemskega prirastka, študij fenologije, reproduktivne rasti, pojava sekundarne krošnje, ugotavljanje vlažnosti in kvalitete lesa, števila sluznih celic v skorji in travmatskih smolnih kanalov v lesu ter odziv lesa in skorje na poškodovanja (Čufar, 1997). Na osnovi vizualne ocene krošnje (leta 1988, spremenjeno po Bosshardu) in merjenja električne upornosti kambija (leta 1989), ki je v negativni zvezi s prirastkom, so preiskovane jelke razvrstili v štiri vitalnostne oziroma zdravstvene razrede A, B1, B2 in C (Torelli in sod., 1999). V A razred so spadala navidezno vitalna drevesa z zdravo krošnjo, nizko električno upornostjo, produktivnim kambijem ter dobrim ksilemskim prirastkom. V C razredu so bila manj vitalna drevesa s prizadeto krošnjo, visoko električno upornostjo, slabše produktivnim kambijem in slabim ksilemskim prirastkom. Vmesni razred B se je naprej delil na podrazreda B1 in B2, pri čemer so bila v B1 drevesa z zdravo krošnjo, visoko električno upornostjo ter slabim ksilemskim prirastkom, v B2 pa drevesa s prizadeto krošnjo, nizko električno upornostjo in dobrim ksilemskim prirastkom. V splošnem so v razredu B prevladovala drevesa tipa B2 (Torelli in sod., 1999). Graf zaporedja daljše serije širin ksilemskih ranik jelk iz razredov A, B2 (=B) in C na Ravniku kaže na postopno upadanje ksilemskega prirastka pri vseh treh razredih od leta 1955 naprej, z najmanjšim prirastkom okrog leta 1976 ter postopnim izboljšanjem po letu 1989 (slika 3). Za obdobje med leti 1961 in 1976 je bila značilna visoka umrljivost dreves, ki jo je delno mogoče pojasniti z neugodnimi klimatskimi razmerami in onesnaževanjem okolja (Levanič, 1996, 1997). Izboljšanje po letu 1989 je bilo najbolj izrazito pri A drevesih, kjer je prirastek dosegel raven izpred leta 1955. Povprečna širina ranike je leta 1989 znašala 3,3 mm. Tudi pri preživelih drevesih skupine C so v splošnem beležili izboljšanje prirastka glede na prejšnja leta, a ta na bazi drevesa običajno ni presegal 0,7 mm in je bil znatno manjši v primerjavi s prirastkom pred letom 1955. Pri močno prizadetih drevesih iz skupine C je bilo opaziti številne manjkajoče ali neskljene ranke (Torelli in sod., 1999). V letu 1988 je bilo na Ravniku zdravih 47% dreves, v letu 1994 je delež zdravih dreves padel na 35% in do tega leta je na Ravniku odmrlo kar 17% dreves (Torelli in sod., 1996). Raziskave kažejo, da se bo propadanje jelke nadaljevalo tudi v prihodnje, s čimer se bo njen delež v slovenskih gozdovih zmanjševal (Boncina in sod., 2002, 2003).



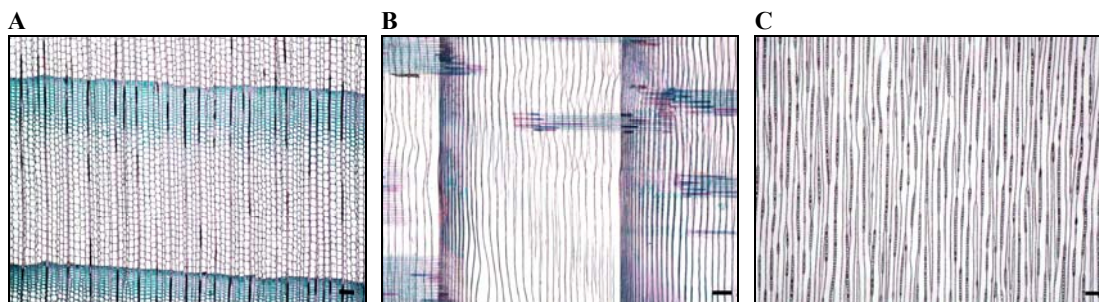
Slika 3: Zaporedja širin branik navadnih jelk z Ravnika, vzorčenje 1997. Razred A (tanka črta), B (=B2, črtkana črta) in C (debela črta) (arhiv Katedre za tehnologijo lesa).

2.4 MIKROSKOPSKA ZGRADBA LESA JELKE IN SMREKE

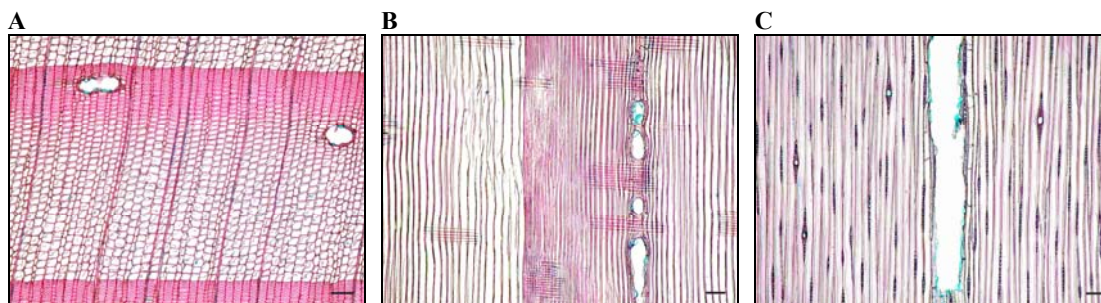
Anatomska zgradba lesa iglavcev je enostavnejša od strukture lesa listavcev. Pri golosemenkah več kot 90% lesnega tkiva predstavljajo aksialne traheide. Traheida je mrtva neperforirana lesna celica, ki jo s kongeneričnimi elementi povezujejo obokane piknje (Torelli, 1990). Traheide so urejene v radialnih nizih z bolj ali manj enakimi tangencialnimi dimenzijami. Na začetku rastne sezone nastanejo traheide ranega lesa z velikimi lumni, na koncu vegetacijske periode pa traheide kasnega lesa z majhnimi lumni. Radialni premer traheid od ranega proti kasnemu lesu pada, medtem ko debelina celičnih sten narašča. Traheide ranega lesa so zaradi velikih lumnov pomembne za prevajanje vode, traheide kasnega lesa z debelimi stenami zagotavljajo trdnost lesa (Fengel in Wegener, 1989). Komunikacija med dvema sosednjima traheidama poteka skozi pare pikenj. Piknja je udrtna v sekundarni celični steni skupaj z membrano, ki jo zapira navzven (Torelli, 1990). Obokane piknje med osnimi traheidami so pri smreki in jelki razporejene večinoma v enojnih nizih (Grosser, 1977). Aksialni parenhim je pri iglavcih zelo redek ali manjka. Pri jelki ga je lahko nekaj ob letnici (Grosser, 1977). Parenhimske celice so žive celice, ko so del beljave, nato se citoplazma v njih razkroji (Panshin in de Zeeuw, 1980). Namenjene so predvsem skladiščenju in razporejanju ogljikovih hidratov. Za smreko so značilni normalni smolni kanali (Grosser, 1977, Wagenführ, 1996). Smolni kanal je cevast intercelularni prostor, ki je nastal z razmaknitvijo nezrelih aksialnih elementov v procesu diferenciacije. Ta prostor obdajajo epitelne celice, ki v beljavi vsebuje smolo (Torelli, 1990). Normalni smolni kanali so večinoma prisotni v kasnem lesu. So relativno redki in so značilni za rod *Picea*. Epitelne celice skupaj z aksialnim parenhimom zavzemajo le do 5% lesnega volumna (Wagenführ, 1996). Aksialni in radialni smolni kanali skupaj tvorijo omrežje. Epitelne celice so pri smreki debelostene, lignificirane in močno piknjave. Pri navadni jelki in navadni smreki se lahko pojavijo tudi travmatski smolni kanali, ki nastanejo kot odziv kambija na mehanske poškodbe (Torelli in sod., 1990). Radialno potekajoč agregat celic v ksilemu in floemu imenujemo trak. Trakovi iglavcev so večinoma enoredni, večredni so le vretenasti oziroma fuziformni trakovi, ki vsebujejo radialni smolni kanal. Homocelularni trakovi so zgrajeni le iz parenhimskih celic, heterocelularni pa poleg parenhimskih celic vsebujejo tudi trakovne traheide (Torelli, 1990). V preglednici 1 so prikazane glavne strukturne značilnosti navadne jelke in navadne smreke (slika 4 in 5).

Preglednica 1: Strukturne značilnosti navadne jelke in navadne smreke (Grosser, 1977, Schweingruber, 1990, Fengel in Wegener, 1989).

	navadna jelka (<i>Abies alba</i>)	navadna smreka (<i>Picea abies</i>)
gostota [g/cm ³]	0,32...0,41...0,71	0,30...0,43...0,64
dolžina traheid [μm]	3400...4300...4600	1700...2900...3700
premer traheid [μm]	25...50...65	20...30...40
dvojna debelina celičnih sten (2W)	2,2...3,7...5,1	1,9...3,5...4,9
rani les [μm]	6,6...9,0...12,3	9,3...10,7...11,6
kasni les [μm]		
premer lumnov (L)		
rani les [μm]	21,1...34,6...52,4	16,0...32,0...45,0
kasni les [μm]	6,8...16,2...24,6	6,4...17,4...22,0
delež celičnih sten (2W:L)		
rani les	0,11	0,11
kasni les	0,56	0,61
delež traheid [%]	88,0...90,4...91,6	94,5...95,3...96,5
aksialni parenhim	marginalen (inicialen), pičel	manjka ali pičel
delež aks. parenhima [%]	neznaten	0,0 1,4 5,8 (skupaj z epitelnimi celicami)
tip trakov	homocelularni, enoredni, robne celice včasih vsebujejo romboidne kristale	heterocelularni (1-2 vrsti marginalnih trakovnih traheid), večinoma enoredni, tudi večredni
višina trakov [μm]	90...200...430	100...150...190
širina trakov [μm]	12...16...19	8...14
delež trakov [%]	8,4...9,6...12,0	4,4...4,7...5,5
delež trakovnih traheid [%]	/	2,6
tip pikenj v križnih poljih	taksodiodne (1...2...4), v kasnem lesu piceoidne	piceoidne (1...4...7)
prehod rani les/kasni les	postopen	postopen
smolni kanali	travmatski	normalni, travmatski
premer smolnih kanalov [μm]	/	30...150
delež smolnih kanalov [%]	/	0,4
tip epitelnih celic	/	debelostene



Slika 4: Anatomska zgradba lesa jelke. A – prečni; B – radialni; C tangencialni prerez. Daljica = 100 μm



Slika 5: Anatomska zgradba lesa smreke. A – prečni; B – radialni; C tangencialni prerez. Daljica = 100 μm

2.4.1 Makroskopski opis jelovine in smrekovine

Jelovina je rumeno bele do bele barve, pogosto s sivkastim ali modrikastim tonom (leskom) in nima leska. Jedrovina je neobarvana, vendar zaradi pogoste prisotnosti mokrega srca lahko pride do rahlega obarvanja. Branike so razločne. Svetel rani les postopoma prehaja v rdečkasto rumen kasni les. Normalnih smolnih kanalov ni. Sveže mokro srce ima neprijeten kiselkast vonj. Les je mehak in srednje gostote (ρ_0 320...410...710 kg/m^3) (Čufar, 2001).

Smrekovina je navadno rumenkasto bele do rumenkasto rjave barve, branike so razločne. Prehod iz svetlejšega ranega v rdečkasto rumeni kasni les je večinoma postopen. Jedrovina je neobarvana. Poskoblane površine imajo svilnat lesk. Prisotni so normalni smolni kanali, pretežno posamezni, vidni s pomočjo lupe, zato svež les diši po smoli. Pogost je pojav smolnih žepov. Les je mehak in srednje gostote (ρ_0 300...430...640 kg/m^3) (Čufar, 2001).

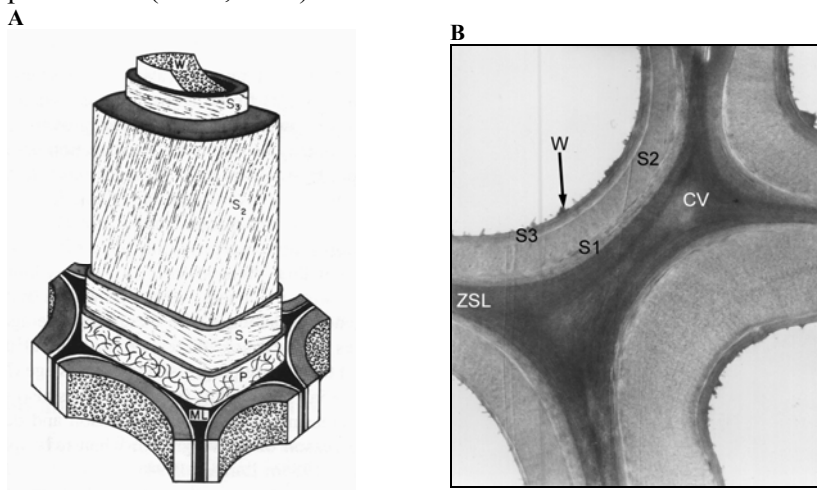
2.5 TOPOGRAFIJA CELIČNE STENE TRAHEID IGLAVCEV

Zgradba celične stene je tesno povezana s kemijsko sestavo. Olesenela celična stena nastane z biosintezo različnih polimerov, pektinskih substanc, hemiceluloz, celuloze in nazadnje še lignina. Poleg glavnih komponent so v celični steni prisotni še razni ekstraktivi, ki se razlikujejo glede na vrsto lesa (Terashima, 2000). Skeletni del tvori predvsem celuloza, ki predstavlja slabo polovico lesne mase. Hemiceluloze in lignin zavzemajo po četrtino lesne mase (Fengel in Wegener, 1989). Lastnosti lesa so odvisne tudi od tridimenzionalne razporeditve posameznih komponent v celični steni (Terashima, 2000).

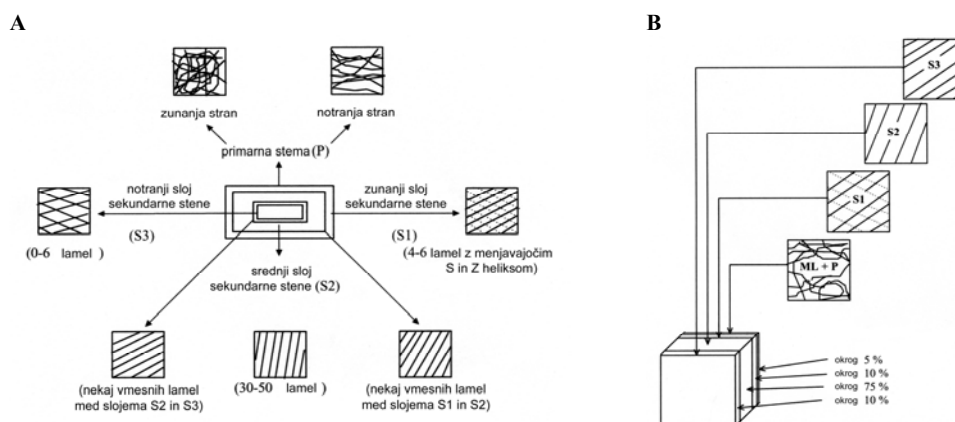
Celična stena ksilemskih elementov je visoko strukturirana (slika 6). Sestavljena je iz številnih lamelarnih slojev, ki nastanejo v različnih obdobjih celične diferenciacije (Harada, 1965, Wardrop, 1965, Panshin in de Zeeuw, 1980, Fengel in Wegener, 1989, Fujita in Harada, 1991, Dinwoodie, 2000, Plomion in sod., 2001). Prvi sloj, ki se oblikuje po delitvi celice, je srednja oziroma osrednja lamela, ki se nahaja med dvema lesnima celicama in ju med seboj povezuje. Srednja lamela je zelo tanka (0,5 do 1,5 μm) in vsebuje v glavnem pektinske snovi in pentozone, ki jih v procesu diferenciacije zamenja lignin (nad 60%). V njej skorajda ni celuloze (Fengel in Wegener, 1989). Tanka in elastična primarna celična stena (okoli 0,1 μm debeline) predstavlja le približno 2% prostornine celotne celične stene, zato na lastnosti lesa bistveno ne vpliva (slika 6 in 7). Ker prehod iz

primarne stene v srednjo lamelo ni dobro razločen, se dostikrat uporablja poimenovanje združena srednja lamela, ki zajema srednjo lamelo in primarni steni dveh sosednjih celic. Sestava primarne stene popolnoma oblikovane celice je le nekoliko drugačna od stene kambijeve celice. Celuloza (približno 9%) je vklopljena v amorfno matrico iz hemiceluloz, lignina in pektina ter 70% vode. Primarna stena sestoji iz številnih plasti celuloznih mikrofibril, ki so naključno usmerjene znotraj stene (slika 6 in 7). Usmerjenost mikrofibril je mogoče opazovati z elektronskim mikroskopom (TEM in SEM), delno tudi v polarizirani svetlobi. Na zunanji strani tanke primarne stene so mikrofibrile usmerjene bolj ali manj aksialno, na notranji strani pa prečno (Harada, 1965, Panshin in de Zeeuw, 1980, Fujita in Harada, 1991). Primarna stena je lamelirana z razmeroma velikimi razdaljami med mikrofibrilami. Ko celica doseže končno velikost, se na notranji strani primarne stene sintetizira večslojna in toga sekundarna celična stena, sestavljena iz treh slojev: zunanjega S1, srednjega S2 in notranjega S3, ki se morfološko zelo razlikujejo. Vsi sloji vsebujejo celulozne mikrofibrile, ki so vzporedno usmerjene v določeni smeri in kotu, katera sta značilna za vsak posamezen sloj. Usmerjenost mikrofibril opisujemo kot heliks Z ali S. Tako mikrofibrile potekajo bodisi v smeri srednjega dela črke Z (desnosučnost) ali pa v smeri črke S (levosučnost) (Panshin in de Zeeuw, 1980). Sloji zaradi različne orientacije mikrofibril spominjajo na vezan les. Zunanji sloj S1 je zelo tanek (0,1 do 0,2 μm) in predstavlja v povprečju 16% celotne debeline celične stene. Sestavljen je iz več podslojev, ki se razlikujejo v debelini in orientaciji mikrofibrilnih svežnjev (Panshin in de Zeeuw, 1980). Sloj S1 vsebuje celulozo, večje količine polioz in manjše količine lignina. Mikrofibrile z izmeničnim heliksom S in Z ležijo pod kotom 50° do 70° na aksialno os (položen heliks). Srednji sloj S2 je najdebelejši in določa mehanske lastnosti lesa. Debelina sloja variira med 1 in 10 μm , kar predstavlja 75% do 85% celotne debeline celične stene (slika 7). Med ranim in kasnim lesom so največje razlike ravno v debelini S2 sloja. Glavnino sloja predstavlja celuloza (60%), ki jo obdajajo hemiceluloze in lignin (27%). Mikrofibrile so gosto zbite (kompaktne), pretežno s heliksom Z in majhnim mikrofibrilarnim kotom 5° do 30° glede na aksialno os celice (heliks strm) (Harada, 1965, Fujita in Harada, 1991, Dinwoodie, 2000). Usmerjenost mikrofibril v tem masivnem sloju nakazujejo močno sploščene in podaljšane notrajne odprtine pikenjskih kanalov obokanih pikenj. Fibrilarni kot se v prehodnih lamelah na zunanjih površinah sloja S2 vse bolj približuje kotu lamel v sloju S1 oziroma S3. Prehod je izrazitejši med slojema S2 in S3 (Harada, 1965, Fujita in Harada, 1991). Notranji sloj S3 sekundarne celične stene je najtanjši (0,5-1,1 μm) in predstavlja do 8% celotne celične stene (slika 7). Mikrofibrile s heliksom S so usmerjene pod kotom 60° do 90° glede na glavno os (položen heliks). Sloj je zelo odporen na kemikalije. Vsebuje večje količine glukurono-arabino-ksilana (Tišler, 1986). Koncentracija lignina naj bi v smeri proti lumnu padala, vendar pa so pri nekaterih vrstah (*Abies balsamea*, *Picea abies*, *Picea glauca*, *Picea mariana*, *Picea rubens*, *Pinus radiata*, *Pinus resinosa*, *Pinus taeda*, *Tsuga canadensis*) zabeležili visoko vsebnost lignina v sloju S3 (Donaldson, 1987). Sloj S3 pri nekaterih vrstah leži neposredno ob lumnu in predstavlja mejo med lumnom in ostalimi deli celične stene. Bradavičasti sloj je opazen v traheidah številnih iglavcev, kot npr. jelka, bor (slika 6). Oblikuje se na notranji strani sloja S3 ob lumnu. Po Bairdu in sodelavcih (1974) naj bi bile bradavice v celičnih stenah filogenetski znak. V traheidah iglavcev in celicah primitivnih listavcev naj bi bile bradavice čestokrat vidne, z evolucijo in specializacijo celice pa naj bi sloj začel postopoma izginjati (Liese, 1965, Fengel in Wegener, 1989, Fujita in Harada, 1991). Velikost in porazdelitev bradavic se v sloju spreminjata, prav tako tudi dodatni sloj.

Bradavice so navadno okrogle oblike, velikosti med 0,01-1 μm , s premerom med 0,1-0,25 μm . Lahko so 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. Največkrat so bradavice pokrite z dodatnim slojem, ki ima amorfn ali fibrilarno strukturo. V drugih primerih bradavice niso pokrite, ležijo neposredno na S3 sloju in so dobro vidne. Bradavičasti sloj naj bi bil sestavljen iz dveh membran, med katerima so vključene bradavice (Liese, 1965, Verhoff in Knigge, 1976). Bradavice absorbirajo UV svetlobo, kar naj bi bilo posledica velike vsebnosti lignina oz. ligninu podobnih snovi. Sloj naj bi vseboval visok delež manana in ksilana ter nekaj pektinskih substanc (Liese, 1965, Sachs, 1965, Fengel in Wegener, 1989, Fujita in Harada, 1991). Sistematično klasificiranje drevesnih vrst v družine, rodove in vrste glede na prisotnost ali odsotnost bradavičastega sloja ni mogoče. Z izjemo rodu *Pinus* je pri iglavcih s smolnimi kanali sloj navadno manj izrazit. Pri rodu *Pinus* je sloj dobro razvit pri podrodu *Dyploxylon*, pri podrodu *Haploxylon* pa le redko (Liese, 1965).



Slika 6: Zgradba celične stene iglavca. A – Shematski prikaz (Panshin in de Zeeuw, 1980); B – Večslojna celična stena traheid navadne jelke posneta s transmissijskim elektronskim mikroskopom (orig.). ZLS – zdržena srednja lamela, CV – celični vogal, ML – srednja lamela, P – primarna stena, S1, S2, S3 – sloji sekundarne celične stene, W – bradavičasti sloj



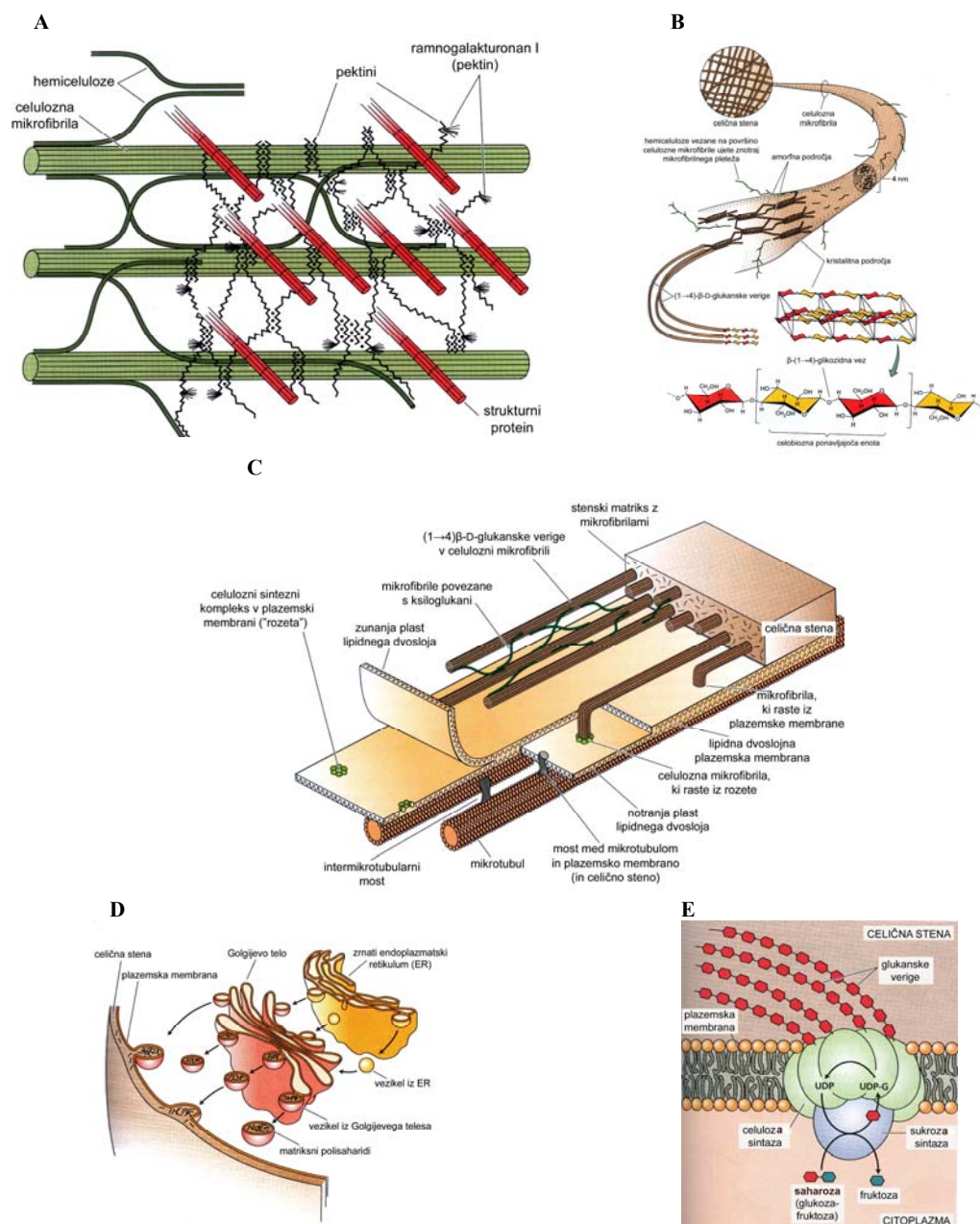
Slika 7: Shema usmerjenosti celuloznih mikrofibril v primarni (P) in sekundarni (S) celični steni traheide (A) ter delež posameznega sloja (B) - (Wardrop, 1965).

2.6 GLAVNE KEMIJSKE KOMPONENTE CELIČNE STENE TRAHEID

2.6.1 Polioze

Polioze sestavljajo celuloza in hemiceluloze. Celuloza predstavlja 40% do 50% lesa. Je homopolisaharid iz β -D-glukopiranoznih enot vezanih z (1 $\rightarrow$ 4)-glikozidno vezjo (Fengel in Wegener, 1989, Okamura, 1991). Vsaka enota je obrnjena za 180° glede na sosednji, tako da se struktura ponovi na vsaki dve enoti (slika 8A). Dimer je celobioza, dve (1 $\rightarrow$ 4) vezani β -D-glukozni enoti. Celulozne molekule so linearne, povezane z močnimi intra- in intermolekularnimi vodikovimi vezmi. Združujejo se v mikrofibrile, v katerih se urejena kristalna območja menjavajo z manj urejenimi amorfnimi. Verige tvorijo plasti, ki so med seboj povezane s šibkimi van der Waalsovimi vezmi. Nativna celuloza ima hkrati verižno in plastno rešetko (Moore in sod., 1998, Torelli, 2000, Taiz in Zeiger, 2002). Celulozne mikrofibrile se sintetizirajo v plazemski membrani v velikih urejenih proteinskih kompleksih – rozetah. Na njih se nahajajo enote celuloze sintaze, ki so vključene v biosintezo celuloze, rastoča celulozna veriga pa se izloča skozi membrano preko por (Torelli, 2000, Plomion in sod., 2001). Najverjetneje imajo kortikalni mikrotubuli (sestavljene pretežno iz α - in β -tubulina) vlogo pri nastajanju celične stene, saj naj bi določali mesta in usmerjenost celuloznih mikrofibril. Mikrotubuli naj bi upravljali gibanje celulozno-sintaznega kompleksa v plazemski membrani (Chaffey, 1999, 2002). Alternativno so bili predlagani tudi številni matematični modeli, ki temeljijo na geometriji celic (Mulder in Emons, 2001).

V vodi netopne celulozne mikrofibrile so povezane s topnimi hemicelulozami, ki predstavljajo približno 25% mase absolutno suhega lesa in predstavljajo zelo heterogeno skupino polisaharidov. Navadno so to heteropolimeri glukomanana, galaktoglukomanana, arabinogalaktana in glukuronoksilana ali pa homopolimeri galaktana, arabinana in β -1,3-glukana (Moore in sod., 1998, Teiz in Zeiger, 2002). Za razliko od celuloze so hemiceluloze veliko manj urejene oz. amorfne, kar je posledica njihove razvejenosti in nelinearne zgradbe. Iz tega razloga se ne združujejo v mikrofibrile, temveč se z vodikovimi vezmi vežejo na celulozne mikrofibrile in jih povežejo v trden pletež (Torelli, 2000, Plomion in sod., 2001). Biosinteza teh polisaharidov poteka v Golgijevem aparatu v dveh korakih: sinteza glavne verige s polisaharidno sintazo in nato dodajanje stranskih verig v reakcijah, ki jih katalizirajo različne glikoziltransferaze (Plomion in sod., 2001). Polisaharidi prehajajo v celično steno z eksocitozo drobnih veziklov (Torelli, 2000).



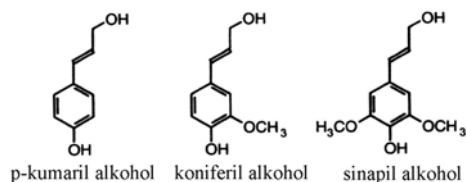
Slika 8 A: Shematski diagram glavni strukturni komponente primarne celične stene ter njihova razporeditev. Celulozne mikrofibrile so obdane s hemicelulozami in povezane v trden pletež. Pektini oblikujejo matriksni gel in najverjetneje vzajemno delujejo s strukturnimi proteini. B: Strukturni model celulozne mikrofibrile. Mikrofibrila vsebuje območje visoke kristaliničnosti pomešane z amorfnimi področji. Hemiceluloze vezane na površino celulozne molekule so lahko ujeta znotraj mikrofibrilnega pleteža. C: Shema sinteze celuloznih mikrofibril v rozetah. Sinteza je najverjetneje vodena z mikrotubuli. D: Model celulozne sinteze v rozeti, ki vsebuje celuloza sintazo. UDP (uridin difosfat)-glukoza dodaja glukozne enote rastoči glukanski verigi. Saharoza sintaza najverjetneje prenaša glukozo iz saharoze do UDP-glukoze. Ali pa je UDP-glukoza pridobljena neposredno iz citoplazme. E: Shematski prikaz sinteze in dovoda matričnih polisaharidov v celično steno. Polisaharidi so encimsko sintetizirajo v Golgijevem aparatu ter nato izločijo v plazemsko membrano z združitvijo membranskih veziklov (Teiz in Zeiger, 2002).

2.6.2 Pektini in proteini

Pektini in proteini predstavljajo majhen delež celične stene (1-8%). Tekom razvoja celične stene so v njej prisotni različni proteini, ki imajo pomembno vlogo pri sestavi in morfologiji celičnih sten ksilemskih elementov (Plomion in sod., 2001). Proteine je mogoče razdeliti v štiri glavne skupine z ozirom na prevladujočo amino kislino: z glicinom bogati proteini, s prolinom bogati proteini, arabinogalaktanski proteini in s hidroksprolinom bogati glikoproteini ali ekstenzini (Moore in sod., 1998, Plomion in sod., 2001, Taiz in Zeiger, 2002). Slednji proteini so zamreženi v celični steni in imajo po vsej verjetnosti strukturno vlogo. Hemiceluloze in proteini zamrežujejo oziroma bočno povezujejo celulozne mikrofibrile (Torelli, 2000). Pektini so najbolj kompleksni stenski polisaharidi. Pomembnejši med njimi so: homogalakturonan, ramnogalakturonan, arabinan, galaktan (Moore in sod., 1998, Taiz in Zeiger, 2002). Pektini naj bi imeli pomembno vlogo pri nadzorovanju razteznosti celične stene. Pektini tvorijo hidrofilne gele, ki se lahko zamrežijo s kalcijevimi ioni (Plomion in sod. 2001).

2.6.3 Lignin

Lignin (lat. lignum »les«) je amorfen polifenolni polimer, ki nastane iz treh hidroksi cinamil alkoholov: koniferil, sinapil ter p-kumaril alkoholov, ki se razlikujejo po številu metoksilnih skupin (slika 9) (Adler, 1977, Freudenberg in Sindhu, 1961, Fengel in Wegener, 1989, Sakakibara 1991, Lin in Dence, 1992, Terashima, 2000). Ti monomeri se sintetizirajo v citoplazmi (Golgijevem aparatu ali endoplazemskem retiklu) in se izločijo v celično steno z vezikli kot monolignoli oziroma monolignolni glukozidi; p-hidroksifenil, gvajacil in siringilpropan (Wardrop, 1965, Terashima, 2000, Donaldson, 2001). Poleg tega so v ligninski polimer vključene tudi druge komponente, npr. hidroksi cinamil aldehidi, hidroksi cinamil acetati, hidroksi cinamil p-hidroksibenzoati, hidroksi cinamil p-kumarati, hidroksi cinamatni estri itd. (Sederoff in sod., 1999, Boudet, 2000, Hatfield in Vermerris, 2001, Raes in sod., 2003). Ker tridimenzionalni ligninski polimer nima pravilno razvrščenih in ponavljajočih se enot, kot je to značilno za druge naravne polimere, npr. celulozo in proteine, je mogoče njegovo kompleksno strukturo predstaviti le z modeli. S funkcijskega stališča daje hidrofobni lignin rastlinam ustrezno mehansko trdnost, zaradi hidrofobnih celičnih sten omogoča transport vode v vaskularnih celicah, preprečuje degradacijo polisaharidov itd. (Ralph in sod., 1998, Boudet, 2000, Önnerud in sod., 2002, Raes in sod., 2003). Lignin se v celično steno vgradi po predhodni vgraditvi polisaharidov (Terashima, 2000). V procesu lignifikacije hidrofobne ligninske molekule zapolnijo prazne prostore v polisaharidnem matriksu, kar vpliva na trdnost, higroskopskost ter druge lastnosti olesenele celične stene (Donaldson, 2001). Les v splošnem vsebuje 20-35% lignina. Vsebnost lignina, njegova monomerna sestava in lastnosti so različne med drevesnimi vrstami, znotraj posameznega drevesa, v različnih tkivih, tipih celic ter različnih slojih celične stene. Juvenilni les v splošnem vsebuje večji delež lignina kot adultni les, rani les večji delež od kasnega lesa in kompresijski les večji delež kot normalen les (Kollman in Côté, 1968, Fengel in Wegener, 1989, Sakakibara, 1991, Lin in Dence, 1992, Lewis, 1999, Terashima, 2000, Torelli, 2000, Donaldson, 1985, 2001, Hatfield in Vermerris, 2001, Rouhi, 2001).

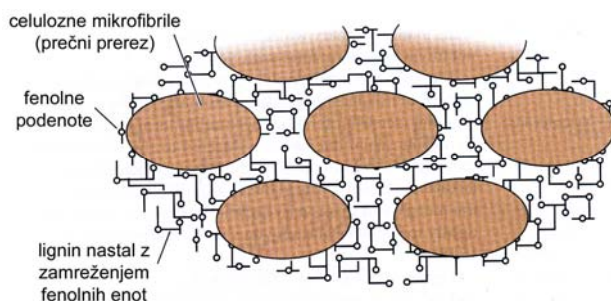


Slika 9: Glavni trije monolignoli v nativnem ligninu (Hatfield in Vermerris, 2001).

Monolignoli se z rastočim oligomerom (polimerom) oksidativno povezujejo preko radikalov in tvorijo različne vezi (slika 1b). V nativnih ligninih so najpogostejše 8-O-4 vezi (50-70%), pri ligninih pridobljenih *in vitro* z mešanjem koniferil alkohola, vodikovega peroksida ter peroksidaze pa 8-8 in 8-5 vezi. Trenutno obstajata dve teoriji oziroma modela, ki skušata razložiti nadzor in združevanje radikalov ter s tem nastanek ligninske makromolekule (Adler, 1977, Westermarck, 1982, Fengel in Wegener, 1989, Guan in sod., 1997, Ralph in sod., 1998, Lewis, 1999, Boudet, 2000, Burlat in sod., 2001, Donaldson, 2001, Hatfield in Vermerris, 2001, Rouhi, 2001). Prvi model, sprejet že v 50 letih prejšnjega stoletja, je model naključnega povezovanja (ang. »random coupling model«). Model predpostavlja nastanek lignina s slučajnostnim povezovanjem fenolnih monomernih radikalov z rastočim ligninskim polimerom. Količina in tip fenolnih monomerov razpoložljivih na mestu lignifikacije ter njihovo radikalsko povezovanje je kemijsko nadzorovano. Radikale tvorijo oksidacijski encimi (peroksidaze, druge oksidaze) (Fengel in Wegener, 1989, Hatfield in Vermerris, 2001, Rouhi, 2001). Drugi model, ki je novejši in se je pojavil ob koncu devetdesetih let prejšnjega stoletja, je model proteinskega usmerjanja (ang. »dirigent protein model«). Predpostavlja, da proces ligninske polimerizacije v celoti vodijo specifični dirigentni proteini z usmerjanjem nastanka posameznih vezi. Glavni zagovorniki te teorije Lewis, Davin in Sarkanen (Gang in sod., 1999, Lewis, 1999, Davin in Lewis, 2000) so prepričani, da narava ne bi prepustila oblikovanja tako pomembne makromolekule, kot je lignin, zgolj naključju in da mora pri nastanku lignina iz monolignolov obstajati podoben biokemijski nadzor, kot je pri lignanih.

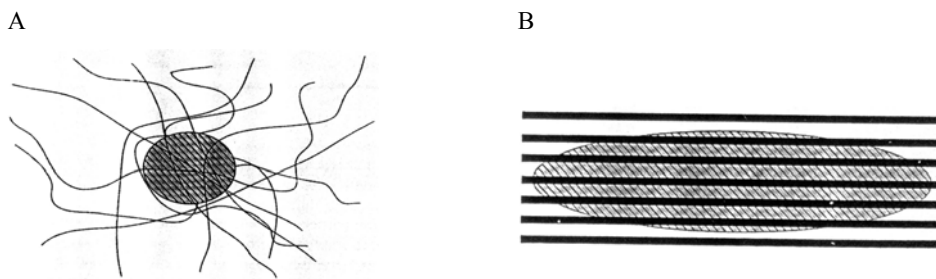
2.6.3.1 Lignifikacija

Lignifikacija oziroma olesenitev celičnih sten je pomembna biokemična ter morfološka sprememba v rastlinski celici med diferenciacijo. Delež lignificiranih celičnih sten v lesu, celični tip, razporeditev, prisotnost jedrovinskih snovi in vlažnost določajo lastnosti lesa. Proces lignifikacije zajema biosintezo monolignolov, njihov transport v celično steno ter polimerizacijo fenil propanskih molekul v končno makromolekulo lignina (Hatfield in Vermerris, 2001). V energijsko zelo potratnem biosinteznem procesu nastane heterogeni ligninski polimer z visokim razmerjem C/H in C/O, kar se odraža v njegovi visoki kalorični vrednosti (Boudet, 2000). Lignin se odloži znotraj ogljiko-hidratnega matriksa celične stene, s čimer zapolni interlamelarne prazne prostore in se istočasto poveže z neceluloznimi polisaharidi (morda tudi s celulozo) s kemijskimi vezmi (Terashima, 2000, Torelli, 2000, Donaldson, 2001, Taiz in Zeiger, 2002). Te vezi so lahko estrskega ali etrskega tipa in morda celo glikozidne vezi (Torelli, 2000).



Slika 10: Shematski prikaz biosinteze lignina v celični steni (Taiz in Zeiger, 2002).

Lignin se brez prisotnosti ogljikovodikov nikoli ne formira (Ruel in sod., 1999, Terashima, 2000). Polisaharidni matriks vpliva na proces lignifikacije (Donaldson, 2001). Biosinteza lignina se prične v številnih diskretnih mestih, ki so bila najbolj oddaljena od plazemske membrane v diferencirajoči se celični steni. Proces lignifikacije se nadaljuje z dodajanjem ligninskih monomerov rastočim ligninskim delcem, dokler se ne združijo (Donaldson, 1994). Odlaganje lignina je v srednji lameli in primarni steni traheid bora *Pinus radiata* potekalo v obliki razvejanega omrežja medsebojno povezanih delcev brez kakršne koli orientacije (Donaldson, 1994). Med dvema celičnima stenama je bilo območje visoke koncentracije lignina, ki bi lahko predstavljalo prvotno celično ploščo. V sloju S1 in S2 sekundarne stene se je lignin odlagal hitreje vzdolž celuloznih mikrofibril kot pa prečno na njih. Ob tem so nastale podaljšane krpe lignina, ki so bile lahko med seboj tudi povezane. Celulozne mikrofibrile mehansko omejujejo odlaganje lignina v prečni smeri (Donaldson, 1994). Aromatski obroči lignina so pogosto usmerjeni v smeri ravnine celične stene, najverjetneje zaradi mehanskega in kemijskega vpliva stenskih polisaharidov (Atalla in Agarwal, 1986).



Slika 11: Shematski prikaz odlaganja lignina v primarni steni in srednji lameli (A) ter v slojih sekundarne celične stene, kjer so celulozne mikrofibrile usmerjene (Donaldson, 1994).

V celično steno se v različnem obsegu vključijo tri različne fenilpropanske enote nastale iz cinamil alkoholov (Fengel in Wegener, 1989). Lignifikacija celične stene poteka postopoma. Prostorsko in časovno gledano se lignifikacija ksilemskih elementov vedno prične v celičnih vogalih in srednji lameli, nato pa v primarni celični steni takoj na začetku oblikovanja zunanjšega S1 sloja sekundarne celične stene. Odložijo se predvsem p-hidroksifenilne enote, ki vsebujejo manjše količine metoksilnih skupin (Whiting, 1981, cit. po Saka in sod., 1982, Terashima in Fukushima, 1988, Terashima in sod., 1988, Ruel in

sod., 1999, Terashima, 2000). Sledi lignifikacija zunanjega S1 sloja sekundarne celične stene, nato se postopoma širi po sekundarni celični steni v centripetalni smeri proti lumnu. Pri iglavcih se tedaj odložijo predvsem gvajacilne enote. Med nastajanjem sekundarne celične stene odlaganje lignina poteka počasneje. Siringilne enote se v zadnji fazi lignifikacije pojavijo v manjših količinah ob lumnu sekundarne celične stene (Terashima in Fukushima, 1988, Terashima, 2000). Največ lignina se odloži po oblikovanju sloja S3 sekundarne celične stene. Ko so celične stene popolnoma lignificirane, celica odmre in citoplazma v lumnih se razkroji (Wardrop, 1965, Kutscha in Schwarzmans, 1975, Saka in Thomas, 1982, Donaldson, 1991, 1992, 2001, Terashima, 2000, Schmitt in Melcher, 2004).

Pri jelki *Abies balsamea* se je lignifikacija celičnih sten traheid pričela v srednji lameli med obokanima piknjama sosednjih traheid (Kutscha in Schwarzmans, 1975). Nato je potekala v začetkih obokanih pikenj in vzdolž zunanje strani primarne stene ter na notranji strani srednje lamele v celičnih vogalih, ki sta bila najbolj oddaljena od kambija. Lignifikacija se je nato razširila okoli celičnega vogala kot tanek obroč. Lignificirati se je začel sloj S1, sledila sta sloja S2 in S3 in nazadnje še bradavičasti sloj. Bradavičasti sloj je bil viden pred zaključkom lignifikacije sloja S3 (Kutscha in Schwarzmans, 1975). Sloja S1 in S3 sekundarne stene sta bila bolj intenzivno obarvana kot sloj S2 zaradi višje koncentracije lignina. Združena srednja lamela ter bradavičasti sloj pa sta bila v splošnem temneje obarvana od slojev S1 ter S3 (Kutscha in Schwarzmans, 1975). Podoben proces so zasledili tudi pri boru *Pinus thunbergii* (Takabe in sod., 1981). Celični vogali neposredno ob trakovih se lahko lignificirajo prej od tistih, ki niso v stiku z njimi (Kutscha in Schwarzmans, 1975, Wardrop, 1965, Donaldson, 2001). Saka in Thomas (1982) sta merila koncentracijo lignina v celičnih stenah zaporednih diferencirajočih se traheid pri boru *Pinus taeda*. Pred oblikovanjem sloja S2 so se pričeli lignificirati celični vogali srednje lamele in nato združena srednja lamela. Pred lignifikacijo sekundarne celične stene je srednja lamela vsebovala približno 50% celotne koncentracije lignina. V sekundarni steni se je začela lignifikacija najprej v sloju S1 in se centripetalno proti lumnu širila v sloj S2. Notranji sloj S3 je bil oblikovan po pričeju lignifikacije sekundarne celične stene. Sloj S3 se lignificira zadnji. Proces lignifikacije sekundarne celične stene je potekal počasneje kot v srednji lameli. V slojih S1 in S3 je bila večja koncentracija lignina kot v sloju S2 (Saka in Thomas, 1982).

Donaldson (1992) je zasledil razlike v stopnji lignifikacije med sosednjimi celicami pri boru *Pinus radiata*, ne glede na obdobje raste sezone. Včasih so bile popolnoma lignificirane celice obdane z nelignificiranimi ali delno lignificiranimi celicami. Pričakovati je, da so starejše celice, ki so bolj oddaljene od kambija, bolj lignificirane, vendar to ni nujno. Študije kažejo, da vsaka celica individualno nadzoruje proces lignifikacije (Donaldson, 1992). Možne so tudi razlike v starosti sosednjih celic, če celične delitve v kambiju potekajo sporadično. Poleg tega se stopnja lignifikacije celične stene razlikuje tudi po dolžini traheide (Donaldson, 1992). Diferenciacija sekundarne stene se najprej začne v osrednjem delu celice, kjer se podaljševanje konča prej kot v celičnih vršičkih (Wardrop, 1965, Torelli, 1998). Ker razvoj celične stene navadno proučujemo s transmisijsko elektronsko mikroskopijo, so preparati zelo tanki in zajamejo različna mesta sosednjih traheid glede na njihovo dolžino, zaradi česar se lahko razlikuje lignificiranost celičnih sten sosednjih traheid (Donaldson, 1992).

Donaldson (1991) je proučeval sezonske spremembe lignifikacije tekom ene rastne sezone pri boru *Pinus radiata*. Proces lignifikacije se glede na čas vzorčenja ni spreminjal, vendar pa je zasledil poleti največje število lignificirajočih se celic. V zgodnji spomladi je bilo malo lignificirajočih se celic. Hitrost lignifikacije sekundarne stene je bila podobna hitrosti lignifikacije srednje lamele (Donaldson, 1991). Vzrok, da je srednja lamela bolj lignificirana od sekundarne stene, je lahko v tem, da poteka proces lignifikacije srednje lamele istočasno v številčno več celicah kot proces lignifikacije sekundarne stene (Donaldson, 1991). Nasprotno sta Saka in Thomas (1982) pri proučevanju vzorcev bora *Pinus taeda* ugotovila, da se sekundarna stena lignificira počasneje kot srednja lamela.

Pri boru *Pinus radiata* so bile celične stene terminalnih traheid na začetku zimskega obdobja nepopolno lignificirane (Donaldson, 1991, 1992). Donaldson (1992, 2001) je zaključil, da je proces lignifikacije zelo občutljiv na zunanje dejavnike, kot je npr. temperatura in dolžina dneva. Lignifikacija teh celic naj bi se zaključila naslednjo pomlad pred začetkom rastne sezone. Avtor tudi ni izključil možnosti, da bi proces potekal upočasnjeno med zimskim obdobjem. Barnett (1971) je pri preučevanju vzorcev bora *Pinus radiata*, ki so bili odvzeti v tedenskih intervalih preko zimskega obdobja ugotovil, da tudi v mirujočem obdobju potekajo celične delitve in diferenciacija, vendar zelo upočasnjeno in samo na strani floema. Vzrok naj bi bil v milih zimah na Novi Zelandiji ter v sami genetski zasnovi bora *Pinus radiata* (Donaldson, 1985, 1992). Podobno sta Murmanis in Sachs (1969) poročala o prisotnosti citoplazme v lumnih v enem ali več tangencialnih nizih terminalnih traheid kasnega lesa bora *Pinus strobus* v septembru, oktobru in januarju. Nix in Villiers (1985) sta na vzorcih odvzetih v novembru in marcu merila dvojne debeline celičnih sten traheid kasnega lesa pri dveh borih *Pinus taeda* ter *Pinus elliotii*. Debeline celičnih sten izmerjene v marcu so bile večje kot v novembru, kar sta pojasnila z nezaključenim procesom diferenciacije v novembru.

V eni izmed naših predhodnih študij smo podrobneje raziskali nastajanje sekundarne celične stene in lignifikacijo terminalnih traheid kasnega lesa pri jelki *Abies alba* v dormantnem obdobju s pomočjo svetlobne in transmisijske elektronske mikroskopije ter UV-mikrospektrofotometrije (Gričar in sod., 2003a, 2005a). Ugotovili smo, da sta se kambijeva celična delitvena aktivnost in proces diferenciacije kasneje zaključila pri drevesih s širokimi branikami oziroma produktivnejšim kambijem (Gričar in sod., 2003a). Kambijeva celična delitvena aktivnost se je pri vseh drevesih zaključila v oktobru, medtem ko je proces diferenciacije v najmlajših traheidah ob kambiju pri drevesih z branikami širokimi nad 1 mm takrat še vedno potekal. Sloj S3 sekundarne celične stene ter bradavičasti sloj nista bila oblikovana, notranji deli srednjega sloja S2 sekundarne celične stene pa še niso bili lignificirani. V novembru so bile pri vseh drevesih celične stene terminalnih traheid kasnega lesa ob kambiju dokončno oblikovane in lignificirane. Na ultrastrukturni ravni ni bilo opaziti nobenih razlik v porazdelitvi in vsebnosti lignina med novembrskimi ter marčevskimi vzorci. V vseh proučenih drevesih se je torej proces diferenciacije v terminalnih traheidah kasnega lesa zaključil pred zimo (Gričar in sod., 2003a,b, 2005a).

2.6.3.2 Porazdelitev lignina po celični steni

Vsebnost lignina v celični steni variira v odvisnosti od drevesne vrste, vrste celice, starosti in dela drevesa, deleža reakcijskega lesa ter drugih dejavnikov (Burlat in sod., 2001, Tišler, 1986). Tako npr. juvenilni les vsebuje več lignina kot adultni les, kar je povezano s spremembami v morfologiji celične stene (Donaldson, 1985). Rani les ima več lignina kot kasni les zaradi večjega deleža srednje lamele glede na celotni volumen celične stene (Lin in Dence, 1992, Donaldson, 2001). Les iglavcev vsebuje $30 \pm 4\%$ lignina (Fengel in Wegener, 1989). Vsebnost lignina je največja v združeni srednji lameli (več kot 50%) in proti lumnu postopoma upada. Sekundarna celična stena vsebuje okrog 20% lignina, ker pa predstavlja največji volumski delež celotne celične stene, je v njej vsaj 70% lignina (Parham, 1974, Terashima in Fukushima, 1988, Terashima in sod., 1988, Fengel in Wegener, 1989, Fukushima in Terashima, 1991, Lin in Dence, 1992, Fukuzawa, 1992, Terashima, 2000). Največjo koncentracijo lignina vsebujejo vogali srednje lamele (Fergus in sod., 1969, Fukuzawa in Imagawa, 1981, Saka in sod., 1982, Boutelje in Eriksson, 1984, Donaldson, 1985, 1986, 1993, 2001, Westermarck in sod. 1988, Brändström, 2001).

UV fotometrična merjenja lignina v celičnih stenah traheid navadne jelke (*Abies alba*) ter navadne smreke (*Picea abies*) niso pokazala nobenih odstopanj v količini lignina med zdravimi in prizadetimi drevesi (Fink, 1986). Avtor je zaključil, da hiranje dreves na sam proces lignifikacije nima nobenega vpliva.

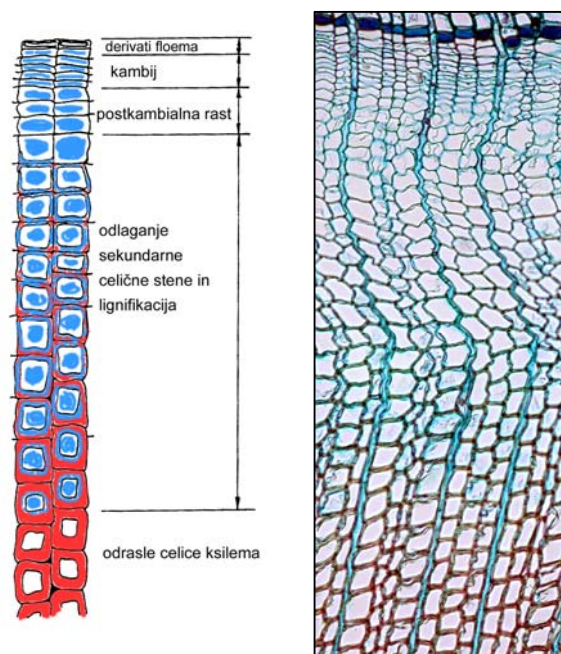
Gindl in sodelavci (2000) so na smreki *Picea abies* v Avstrijskih Alpah zasledili zmanjšano koncentracijo lignina v sloju S2 v terminalnih traheidah kasnega lesa. Avtorji so predpostavili, da je koncentracija lignina v teh zadnjih nastalih celicah v tesni zvezi z jesenskimi temperaturami v Alpah. V naših raziskavah na jelki *Abies alba* tega nismo mogli potrditi (Gričar in sod., 2003b, 2005a). Razlike v koncentraciji lignina v stenah traheid pri boru *Pinus radiata*, ki so se pojavljale zlasti v združeni srednji lameli, naj bi bile genetskega izvora (Donaldson, 1985, 1986, 1993, Donaldson in sod., 1997). Četudi je srednji sloj S2 navadno enakomerno lignificiran, se lahko priložnostno pojavijo razlike v lignifikaciji v obliki koncentričnih plasti (Donaldson, 2001). Koncentracija lignina v zunanjem sloju S1 naj bi bila nekoliko nižja kot v združeni srednji lameli, a višja kot v srednjem sloju S2 (Bland in sod., 1971, Parham in Cote, 1971, Saka in sod., 1982). Pri smreki *Picea abies* naj bi bil sloj S1 v zunanjem delu visoko lignificiran, v notranjem pa nizko (Donaldson, 2001). Pri boru *Pinus radiata* je bila lignifikacija sloja S1 neenakomerna in nižja kot v sloju S2, zlasti na prehodu slojev S1/S2 (Donaldson, 1985). Sloj S3 je bil dostikrat opisan kot bolj lignificiran v primerjavi s slojem S2 (Scott in sod., 1969, Bland in sod., 1971, Parham in Cote, 1971, Saka in sod., 1982, Donaldson, 1987, 2001, Gričar, 2001). Nekaj kvantitativnih študij je pokazalo, da je vsebnost lignina v sloju S3 višja kot v sloju S2 in nižja kot v združeni srednji lameli. Vendar pa na splošno prevladuje mnenje, da je vsebnost lignina v sloju S3 odvisna od drevesne vrste. V literaturi je relativno malo podatkov o vsebnosti lignina pri vrstah, ki niso iz rodu *Pinaceae* (Donaldson, 1987, 2001). Mesta obokanih prikenj na primarni steni so navadno bolj lignificirana od ostalih delov. Membrane pikenj, vključno s torusi obokanih pikenj pa niso lignificirane (Donaldson, 2001).

Donaldson (1991) je preučeval vplive hitrosti priraščanja, debelne ekscentričnosti, položaja drevesa ter gozdarskih posegov na koncentracijo lignina v srednji lameli traheid na vzorcih

bora *Pinus radiata*, vendar zveze med preučevanimi dejavniki in koncentracijo lignina ni ugotovil.

2.7 KSILOGENEZA

Les ali sekundarni ksilem je mehansko in za vodo prevodno tkivo debel in korenin, za katerega so značilni trahealni elementi (Torelli, 1990). Nastane v kompleksnem procesu ksilogeneze, ki se prične s periklinimi celičnimi delitvami v vaskularnem kambiju, ki jim sledi postkambijska rast celic, sinteza sekundarne celične stene, lignifikacija celične stene in programirana celična smrt (slika 12). Ksilogeneza vodi do specializacije celic glede na njihovo kemijsko zgradbo, morfološke značilnosti in funkcije. Delitve v kambiju in postkambijska rast določata širino letnega ksilemskega prirastka, odlaganje sekundarne celične stene in lignifikacija pa akumulacijo biomase v celične stene traheid (letni prirastek biomase) (Larson, 1994, Torelli, 1998, Lachaud in sod., 1999, Plomion in sod., 2001, Chaffey, 2002).



Slika 12: Shema in prečni prerez mikroskopskega preparata navadne jelke prikazujeta posamezne faze ksilogeneze po obarvanju kambija in ksilemskega tkiva z barviloma safranin in astra modro: kambijeve celice imajo majhne radialne dimenzije in tanke, nelignificirane primarne stene, ki so obarvane modro. V lumnih je prisotna citoplazma. V fazi postkambijske rasti se radialne dimenzije celic povečajo, tanka primarna stena je modro obarvana in nelignificirana, v lumnih je prisotna citoplazma. V fazi sinteze večslojne sekundarne stene in lignifikacije se celična stena prične debeliti. V centripetalni smeri proti lumnu z lignifikacijo rdeča barva nadomešča modro, v lumnih je še vedno prisotna citoplazma. Za zrele traheide je značilna rdeče obarvana, lignificirana celična stena, lumni pa so prazni (Uggla in Sundberg, 2002).

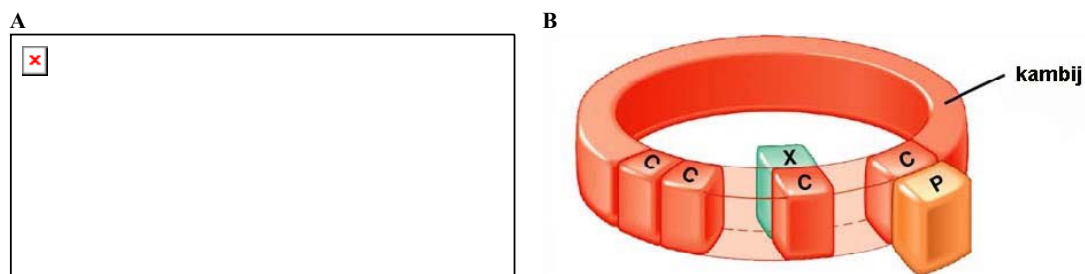
2.7.1 Kambij

Primarna ali ekstenzijska rast v apikalnih meristemih vodi do razvoja različnih primarnih rastlinskih tkiv: epiderma, korteksa, prevodnih žil, stržena in listov (Mauseth, 1988, Savidge, 2000a, Dengler, 2001). V lesnatih rastlinah že v prvem letu rasti primarna prevodna tkiva poganjkov in korenin nadomestijo sekundarna prevodna tkiva, ki jih tvori sekundarni lateralni meristem imenovan vaskularni oziroma prevodni kambij (v nadaljevanju kambij). Kambij izhaja iz prokambija, ki se razvije iz apikalnega meristema. Kambij se kot nepretrgan obroč nahaja med sekundarnim ksilemom na notranji strani in sekundarnim floemom na zunanji strani (Panshin in de Zeeuw, 1980, Mauseth, 1988, Larson, 1994). Aktivnost sekundarnega meristema se izraža kot debelinska rast, ki omogoča večanje volumna prevodnega sistema ter formiranje mehanskih in zaščitnih tkiv (Torelli, 1990). Kambij je sestavljen iz sloja celic, ki se aktivno delijo, imajo majhne radialne dimenzije in so brez medceličnih prostorov. Zgradba kambija je definirana na več načinov. Mehanistični nazori predpostavljajo, da je kambijeva rast določena vnaprej (Savidge, 2000b). Danes se predpostavlja, da je razvoj plastičen kot funkcija epigenetskega nadzora in fizikalno – kemijskega okolja (mikrookolja) v celici (Savidge 1996, 2000a, b, Dengler, 2001). V literaturi so še vedno ustaljeni mehanistični nazori in terminologija osnovana na podlagi prvih svetlobno mikroskopskih raziskav o kambijevi rasti in lesni anatomiji. Povsem se je uveljavil enoslojni koncept, da je kambij sestavljen iz enega sloja inicialk, kambijeva cona pa zajema kambijeve inicialke in materinske celice floema ter ksilema (Wilson, 1966, Schmid, 1976, Larson, 1994, Barlow in sod., 2002). Po večslojnem 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 kambijeve cone je torej ena celica (nekateri avtorji so skušali dokazati, da bi lahko bili dve) z izjemnimi lastnostmi, vse ostale celice v istem radialnem nizu pa so potomke te inicialke (Larson, 1994). Delitve 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, s čimer nastajajo novi floemski in ksilemski elementi, je Savidge (2000b) inicialko poimenoval »periklina – delitvena inicialka«. Čestokrat je lahko v posameznem radialnem nizu zaslediti štiri fuziformne kambijeve celice obdane z zunanjo primarno steno. Te celice so poznane kot »Saniove štiri« (Larson, 1994). 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).

Nekateri znanstveniki (Savidge, 1996, 2000a, b) zavračajo mehanistične koncepte (inicialk ter materinskih celic) in razlage o kambijevi rasti, medtem ko ga drugi sprejemajo kot najustreznejšega (Wilson, 1966, Schmid, 1976, Larson, 1994, Chaffey, 1999, Lachaud in sod., 1999). Nobene ustrezne razlage ni, zakaj pri periklinih delitvah ena celična potomka obdrži posebne inicialne sposobnosti, druga hčerinska celica pa jih opusti. Četudi je v kambijevi coni vsakega radialnega niza po tej teoriji le ena celica pozicijsko sposobna producirati tako ksilemske kot floemske derivate, te inicialne celice ne moremo določiti na osnovi njene ultrastrukture ali mitotske aktivnosti (Catesson in sod., 1994, Larson, 1994, Savidge, 1996, 2000a). Kambijevo inicialko je mogoče definirati tudi kot »antiklino – delitveno inicialko« (Savidge, 2000b). Z antiklinimi delitvami v kambiju nastanejo novi radialni nizi, s čimer lahko kambij sledi večajočemu se obsegu drevesa. Pri vrstah *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, 1996, 2000a, b). Nastanek ksilema in floema ni vnaprej določen. Kambij nastane in se ohranja s pomočjo bazipetalnega avksinskega toka in fizikalnimi silami. Različno delovanje kambijevih celic ter kambijevih derivatov na njegovi zunanji in notranji strani je mogoče pojasniti s spremembami v mikrookolju posamezne celice, ki vpliva na gensko izražanje in katalizo encimov. Vse fuziformne kambijeve celice istega radialnega niza se lahko neposredno diferencirajo v trahealne elemente, pri čemer ni nobena izvzeta iz terminalne diferenciacije. Za proces ksilogeneze niso potrebne predhodne delitve. V primeru prekinjenega bazipetalnega toka avksina v kambiju se vse celice dediferencirajo v celice aksialnega parenhima, kar dokazuje, da ni nobena celica v kambiju trajna (Savidge, 1996, 2000b).

Kambij sestavljata dva tipa inicialk: kratke precej izodiametrične trakovne inicialke, iz katerih nastanejo radialni trakovi ter podaljšane fuziformne oziroma vretenaste inicialke, ki tvorijo aksialne elemente. Dolžina fuziformnih inicialk je glede na pozicijo v drevesu in starost drevesa različna. Vaskularni kambij se od ostalih meristemov razlikuje po dveh vrstah visoko vakuoliziranih celic (Larson, 1994, Lachaud in sod., 1999, Plomion in sod., 2001, Barlow in sod., 2002). Razmerje med radialnimi ter fuziformnimi inicialkami zavisi od starosti kambija ter drevesne vrste. Delež trakovnih inicialk je tako nekje med 10% in 40%. Poleg prenašanja obveščevalnih molekul so trakovi nujni za izmenjavo hranljivih snovi med ksilemom in floemom (Lachaud in sod., 1999, Plomion in sod., 2001). Radialni transport iz ksilema v floem in obratno nedvomno služi kot mehanizem za skladiščenje škroba ter drugih rezervnih produktov v trakovnih celicah. Prisotnost številnih plazmodezem v tangencialnih stenah trakovnih celic omogoča njihovo radialno komunikacijo. Razmerje v številu in razporeditvi fuziformnih in trakovnih inicialk se ohranja z multiplikativnimi delitvami ter pretvorbami enega tipa celic v drugega (slika 13) (Lachaud in sod., 1999). S temi delitvami nastajajo nove kambijeve inicialke, s čimer lahko kambij sledi večanju obsega drevesa. V primitivnejšem kambiju z dolgimi fuziformnimi inicialkami so multiplikativne delitve psevdotransverzalne (iglavci in primitivni listavci), pri naprednejšem kambiju s kratkimi fuziformnimi inicialkami pa radialne antikline (evolucijsko visoko razviti listavci) (Panshin in de Zeeuw, 1980, Larson, 1994, Torelli, 1998, Barlow, 2002). Ravnovesje inicialk v kambiju ostaja, saj so fuziformne in trakovne inicialke medsebojno pretvorljive. Iz fuziformnih inicialk nastanejo s transformacijskimi oziroma prečnimi delitvami nove trakovne inicialke, z intruzivno rastjo pa se trakovne inicialke podaljšajo v fuziformne. Kambij ima pri debelinski rasti in razvoju dreves odločilno vlogo, saj s periklinimi oziroma aditivnimi delitvami, ki potekajo v tangencialni ravnini, nastajajo nova vaskularna tkiva ksilema in floema, s čimer se obseg drevesa povečuje. Proizvajanje sekundarnih prevodnih tkiv predstavlja približno 90% vseh mitoz (Lachaud in sod., 1999). Aktiven kambij je podvržen stalnim spremembam v številu, obliki in velikosti sestavnih celic. Spremembe v celičnih dimenzijah se delijo na intrakambialne in ekstrakambialne. Intrakambialne spremembe so tiste, ki vplivajo direktno na kambijeve inicialke in so posledica antiklinih delitev. Ekstrakambialne spremembe vplivajo na derivate kambija in ne nastanejo v kambiju. Potekajo v procesu diferenciacije in maturacije. Spremembe so včasih minimalne ali manjkajo (Larson, 1994).

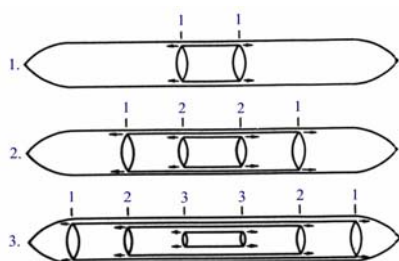


Slika 13: A – Možne smeri delitev kambijeve fuziformne inicialke: a – antikline ali multiplikativne delitve, p – perikline oziroma aditivne delitve, ki dodajajo nove celice ksilemskemu ali floemskemu tkivu, t – transversalne oziroma prečne delitve, ki vodijo do nastanka trakovnih inicialk; B – Antikline (C-C) in perikline (C-P ali C-X) delitve v kambiju (Barlow in sod., 2002).

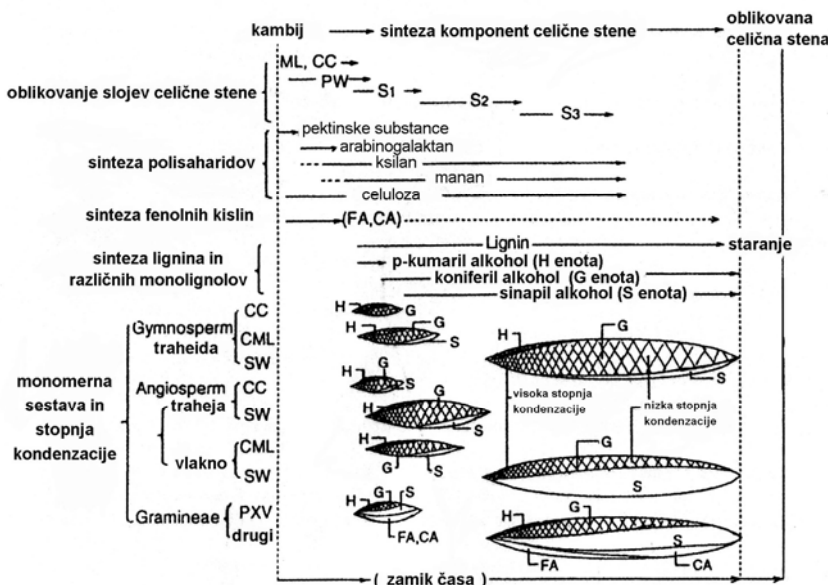
2.7.2 Diferenciacija traheid

Po zadnji delitvi kambijevih celic, ki jih obdaja le tanka, raztegljiva primarna stena, se začne proces diferenciacije. Prične se specifičen razvoj celice, kjer se usposobi za opravljanje določenih nalog (Wardrop, 1965, Panshin in de Zeeuw, 1980, Larson, 1994, Plomion in sod., 2001). Diferenciacija obsega številne medsebojno povezane biokemijske, fiziološke in morfološke procese, ki vodijo k specializaciji celice (Torelli, 1990). Ko je proces celične diferenciacije zaključen, se celica strukturno in/ali biokemijsko loči od kambijeve inicialke (Savidge, 1996). Iz kambijeve celice nastanejo različni tipi ksilemskih celic, katerih edinstvene lastnosti in tri dimenzionalna zgradba določajo strukturo in s tem lastnosti lesa. Diferenciacija je razdeljena na več faz, ki so med seboj povezane (slika 14). Prva je determinacija, ki določi smer diferenciacije celice. Determinacijo lahko definiramo kot izpolnitev pogojev, ki omogočajo prehod iz enega celularnega stanja v drugega. Zgodijo se številne biokemijske in genetske spremembe, ki so potrebne za takšen prehod celičnega stanja. V nadaljevanju so možnosti celice za nadaljnji razvoj omejene, saj lahko iz nje nastane le en tip celice (Chaffey, 1999, 2002). Različen razvoj prvotno podobnih celic je rezultat selektivne genske ekspresije. V določeni celici se izrazijo in prepišejo v mRNA ter nato prevedejo v proteine le izbrani geni. Nastali specifični proteini določajo identiteto celice (Torelli, 2000). V procesu determinacije se kortikalni mikrotubuli preusmerijo (Chaffey, 1999). Prvi znak diferenciacije, ki sledi determinaciji, je razločna ekspanzija kambijevih derivatov (podaljševanje in prečna rast), ki nastane zaradi povečanja volumna vakuol brez kakršnih koli očitnih sprememb v strukturi celice (Larson, 1994, Plomion in sod., 2001). V fazi površinske rasti lahko celica nekajkrat poveča svoje dimenzije. Površinska rast pri traheidah gre v glavnem na račun povečanja radialne dimenzije (Wardrop, 1965). Zmožnost kambijevih derivatov za radialno rast naj bi bila deloma povezana s kemijskimi razlikami med radialnimi in tangencialnimi celičnimi stenami (Cateson in sod., 1994). Rast traheid v dolžino navadno ne presega 20% (Wardrop, 1965). Sledi faza debelitve celične stene, kjer se na primarno celično steno v centripetalni smeri sintetizira masivna, toga in večslojna sekundarna celična stena. Proces je voden z usklajeno ekspresijo številnih genov specifično vključenih v biosintezo ter zgradbo štirih glavnih komponent celične stene: polisaharidov (celuloza in hemiceluloze), lignina, proteinov in drugih topnih (stilbeni, flavonoidi, tanini, terpeni) in netopnih (pektini) komponent celične stene (slika 15) (Plomion in sod., 2001). V tej fazi se v celični

steni vrši tudi oblikovanje obokanih pikenj. Ko je celična stena popolnoma oblikovana, v prevodnih ksilemskih elementih sledi programirana celična smrt z avtolizo citoplazme (Wardrop, 1965, Plomion in sod., 2001). Tok kalcija izzove kolaps vakuole, s signalom, ki še ni popolnoma poznan. Pri tem se sprostijo hidrolaze, ki razgradijo vso celično vsebino razen sekundarne celične stene (Plomion in sod., 2001). V zadnji fazi diferenciacije vlaken se v njih vgradijo rastne napetosti (Torelli, 1998).



Slika 14: Shematski prikaz oblikovanja slojev sekundarne celične stene v diferencirajoči celici. Faze diferenciacije so med seboj povezane. Debelitev celične stene (1) se v osrednjem delu celice prične, preden se rast celice v vršičkih ustavi. Lignifikacija se prične, preden je celična stena dokončno formirana (Wardrop, 1965).



Slika 15: Shema nastanka celične stene. ML – srednja lamela, P – primarna stena, S1, S2, S3 – sloji sekundarne celične stene, CC – celični vogali, CML – združena srednja lamela, SW – sekundarna stena, H – p-hidroksifenilpropanske enote, G – gvajacilpropanske enote, S – siringilpropanske enote, FA – ferulska kislina, CA – p-kumaridna kislina, PVX – traheja protoksilema (Terashima, 2000, Takabe, 2002).

2.7.2.1 Sezonska dinamika kambijeve aktivnosti

Rast in razvoj dreves sta nadzorovana z notranjimi in zunanji dejavniki. Za drevesne vrste zmerne pasu je značilno periodično menjavanje obdobj aktivnosti in dormance vaskularnega kambija, ki je v splošnem povezano z izmenjavami hladnih in toplih ali pa sušnih in deževnih obdobj. Kambijeva meristemska aktivnost se v normalnih razmerah zaključi pozno poleti in se ponovno prične spomladi z delitvami kambijevih celic, čemur sledi diferenciacija derivatov v odrasle elemente ksilema in floema (Denne in Dodd, 1981, Larson, 1994, Savidge, 1996, 2000a, b, Kozlowsky in Pallardy, 1997, Chaffey, 1999, Lachaud in sod., 1999, Wodzicki, 2001, Larcher, 2003). Delitvena aktivnost materinskih celic je v normalnih razmerah veliko intenzivnejša na ksilemski strani kot na floemski strani, kar razloži znatno nesorazmerje med floemskim in ksilemskim tkivom (Pandshin in de Zeeuw, 1980, Larson, 1994, Kozlowsky in Pallardy, 1997, Plomion in sod., 2001). Periodično delovanje kambija je povezano s spremembami ultrastrukture kambijevih celic, debelini celičnih sten in razporeditvi kortikalnih mikrotubulov (Chaffey in sod., 1998, Chaffey, 1999). Ob prehodu iz aktivnega v dormantno obdobje kambijeve celice začnejo kopičiti rezervne snovi, da postanejo odporne na mraz in postanejo nedovzetne za eksogeni avksin. Različni produkti, ki so skladiščeni v kambijevih celicah, predstavljajo rezervno hrano ob ponovnih delitvah v kambiju (Rao in Catesson, 1985, Lachaud in sod., 1999). Tudi stene kambijevih celic so podvržene sezonskim spremembam, ki preprečujejo ekspanzijo celic med dormanco. Takrat so celične stene značilno odebeljene (Larson, 1994, Chaffey in sod., 1997, Chaffey, 1999, Lachaud in sod., 1999).

Število celic v kambiju v vegetacijskem obdobju nakazuje ravnovesje med stopnjo produkcije ter stopnjo diferenciacije kambijevih derivatov (Oven, 1993, Lachaud in sod., 1999). Ko pričnejo potekati delitve v kambiju, se število kambijevih celic poveča (Kutscha in sod., 1975, Larson, 1994, Deslauriers, 2003). Na začetku rastne sezone poteka delitev celic hitreje kot diferenciacija, zato širina kambija naraste. Dokler se ohranja ravnovesje med stopnjo celičnih delitev ter stopnjo diferenciacije, je širina kambija bolj ali manj konstantna. Ko je stopnja diferenciacije hitrejša od stopnje delitev, se prične kambij tanjšati. Slednjič celične delitve popolnoma izostanejo. Večina kambijevih derivatov se diferencira bodisi v celice floema ali ksilema in debelina kambija je le iz nekaj celic (Oven, 1993, Larson, 1994, Lachaud in sod., 1999). Zaključek diferenciacije terminalnih traheid kasnega lesa je odvisen od trajanja kambijeve aktivnosti (Schmitt in sod. 2003, Gričar in sod. 2003a). Pri navadni jelki (*Abies alba*) z ozkimi branikami oziroma manj produktivnim kambijem se proces diferenciacije zadnjih nastalih terminalnih traheid kasnega lesa konča prej kot pri drevesih s širokim branikami, kjer se zaključi pozno jeseni (Gričar in sod. 2003b, 2005a).

2.7.2.2 Dormantno obdobje

Dormanca je začasno obdobje prekinitve rasti rastlinskih struktur, ki vsebujejo meristem (apeksi korenin in poganjkov, vegetativni popki, vaskularni kambij, plutni kambij, cvetni popki, razvijajoči listi, razvijajoči plodovi) (Lang in sod., 1985, 1987, Kozlowski in Pallardy, 1997, Larcher, 2003). Lang in sodelavci (1985, 1987) so poenotili in poenostavili terminologijo, ki se nanaša na dormantno obdobje rastlin. Dormanco so razdelili na tri obdobja: ekodormanco, paradormanco in endodormanco (Lang in sod., 1987). Pri delitvi so bili ključni tisti dejavniki, ki sprožijo dormanco in pa področja, kjer je bilo mogoče

zaznati prve odzive, ki so nadalje povzročila končne rastno-inhibitorske reakcije. Prvo obdobje ekodormance uravnavajo dejavniki zunaj rastline, to so dejavniki naravnega okolje (voda, temperatura, hranilne snovi, itd.), ki nespecifično vplivajo na celoten metabolizem rastline (Lang in sod., 1985, 1987). Ekodormanca nastopi zaradi krajšanja dolžine dneva in zniževanja temperatur (Larcher, 2003). Obdobje paradormance je uravnavano s fiziološkimi dejavniki znotraj rastline, ki pa so hkrati izven prizadete strukture (npr. apikalna dominanca ali določeni primeri fotoperiodičnega nadzora). Biokemijski signal je lahko sprožen iz okolja, ni pa nujno. Tretje obdobje endodormance je nadzorovano s fiziološkimi dejavniki, ki so znotraj prizadete strukture (npr. mraz ali določeni primeri fotoperiodskega nadzora). Ti dejavniki imajo določene značilnosti, kot je začetek, trajanje in intenziteta, zato se rastline v tem obdobju ne morejo odzvati na začasne ugodne klimatske razmere, kar predstavlja pomembno ekološko adaptacijo na hladna obdobja. Če bi se rastline odzvale na kratkotrajne otoplitve v zimskem obdobju, bi ob naslednjem hladnem valu utrpele številne poškodbe (Lang in sod., 1985, 1987, Larcher, 2003).

DORMANCA		
ekodormanca	paradormanca	endodormanca
uravnavana z dejavniki OKOLJA	uravnavana s FIZIOLOŠKIMI dejavniki zunaj prizadete strukture	uravnavana s FIZIOLOŠKIMI dejavniki znotraj prizadete strukture
P R I M E R I temperaturni ekstremi, pomanjkanje hranilnih snovi, vodni stres	apikalna dominanca, fotoperiodni odzivi	mrazni odzivi, fotoperiodni odzivi

Slika 16: Shema treh različnih obdobij dormance, kot so jih predlagali Lang in sodelavci (1987).

2.7.2.3 Sezonska dinamika ksilogeneze

Največ raziskav o sezonski dinamiki ksilogeneze je bilo do sedaj opravljenih na številnih vrstah iglavcev; *Abies balsamea*, *Abies alba*, *Larix decidua*, *Larix sibirica*, *Pinus sylvestris*, *Picea abies*, *Picea glauca*, *Picea mariana*, *Picea sitchensis*, *Pinus cembra*, *Pinus halepensis*, *Pinus sylvestris*, *Pinus taeda*, *Tsuga canadensis*, *Tsuga sieboldii* itd. (Whitmore in Zahner, 1966, Wolter, 1968, Skene, 1972, Wodzicki, 1972, Kutscha in Schwarzmman, 1975, Antonova in Stasova, 1993, 1997, Antonova in sod., 1995, Camarrero in sod., 1998, Horacek in sod., 1999, Gindl in sod., 2001, Mäkinen in sod., 2003, Deslauriers, 2003, Deslauriers in sod., 2003a, b, Rossi in sod., 2003, 2006b, Schmitt in sod., 2004, Deslauriers in Morin, 2005). Tovrstnih študij na listavcih je malo (Schmitt in sod., 2000, 2004). Trenutno potekajo raziskave na difuzno poroznih listavcih (*Aesculus hippocastanum*, *Acer platanoides*, *Platanus x hispanica*) v urbanem okolju v Sloveniji (Marion in sod., 2005) in na hrastu *Quercus robur* ter bukvi *Fagus sylvatica* na Nizozemskem (Werf van der in Sass-Klaassen, 2006). Raziskave na iglavcih so bile opravljene v ZDA (Gregory in Wilson, 1968, Skene, 1972, Kutscha in Schwarzmman,

1975), v borealnih gozdovih Kanade (Deslauriers, 2003, Deslauriers in sod., 2003a, b, Deslauriers in Morin, 2005, Turcotte in sod., 2005) v osrednji Sibiriji (Antonova in Stasova, 1993, 1997, Antonova in sod. 1995), ob alpski gozdni meji v Italiji (Rossi in sod., 2003, 2006b), na Češkem (Horacek in sod., 1999), Poljskem (Wodzicki, 1972, 2001), v semiaridnih območjih SV in JV Španije (Camarero in sod., 1998, Dorado in sod., 2005, Ribas in Gutiérrez, 2005), na Finskem (Mäkinen in sod., 2003, Schmitt in sod., 2004, Seo in sod., 2005), v Veliki Britaniji (Ford in sod., 1978), v Sloveniji (Gričar in sod., 2004, 2005c, Oven in sod., 2004, Čuden, 2005, Zupan, 2005) in v Avstriji (Gindl in sod., 2001, Demšar, 2004).

Včasih so študije omejene na del vegetacijskega ali dormantnega obdobja (Antonova in sod., 1995), ne zajemajo vseh procesov ksilogeneze (Murmanis in Sachs, 1969, 1973, Kutscha in Schwarzmanna, 1975, Kutscha in sod., 1975, Antonova in sod., 1995, Horacek in sod., 1999), so opravljene na sadikah in ne na odraslih drevesih (npr. Richardson in Dinwoodie, 1960, Denne in Dodd, 1981) ali pa so intervali med odvzemanjem vzorcev veliki (Camarero in sod., 1998, Gindl in sod., 2001, Dorado in sod., 2005). Nekaj raziskav je bilo opravljenih tudi po prenehanju kambijeve celične delitvene aktivnosti (Nix in Villiers, 1985, Donaldson, 1991, 1992, Schmitt in sod., 2003, Gričar in sod., 2003b, Gričar in sod., 2005a) s poudarkom na spremljanju lignifikacije celičnih sten terminalnih traheid kasnega lesa pri različnih iglavcih.

Traheide iglavcev srednje Evrope v splošnem potrebujejo za celoten proces diferenciacije 1 do 2 meseca (Wodzicki, 1972). Trajanje faze postkambijske rasti je odvisno od časa v rastni sezoni in znaša od 2 do 4 tedne. Odlaganje sekundarne celične stene in lignifikacija potekata nekje od 4 do 5 tednov (maksimalno 8 tednov). Nižje temperature skozi daljše časovno obdobje, krajšanje dolžine dneva in pomanjkanje vode povzročijo ustavitev radialne rasti celic (Wodzicki, 1972). V splošnem se delitve v kambiju pri drevesih zmernega pasu začnejo med sredino aprila in začetkom junija, končajo pa se med koncem julija in začetkom septembra (Wodzicki, 1972).

Za raziskave sezonske dinamike kambijeve aktivnosti in nastanka ksilemske branike pri različnih drevesnih vrstah se uporabljajo številne metode, kot npr. merjenje z dendrometri, mikro vzorčenje, metoda »pinning«, žebljanje, nožkanje, merjenje električne upornosti kambija, radiološka metoda, upogibna metoda itd. (Whitmore in Zahner, 1966, Wolter, 1968, Yoshimura in sod., 1981a, b, Kuroda in Shimaji, 1983, 1984a, b, 1985, Kuroda, 1986, Kuroda in Kiyono, 1997, Gindl in sod., 2001, Deslauriers, 2003, Ugglja in Sundberg, 2002, Wimmer, 2002, Mäkinen in sod., 2003, Gričar in sod., 2003a, 2004, 2005b, Rossi in sod., 2003, Schmitt in sod., 2003, 2004, Demšar, 2004, Oven in sod., 2004, Seo in sod., 2005, Turcotte in sod., 2005, Zupan, 2005). Vsaka metoda ima svoje prednosti in pomanjkljivosti, vendar so rezultati med seboj primerljivi.

2.7.2.3.1 Mikro vzorčenje

Študije debelinske rasti dreves v eni rastni sezoni največkrat temeljijo na ponovitvah odvzema majhih vzorcev (t.i. mikro vzorčenje) kambija in ksilemskega tkiva po obodu drevesa. Za študije nastanka ksilemske branike so časovni intervali vzorčenja različni. Za odvzem vzorcev se uporabljajo nespecifična orodja (kot npr. Surgical needle bone,

Trapsystem[®] needle, kladivo in ostro dleto) ali pa specifična (Increment hammer, Increment puncher, Trephor), ki so bila namensko razvita za tovrstne raziskave (Gregory in Wilson, 1968, Ford in sod., 1978, Ugglia in sod., 1998, Forster in sod., 2000, Gindl in sod., 2001, Gričar, 2001, Deslauriers, 2003, Gričar in sod., 2003a, b, 2005a, Čuden, 2005, Rossi in sod., 2006a, b). Vzorčenje je najbolj kritično na začetku vegetacije, ko je kambijevo območje široko in nastajajo celice ranega lesa s tankimi celičnimi stenami in velikimi radialnimi dimenzijami. Kvaliteta vzorca je odvisna od ostrine rezalne konice orodja (slika 17). Pri uporabi skrhanega orodja so vzorci razpokani, zgnečeni ali porušeni (Forster in sod., 2000, Rossi in sod., 2006a). Velikosti odvzetih vzorcev določajo oddaljenost med sosednjimi vzorci zaradi odziva kambija na mehanske poškodbe. Večletno vzorčenje istega drevesa verjetno lahko vpliva na njegovo vitalnost.



Slika 17: Eden najnovejših specifičnih orodij za odvzem mikro izvrtkov je Trephor, ki ga je razvila italijanska skupina raziskovalcev iz Padove (Rossi in sod., 2006a) (Foto: L. Marion).

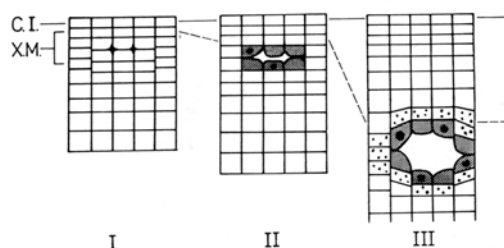
2.7.2.3.2 Metoda pining in odziv kambija na vbod z iglo

Metoda pining temelji na zelo majhni poškodbi kambija in njegovemu odzivu na vbod z iglo premera 1-2 mm, s čimer je označen ksilemski prirastek nastal do trenutka poškodbe (Wolter, 1968). Minimalna poškodba z iglo povzroči odziv kambijevih celic in celic v zgodnjih fazah procesa diferenciacije v obliki nastanka kalusnega tkiva, ki se v braniki permanentno ohrani in je prepoznaven tudi po več letih. Metoda natančno določi položaj kambijevih celic v času vboda z iglo. To predstavlja bistveno prednost te metode pred ostalimi. Poškodba z iglo je omejena na zelo ozko tkivno področje in ne vpliva na vitalnost celotnega drevesa. V poškodovanem tkivu so se le kambijeve celice in najmlajši ksilemski derivati zmožni odzvati na poškodbo z iglo. Mehanska poškodba kambija povzroči nastanek kalusa, poranitvenega lesa in travmatskih smolnih kanalov (Yoshimura in sod., 1981a, b, Kuroda in Shimaji, 1983, 1984a, b, Kuroda, 1986). Metoda je bila uspešno uporabljena na iglavcih in listavcih (Wolter, 1968, Kuroda in sod., 1981a, b, Kuroda in Shimaji, 1983, 1984a, b, 1985, Yoshimura in sod., 1981a, b, Kuroda, 1986, Kuroda in Kiyono, 1997, Verheyden in sod., 2004, Demšar, 2004, Schimtt in sod., 2004, Zupan, 2005). Pri starejših raziskavah s to metodo je bilo več vbodov z iglo narejenih na isti dan, v času največje kambijeve aktivnosti. Vzorci so bili nato odvzeti v določenih intervalih (Yoshimura in sod., 1981a, b, Kuroda in Shimaji, 1983, 1984a, b, 1985, Kuroda, 1986, Kuroda in Kiyono, 1997). Z metodo pining je mogoče proučiti odziv kambija na poškodbo in čas ter način nastanka kalusnega tkiva (Kuroda in sod., 1981a, b, Kuroda in Shimaji, 1983, Yoshimura in sod., 1981a, b, Kuroda, 1986). Poleg tega je mogoče s to metodo slediti dinamiko kambijeve aktivnosti in nastanka sekundarnega ksilema tekom rastne sezone (Bäucher in sod., 1998, Lukan, 2004, Schmitt in sod., 2004, Demšar, 2004, Zupan,

2005). V tem primeru so vbodi narejeni v eno- ali dvotedenskih intervalih, vzorci pa odvzeti po koncu rastne sezone.

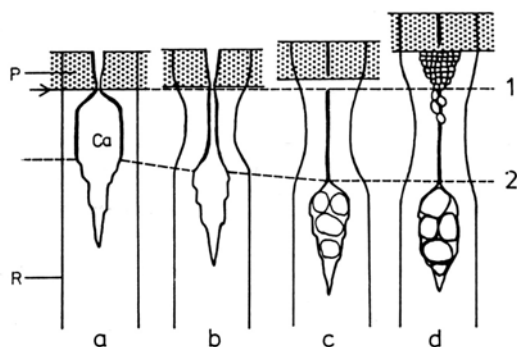
Vbod z iglo povzroči v kambiju zelo majhno poškodbo, ki se razlikuje od velikih mehanskih poškodb (Torelli in sod., 1990, Oven, 1997). Obseg ranitvenega tkiva je manjši, struktura poškodovanega tkiva pa je neodvisna od velikosti rane. Poranitveni les je mesto poškodbe nastale z vbodom igle prerasel. Skozi rastno sezono se je odziv na poškodbo spreminjal. Poškodovanja ob zaključku rastne sezone so lahko ponovno vzpodbudila kambijevo aktivnost (Lukan, 2004, Demšar, 2004, Oven in sod., 2004, Zupan, 2005, Gričar in sod., 2005c). Strukturo tkiva, nastalega kot odziv na ranitev z iglo, so opisali različni avtorji na različnih drevesnih vrstah; *Pinus resinosa* – Wolter (1968), *Pinus taeda* – Yoshimura in sodelavci (1981a, b), Kuroda in sodelavci (1981a, b) Kuroda in Shimaji (1984a, 1985), *Tsuga sieboldii* – Kuroda in Shimaji (1983), *Populus americana* – Kuroda in Shimaji (1984b), *Chamaecyparis obtusa* – Kuroda in Kiyono (1997), *Picea abies* – Bäucher in sodelavci (1998), Lukan (2004), Demšar (2004), Oven in sodelavci (2004), Zupan (2005).

Preiskave nenormalnega tkiva v bližini poškodbe, zlasti travmatskih smolnih kanalov natančnost te metode še izboljša. Kuroda in Shimaji (1983) sta v eni izmed študij sledila procesu nastajanja travmatskih smolnih kanalov pri *Tsuga sieboldii*. Ugotovila sta, da je položaj zunanega roba travmatskih smolnih kanalov sovpadal s položajem kambijevih inicialk v času vboda, medtem ko se notranji rob travmatskih smolnih kanalov ni skladal (slika 18). Na osnovi tega sta sklepala, da so se travmatski smolni kanali vedno razvili iz ksilemskih materinskih celic v bližini kambijevih inicialk v trenutku vboda. V nekaterih primerih pa so travmatski smolni kanali nastali nekoliko kasneje glede na čas vboda. Kuroda in Shimaji (1983) sta zaključila, da položaj travmatskih smolnih kanalov ne označuje položaja kambijevih inicialk tako natančno kot ga nenormalno tkivo. Ravno tako začetka faze oblikovanja sekundarne celične stene ni mogoče določiti iz položaja travmatskih smolnih kanalov. Po drugi strani pa je travmatske smolne kanale precej lažje zaslediti kot nenormalno tkivo, ki je omejeno le na neposredno bližino vboda (Kuroda in Shimaji, 1983, Kuroda, 1986). Travmatski smolni kanali se ob poškodbi pojavijo tudi pri vrstah, ki normalnih smolnih kanalov nimajo. Določeni ksilemski derivati, ki bi se v normalnih razmerah diferencirali v traheide, spremenijo smer razvoja in se oblikujejo v epitelne celice aksialnih smolnih kanalov (Kuroda in Kiyono, 1997).



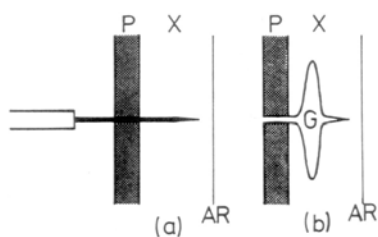
Slika 18: Shema nastanka travmatskega smolnega kanala pri *Tsuga sieboldii* po: (I) treh dneh, (II) desetih dneh in (III) enem mesecu po poškodovanju. C.I. – kambijeve inicialke, X.M. – ksilemske materinske celice, prekinjena črta - položaj kambijevih inicialk v trenutku poškodovanja (Kuroda in Shimaji, 1983).

Yoshimura in sodelavci (1981a, b) so na primeru bora *Pinus taeda* podrobneje proučili odziv tkiva na mikropoškodbe (slika 19). V času vboda je med kambijem ter celicami s sekundarno celično steno nastala velika odprtina. Nekaj dni po vbodu se je odprtina v območju ksilemskih materinskih celic ter celic v fazi postkambijske rasti pričela ožati. Približno po enem tednu sta se robova odprtine skorajda združila. Po desetih dneh so se prameni ostankov porušeni primarnih celičnih sten v bližini kambijevih inicialk pretrgali in se s časoma pomaknili proti floemski in ksilemski strani. Na teh mestih so pričeli radialni nizi traheid proliferirati proti kambijevim inicialkam. Medtem so se tvorile abnormalne parenhimske celice v območju med kambijem ter celicami v fazi odlaganja sekundarne celične stene. Parenhimske celice so se namnožile in povečale in povzročile deformacijo prečnih dimenzij nediferenciranih traheid. Položaj kambijevih inicialk v trenutku ranitve je bilo mogoče določiti na osnovi proliferiranega tkiva ter položaja najgloblje ležečih v ksilemu pretrganih ostankov celičnih sten (slika 19) (Yoshimura in sod., 1981a).



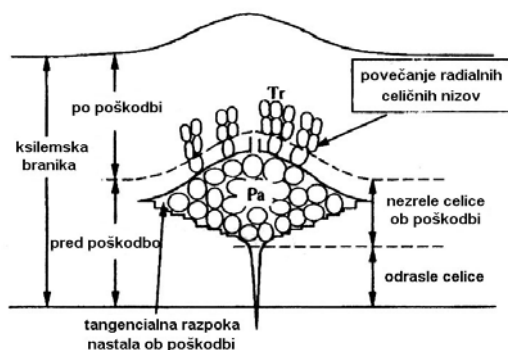
Slika 19: Shema odziva tkiv na vbod z iglo pri *Pinus taeda*: (a) neposredni odziv na vbod z iglo, (b) odziv po nekaj dneh, (c) odziv po desetih dneh in (d) odziv po enem mesecu. (1) domnevni položaj kambijevih inicialk v trenutku ranitve, (2) domnevni položaj celic v fazi odlaganja sekundarne celične stene v času ranitve. P – floem, R – trakovni parenhim, Ca – vrzel nastala z vbodom (Yoshimura in sod., 1981a).

Kuroda in Shimaji (1984b) sta proučila odziv kambija na vbod z iglo tudi v radialni ravnini (slika 20), kjer je bila lepo vidna odprtina, ki je nastala po poškodbi v območju kambija. Teden dni kasneje se je odprtina začela ožati. Prazen prostor so zapolnile parenhimske celice trakov in ostanki kolabiranega kambija (Kuroda in Shimaji, 1984b).



Slika 20: Shematski prikaz odziva tkiv na vbod z iglo pri *Pinus taeda* v radialni ravnini: a) neposreden vbod z iglo; b) odziv po izvleku igle; X – ksilem, P – floem, G – odprtina nastala z vbodom, AR – letnica med tekočo braniko in braniko prejšnjega leta (Kuroda in Shimaji, 1984b).

Pri vrstah *Chamaecyparis obtusa*, *Cedrus deodara* in *Pinus taeda* naj bi se kambijeve celice v času poškodbe nahajale nad kalusom (slika 21) (Kuroda in Kiyono, 1997). Kalus naj bi nastal kot rezultat abnormalne proliferacije trakovnih celic (Kuroda, 1986). Velikost in oblika kalusnega tkiva je bila odvisna od velikosti igle, vitalnosti drevesa in drevesne vrste. Letnice so bile na mestu poškodbe valovite, saj se je lokalno (nad kalusom) zaradi poškodbe povečala celična produkcija (Kuroda, 1986).



Slika 21: Shema lokacije kambija v času poškodbe na prečnem prerezu pri *Chamaecyparis obtusa*. Pa – kalusne celice, Tr –traheide poranitvenega lesa (Kuroda in Kiyono, 1997).

Ne glede na čas ranitve je vbod z iglo pri navadni smreki povzročil izsušitev ksilemskih tkiv, nekrozo nediferenciarnih ksilemskih celic, nastanek kalusnega tkiva, travmatskih smolnih kanalov ter tipičnega poranitvenega lesa. Edini relevantni anatomske znak za določitev položaja kambija v trenutku ranitve so bili odmrli ostanki kambijevih inicialk ter najmlajših ksilemskih derivatov, ki so se nahajali v kalusu (Lukan, 2004, Demšar, 2004, Zupan, 2005). Smolni kanali se niso izkazali kot zanesljiv pokazatelj nastalega ksilemskega prirastka do časa poškodbe pri navadni smreki. Določitev zaključka redne kambijeve delitvene aktivnosti lahko otežuje z ranitvijo inducirana reaktivacija meristema, ki je bila pogostejša pri smrekah, ki rastejo v ugodnejših klimatskih razmerah (Oven in sod., 2004).

2.7.2.3.3 Dendrometri

Dendrometri so nedestruktivni instrumenti, ki kontinuirano beležijo radialne spremembe drevesnih tkiv, npr. debla, redkeje korenin. Lastnosti dendrometrov se z vidika točnosti, natančnosti, resolucije, stroškov in enostavnosti uporabe razlikujejo. V grobem ločimo kontaktne (točkasti in obročasti) in optične dendrometre (Clark in sod., 2000). Dimenzijske spremembe debel zajemajo radialno rast dreves (lesa in skorje, kot rezultat aktivnosti vaskularnega in plutnega kambija), spremembe v hidrataciji, sekundarne spremembe v skorji (kolaps sitastih elementov, inflacija parenhima, nastanek sklereid itd.) (Deslauriers in sod., 2005). Meritve dendrometrov so prikazane kot kontinuirane časovne serije radialnih fluktuacij debela, ki jih je mogoče razdeliti na reverzibilno krčenje in nabrekanje

debla povezano s pretokom vode po deblu in na ireverzibilno rast debla tekom rastne sezone. Rast drevesa zajema predvsem postkambijsko rast ksilemskih in floemskih celic. Analize meritve je mogoče opraviti na dnevni ali večdnevni skali (Deslauriers in sod., 2005, Turcotte in sod., 2005). Študije o radialnih spremembah dreves s pomočjo dendrometrov so bile največkrat opravljene med rastno sezono, najnovejše pa tudi v dormantnem obdobju (Turcotte in sod., 2005).

2.7.3 Vpliv endogenih dejavnikov na ksilogenezo

Na strukturo in lastnosti lesa vplivajo genetski in antropogeni dejavniki ter okolje, znotraj katerih nastajajo celice lesa oziroma lesno tkivo (Plomion in sod., 2001, Wodzicki, 2001). Les je končni produkt biosinteze, zato si lahko njegovo nastajanje predstavljamo kot funkcijo genskega izražanja in stopnje katalize strukturnih encimov (Savidge, 2000b). Izražanje genov v visoko organiziranem vaskularnem tkivu dreves določa epigenetski nadzorni sistem, ki je odgovoren za časovno in prostorsko zaporedje osnovnih procesov, kot npr. celične delitve, rast celic, sinteza in avtoliza celične stene (Wodzicki, 2001). Za popolno razumevanje nastanka lesa bi bilo potrebno poznati posamezne komponente vseh intrističnih procesov (npr. kemijske reakcije in fizikalne spremembe), ki so nujni za debelinsko rast dreves. Hkrati so pomembni vplivi drugih procesov na delovanje vsake posamezne komponente, kot so fitohormoni, fotosinteza ter transport do kambija. Mikrookolje znotraj vsake posamezne celice vpliva na gensko izražanje in katalizo encimov. Vloga ekstrističnih dejavnikov (voda, svetloba, CO₂, O₂, temperatura, anorganski ioni, gravitacijska sila itd.) v kambiju na te procese še ni popolnoma raziskana (Savidge, 2000b). Različne lastnosti lesa znotraj posameznega drevesa (juvenilni, adulti in senescentni les, deblo, veje in korenine, normalni in reakcijski les, beljava in jedrovina, rani in kasni les, itd.) obstajajo navkljub nespremenjenemu genotipu. Proces nastanka lesa ni vnaprej določen, pač pa je zelo plastičen produkt interakcij med genotipom in okoljem (Savidge, 2000b).

Fizikalni dejavniki okolja vplivajo na sezonsko aktivnost kambija preko hormonov. Fitohormoni imajo ključno vlogo pri fizioloških procesih v drevesu (Roberts in sod., 1988, Uggla in sod., 1996, Sundberg in sod., 2000). Lahko jih razdelimo v dve skupini: promotorji (avksini, giberelini, citokinini, etilen), ki pospešujejo in inhibitorji (abscizinska kislina), ki zavirajo rast (Roberts in sod., 1988, Plomion in sod., 2001). Pri uravnavanju kambijeve aktivnosti je avksin najpomembnejši fitohormon. Apikalno producirana IAA (β -indol oacetna kislina, najpomembnejši predstavnik skupine avksinov) se prenaša po bazipetalnem polarnem transportnem sistemu v kambiju in v manjši meri tudi po sitastih celicah prevodnega floema (Savidge, 1996, Uggla in sod., 1996, Kalev in Aloni, 1998, Lachaud in sod., 1999). V nepoškodovanih rastlinah je polarni tok avksina nujen za prostorsko organiziranje prevodnih tkiv ter za vzdrževanje delovanja vaskularnega kambija. Mehanske poškodbe prekinejo polariziran tok signalov, kar povzroči deorganizirano rast kambija (Uggla in sod., 1996, Lachaud in sod., 1999, Sundberg in sod., 2000). Poleg vzpodbujanja mitotske aktivnosti v kambiju, IAA vpliva na diferenciacijo elementov; na ekspanzijo primarne celične stene, debelitev sekundarne stene ter na končno velikost celice (Uggla in sod., 1996). Količina dovedenega IAA uravnava obseg delitev v kambiju (Sundberg in sod., 2000). V starejši literaturi so predpostavljali, da se delitve v kambiju začnejo, ko vsebnost avksina preseže mejno vrednost, produkcija celic pa je v

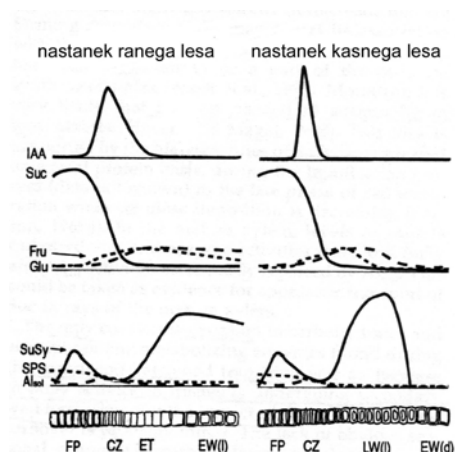
korelaciji s koncentracijo avksina (Uggla in sod., 1998, Lachaud in sod., 1999, Sundberg in sod., 2000). Novejše študije (Sundberg in Little, 1990, Sundberg in sod., 2000, Uggla in sod. 1996, 1998, 2001) intenzivnosti kambijeve aktivnosti ne pripisujejo hormonalni koncentraciji, marveč širini radialnega avksinskega gradienta. Radialna distribucija IAA v kambiju kaže najvišjo vrednost v območju celičnih delitev in strmo upadanje proti ksilemu in floemu (Uggla in sod., 1996). Pozicijski signalni sistem kambijeve celice določi njihovo radialno pozicijo, iz česar se izrazijo določeni geni (Uggla in sod., 1996). Razvoj kambijevih celic naj bi potekal skladno z njihovo pozicijo vzdolž gradienta. Sosednji celični nizi naj bi tako sprejeli enako količino hormonov in se s tem sočasno razvijali (Plomion in sod., 2001). Ustvarjen koncentracijski gradient naj bi tako vplival na diferenciacijo tkiv in organov. Delitev celic v kambiju poteka v središču gradienta, nad mejno koncentracijo IAA. Če se širina radialnega avksinskega gradienta poveča, se s tem poveča tudi število delečih se kambijevih celic. Razlike v širini radialnega koncentracijskega gradienta IAA in ne v koncentracijah med dormantnim in aktivnim kambijem pojasnjujejo konec oziroma začetek celičnih delitev (Uggla in sod., 1996). Rezultati se skladajo s predhodnimi ugotovitvami o povišani stopnji IAA v času dormance (Little, 1981, Savidge in Wareing, 1981, Sundberg in Little, 1990, Eklund in Klintborg, 2000). Za ohranjanje delitev v kambiju je potrebna nenehna oskrba kambija skozi polarni transportni sistem (Sundberg in sod., 2000). Količina IAA v kambijevem območju je povezana z aktivno rastjo poganjkov. Posledica povečane bazipetalne oskrbe kambija z avksinom ob ponovni rasti poganjkov je širša radialna distribucija avksina. Ob obilni oskrbi z avksinom se poveča tudi koncentracija. Radialna širina gradienta je v pozitivni korelaciji s stopnjo kambijeve rasti, kakor tudi s številom delečih se celic v kambiju (Uggla in sod., 1996, 1998, 2001).

Ravno tako zaključka delitev v kambiju ni mogoče preprečiti z eksogeno oskrbo z IAA (Little in Bonga, 1974, Uggla in sod., 2001). Pomembna je občutljivost meristemskih celic na avksin. Odziv kambija na enako koncentracijo avksina variira in od junija do avgusta pada (Lachaud in sod., 1999). Dodajanje avksina na popke mirujočega drevesa ne stimulira kambija. Mirujoče kambijevo obdobje bi tako lahko razlagali kot obdobje neodzivanja kambijevih celic na IAA. Celice lahko po ohladitvi ponovno pridobijo sposobnost občutljivosti na avksin (Lachaud in sod., 1999). Kambijeva občutljivost na avksin je kot kaže neposredno povezana s sposobnostjo kambijevih celic polarnega transporta. Med rastno periodo poteka transport tega hormona preko vmesnih nosilcev v obliki valovanja kot bazipetalni tok. Hitrost tega valovitega toka je odvisna od temperature. S prenehanjem kambijeve aktivnosti ob koncu poletja ali zgodaj jeseni se avksinski transport kvalitativno spremeni. V oktobru in novembru transport postane bolj ali manj difuzen, kar nakazuje na neaktivnost ali izgubo večine avksinskih nosilcev v kambiju. Kambijeva reaktivacija je mogoča samo, če celice znova pridobijo sposobnost polarnega avksinskega transporta (Lachaud in sod., 1999).

Stopnja in trajanje posameznih procesov ksilogeneze določajo morfologijo ksilemskih celic (Whitmore in Zahner, 1966, Skene, 1972, Wodzicki, 1972, Ford in sod., 1978, Sundberg in sod., 2000). Nastanek kasnega lesa naj bi bil rezultat upočasnjene stopnje celičnih delitev, krajšega trajanja in zmanjšane stopnje postkambijske rasti ter daljšega obdobja sinteze sekundarne celične stene (Whitmore in Zahner, 1966, Wodzicki, 1971, Skene, 1972, Ford in sod., 1978, Denne in Dodd, 1981). Prehod iz ranega lesa v kasnega ni

povezan z zmanjšano oskrbo kambijevega področja z IAA, pač pa je v tesni zvezi z zmanjšanjem širine radialne porazdelitve IAA in posledično s povečano koncentracijo IAA v kambiju (slika 22) (Uggla in sod., 2001). Zaključek delitev v kambiju ni povezan z zmanjšanjem koncentracije IAA v tem območju. Zmanjšane radialne dimenzije traheid kasnega lesa niso bile povezane z znižano koncentracijo IAA v območju postkambijske rasti. Prehod iz faze postkambijske rasti v fazo sinteze sekundarne celične stene je bil povezan s strmim padcem koncentracije IAA (Uggla in sod., 1998, 2001, Sundberg in sod., 2000). Zmanjšanje območja postkambijske rasti naj bi bilo v zvezi z zmanjšanjem širine gradienta IAA. Ta spremenjena porazdelitev IAA naj ne bi bila posledica zmanjšanje oskrbe z IAA, pač pa neznanega mehanizma, ki naj bi določal razdaljo med najvišjo vrednostjo IAA v kambiju in mejo gradienta koncentracije.

Poleg avksina je zelo pomembna tudi njegova interakcija z ostalimi fitohormoni, hranljivimi snovmi in vodnim potencialom (Wodzicki, 2001). Koncentracija saharoze, ki sezonsko zelo variira, naj bi tudi vplivala na naravo diferenciacije ksilemskih celic (Savidge, 1996). Največja vsebnost saharoze je bila v floemu, njena koncentracija pa je strmo padla proti kambiju. Gradient saharoze bi lahko priskrbel dodatno informacijo o floemski in ksilemski diferenciaciji (Lachaud in sod., 1999, Plomion in sod., 2001). Najvišje vrednosti fruktoze in glukoze so bile v razvijajočih se traheidah. Aktivnost saharozne sintaze naj bi bila najnižja v območju celic obdanih le s primarno steno, največja pa v območju sinteze sekundarne celične stene. Saharozna sintaza naj bi bila del celulozno sintaznega kompleksa. Potrebna naj bi bila tudi za vzdrževanje biosinteze lignina (Hauch in Magel, 1998). Avtorji (Uggla in sod., 2001) niso zasledili očitnih sezonskih sprememb v razpoložljivosti karbohidratov. Podobno kot predhodni raziskovalci so zaključili, da je nastanek kasnega lesa pod razvojnim in ne metabolnim nadzorom (Whitmore in Zahner, 1966, Skene, 1972, Wodzicki, 1972, 2001). Koncentracijski gradienti topnih sladkorjev v razvijajočem se vaskularnem tkivu kaže, da topni sladkorji ne predstavljajo le energije in sestavine za strukture in shranjevanje, pač pa naj bi bili tudi razvojni regulatorji (Uggla in sod., 2001). V kalusu in strženu je vloga saharoze kot signala za razvoj ksilemskih in floemskih elementov že raziskana. Razmerje med avksinom in saharozo naj bi uravnavalo diferenciacijo v floem ali ksilem. Nasprotni koncentracijski gradienti avksina in saharoze naj bi določali pozicijsko informacijo za razvoj ksilema in floema (Uggla in sod., 2001).



Slika 22: Shematski prikaz porazdelitve avksina, karbohidratov in aktivnosti saharoznih presnovnih encimov v kambiju, diferencirajočih se in zrelih derivatih ranega in kasnega lesa (Uggla in sod., 2001). FP – floemske celice, Suc – saharoza, Fru – fruktoza, Glu – gluktoza, SuSy – saharozna sintaza, SPS – Suc-fosfatna sintaza, Al – kislinska invertaza, FP – floem, CZ – kambij, ET – traheide v postkambijski rasti, EW (I) – traheide ranega lesa v procesu odlaganja sekundarne celične stene in lignifikacije, EW(d) – zrele traheide, LW(I) – traheide kasnega lesa v procesu odlaganja sekundarne celične stene in lignifikacije

2.7.4 Vpliv eksogenih dejavnikov na ksilogenezo

Okolje določa fizikalne pogoje in energijo, ki so potrebni za ksilogenezo. Signali, ki določajo začetek, zaključek in stopnjo posameznih procesov ksilogeneze izvirajo iz okolja. Zunanje dejavnike okolja, ki vplivajo na ksilogenezo in s tem na strukturo lesa, lahko delimo na: dejavnike, ki določajo osnovne razmere za ksilogenezo, (temperatura, voda, hranilne snovi oz. rodovitnost tal, gravitacija, fotoperioda, itd.) in priložnostni dejavniki (veter, požari, zmrzali, poplave, defoliacija, gozdno gospodarjenje, zračna polucija itd.) (Wodzicki, 2001). Veliko študij o vplivih okolja na ksilogenezo je bilo opravljenih na sadikah ali zelo mladih drevesih rastočih v nadzorovanih razmerah. Vplivi izbranih dejavnikov okolja na posamezne procese ksilogeneze pri odraslih drevesih so največkrat posredno pojasnjeni z raziskavami vplivov priložnostnih dejavnikov oziroma s sezonskimi klimatskimi spremembami. V normalnih razmerah dejavniki okolja vzajemno delujejo, kar otežuje študije o vplivih izbranih dejavnikov. Te informacije so navadno pridobljene iz raziskav ksilogeneze in strukture lesa pri drevesih, ki rastejo v gozdnih sestojih, pri združenih vplivih klime, vlažnosti tal, razpoložljivosti hranljivih snovi, gozdnega gospodarjenja in zračne polucije (Wodzicki, 2001). Vpliv določenih klimatskih dejavnikov na debelinsko rast dreves je najizrazitjši na manj ugodnih rastiščih. Omejujoči dejavnik vpliva na začetek konec in dinamiko celične produkcije (Kirdyanov in sod., 2003). Vpliv posameznih dejavnikov na ksilogenezo se med rastno sezono spreminja.

Na širino ksilemskih branik vplivata dinamika in trajanje celičnih delitev v kambiju. Iste drevesne vrste, ki rastejo na različnih rastiščih, se prilagodijo razmeram okolja, kar kaže na njihovo veliko fleksibilnost in plastičnost (Gregory in Wilson, 1968, Alpert in Simms, 2002. Rossi in sod., 2006b). Širina ksilemskih branik pri smreki *Picea glauca* je bila na Aljaski (65°S) in v Novi Angliji (43°S) primerljiva, četudi je bilo trajanje kambijeve aktivnosti na slednjem rastišču daljše (Gregory in Wilson, 1968). Stopnja celičnih delitev v kambiju je bila na Aljaski večja, kar bi lahko pomenilo večje število celic v kambiju ali pa

hitrejše delitve. Začetek kambijeve aktivnosti naj bi bil na obeh ploskvah odvisen od temperatur, saj so se delitve začele po tem, ko je 11 zaporednih dni povprečna temperatura presegla 6°C. Na Aljaski, kjer je kambijeva aktivnost trajala 95 dni, je bilo 80% celotne ksilemske branike oblikovane v 45 dneh, v novi Angliji, kjer je bil kambij aktiven 145 dni, pa v 95 dneh. Smreka na Aljaski se je s hitrejšimi delitvami prilagodila na krajšo rastno sezono (Gregory in Wilson, 1968).

Antonova in Stasova (1993, 1997) sta pri rdečem boru (*Pinus sylvestris*) in sibirskem macesnu *Larix sibirica* na območju osrednje Sibirije raziskali optimalno temperaturo in količino padavin za posamezne faze ksilogeneze. Na celične delitve v kambiju ter na postkambijsko rast celic bora in macesna je vplivala temperatura, zlasti v maju in juniju (na začetku vegetacije), vpliv količine padavin na ta dva procesa pa je bil največji v juliju in avgustu. Na akumulacijo biomase v celične stene skozi celotno vegetacijsko obdobje je vplivala zlasti temperatura. Optimalna temperatura za delitve v kambiju je bila 20-21°C pri obeh vrstah, pri previsokih temperaturah, nad 25°C, je stopnja delitev upadla. Minimalne temperature so bile 11-12°C. Padavine so v manjši meri vplivale na delitve, vendar pa sta na osnovi modelov izračunali optimalno količino padavin: 2 mm/dan. Za postkambijsko rast so bile optimalne temperature 21-23°C z maksimalnimi temperaturami do 27°C in minimalnimi 12-14°C. Padavine v juniju niso vplivale na dinamiko rasti, saj je bila v tleh tedaj še zadostna količina vode. Izračunana optimalna količina padavin naj bi bila 1,4 mm/dan. Postkambijska rast traheid je pri rdečem boru trajala 3-17 dni, odvisno od časovne pozicije celic v drevesu. Na začetku vegetacije je bila rast traheid največja (Antonova in sod., 1995). Za sintezo sekundarne stene je bila optimalna povprečna temperatura nekoliko nižja; 15-17°C z maksimalnimi temperaturami med 21-23°C in minimalnimi med 8-11°C. Odstopanje izven teh meja je povzročilo manjšo stopnjo akumulacije biomase v celično steno (tudi Whitmore in Zahner, 1966). Razlog za krajšo sintezo sekundarne stene pri višjih temperaturah naj bi bilo povezano s pospešeno programirano celično smrtjo. Programirana celična smrt pomembno vpliva na trajanje maturacije in s tem na debelino celične stene (Wodzicki, 1972). Na odlaganje sekundarne stene naj bi imele večji vpliv temperature kot pa količina padavin (izračunana optimalna količina padavin: 2,5 mm/dan). Vendar pa naj bi nadpovprečna količina padavin negativno vplivala na končno količino biomase v celični steni. Prehod iz ranega v kasni les avtorici pojasnjujeta z vodnim stresom zaradi pomanjkanja padavin in izčrpanja vodnih rezerv v tleh.

Horacek in sodelavci (1999) so proučili vpliv temperature, oskrbe z vodo, dolžine dneva, na trajanje in dinamiko ksilogeneze pri navadni smreki *Picea abies* na Češkem. Podrobneje so analizirali ksilemske celice v fazi postkambijske rasti. Temperatura (nad 5°C) je predstavljala najpomembnejši kritični dejavnik na začetku vegetacijskega obdobja. Takrat je bila radialna postkambijska rast v pozitivni korelaciji z naraščajočo temperaturo. Optimalna povprečna temperatura za postkambijsko rast je bila okoli 13°C. Kasneje, v poletnih mesecih, je oskrba z vodo predstavljala omejujoč dejavnik za postkambijsko rast celic. Mejna mesečna količina padavin je bila 100 mm, mejna količina vode v tleh pa 80 mm. Radialna rast celic je bila v pozitivni korelaciji z dolžino dneva, pri čemer je maksimalna stopnja rasti sovpadala s poletnim solsticijem (21. junij). Kambijeva produkcija se je zaključila do jesenskega ekvinokcija (23. september). Traheide ranega lesa

so potrebovale več časa za postkambijsko rast in manj za odlaganje sekundarne celične stene v primerjavami s celicami kasnega lesa (Horacek in sod., 1999).

Trenutno intenzivne študije o vplivu temperature in padavin na kambijevo celično delitveno aktivnost ter diferenciacijo traheid opravljata Deslauriers in Rossi s sodelavci (2003, 2005, 2006) na primeru jelke *Abies balsamea* v borealnih gozdovih Kanade ter na iglavcih *Larix decidua*, *Pinus cembra* in *Picea abies* ob alpski gozdni meji v Italiji. Ob alpski gozdni meji nastajanje branike poteka od sredine maja do konca septembra (Rossi in sod., 2003). Temperatura naj bi bila na tem območju eden najpomembnejših klimatskih dejavnikov, ki vpliva na ksilemsko celično produkcijo. Visoke temperature od maja do junija so povečale celično produkcijo pri vseh proučevanih vrstah iglavcev. Na ekstremnih rastiščih je vegetacijsko obdobje praviloma krajše, branike so ožje in rast drevesa je praviloma omejena predvsem z nizkimi temperaturami (Rossi in sod., 2003). Rastna sezona je pri drevesih borealnih gozdov kratka zaradi nizkih zračnih in talnih temperatur v pomladnih in poletnih mesecih. Deslauriers in Morin (2005) sta pri jelki *Abies balsamea* iz borealnih gozdov Kanade ugotovila enakomerno priraščanje, saj se širina branik med leti ni bistveno spreminjala. Celična produkcija je bila odvisna od minimalnih zračnih in talnih temperatur. Povprečne in maksimalne temperature so imele manjši vpliv na delitve v kambiju. Vpliv temperature je bil večji v obdobju nastajanja ranega lesa. Časovni zamik dni od dneva vzorčenja je zmanjšal korelacijske vrednosti med temperaturo in celično produkcijo, kar naj bi kazalo na hiter odziv kambija na temperaturne spremembe (Deslauriers in Morin, 2005). Kirdyanov in sodelavci (2003) so opisali pomen obdobja taljenja snega za zvišanje talnih temperatur in s tem začetka rastne sezone pri drevesih iz Sibirije.

Rossi in sodelavci (2006b) so izvedli obsežne raziskave o začetku, koncu, trajanju in dinamiki nastanka ksilemske branike pri številnih iglavcih, ki rastejo v hladnih področjih zmernege pasu, v obdobju med 1996-2004. Stopnja maksimalne debelinske rasti je bila ne glede na drevesno vrsto ali rastišče v obdobju solsticija. Fotoperioda izkazuje stanovitnejši signal v primerjavi s temperaturo. Časovno usklajevanje maksimalne stopnje rasti s temperaturno kulminacijo, ki je konec julija, bi za rastline predstavljalo tveganje, saj se zadnje nastale traheide ne bi uspele popolnoma oblikovati. Mäkinen in sodelavci (2003) so na podlagi dendrometrskih meritev in analiz celične produkcije mikroizvrtkov s stereo-mikroskopom zabeležili maksimum debelinske rasti sredi julija. Zamik je najverjetneje posledica neustreznih analiz mikroizvrtkov. Pod stereo-mikroskopom celic v postkambijski rasti, ki so obdane le s tanko primarno steno, in celic v procesu odlaganja sekundarne celične stene ni mogoče jasno videti. Avtorji so najverjetneje šteli le zrele, lignificirane traheide, ki se pojavijo 3 do 4 tedne po začetku delitve v kambiju. Raziskave Rossija in sodelavcev (2006b) kažejo, da so se drevesa, ki rastejo na različnih rastiščih, zelo sposobna prilagajati glede začetka, trajanja, dinamike in zaključka produkcije lesa glede na temperaturo in fotoperiodo. Temperature lahko vplivajo na začetek, konec in dinamiko kambijeve aktivnosti, ne pa na čas maksimalne stopnje celične produkcije, ki naj bi bil vedno v času solsticija (Rossi in sod., 2006b). Drevesa naj bi izkazovala veliko plastičnost in prilagodljivost na okolje, v katerem rastejo (Gregory in Wilson, 1968, Alpert in Simms, 2002, Rossi in sod., 2006b).

Gindl in sodelavci (2000) so pri navadni smreki iz Alp zasledili tesno zvezo med lignifikacijo terminalnih traheid kasnega lesa in temperaturo. Če so bile temperature v septembru in oktobru zelo nizke, ko je potekal razvoj zadnjih nastalih celic, so celične stene vsebovale manj lignina (Gindl in Grabner, 2000, Gindl in sod., 2000).

2.7.5 Vpliv eksperimentalno nadzorovanih razmer na kambijevo aktivnost in celično diferenciacijo

Alternativen način za raziskave vpliva določenih dejavnikov na posamezne procese ksilogeneze so eksperimentalno nadzorovane razmere. Z izpostavitvijo mladih poganjkov, sadik ali delov drevesa nadzorovanim razmeram v obdobju kambijeve aktivnosti ali dormance je mogoče pridobiti dodatne informacije o dejavnikih, ki vplivajo na kambijevo delovanje ter celično diferenciacijo (Little in Bonga, 1974, Denne in Dodd, 1981, Little, 1981, Savidge in Wareing, 1981, Riding in Little, 1984, 1986, Mellerowicz in sod., 1992, Savidge in Barnett, 1993, Barnett in Miller, 1994, Oribe in Kubo, 1997, Oribe in sod., 2001, 2003, 2004, Rensing in Samuels, 2004, Gričar in sod., 2006b). Oribe in sodelavci (Oribe in Kubo, 1997, Oribe in sod., 2001, 2003, 2004) so zasledili razlike v odzivu dormantnega kambija pri različnih vrstah iglavcev na lokalno ogrevanih deblih. Pri macesnu *Larix leptolepis* ogrevanje ni stimuliralo delitev v kambiju pred redno kambijevo aktivnostjo, ki se je pojavila šele po aktivaciji popkov. Pri mladikah smreke *Picea sitchensis* se je kambij reaktiviral v ogrevanih področjih stebra le, če so bile iglice in popki nedotaknjeni (Barnett in Miller, 1994). Pri kriptomeriji (*Cryptomeria japonica*) je ogrevanje vzpodbudilo kambijevo delitveno aktivnost, odziv kambija pa je naraščal s prehajanjem iz zimskega v pomladno obdobje (Oribe in Kubo, 1997). Odziv kambija je bil večji tik pod krošnjo drevesa kot na bazi. Pri jelki *Abies sachalinensis* je ogrevanje vzpodbudilo kambijevo delitveno aktivnost, vendar so se delitve v še vedno ogrevanem kambiju po nekaj dneh ustavile, medtem ko se proces celične diferenciacije sploh ni začel (Oribe in sod., 2003, 2004). Za reaktivacijo kambija je potrebno preseči kritično stopnjo avksina. Intaktni mladi poganjki potrebujejo za reaktivacijo stalno oskrbo avksina iz razvijajočih se popkov (Sundberg in sod., 2000). Endogeni avksin, ki je prisoten v dormantnem kambiju odraslih dreves, včasih zadostuje za kambijevo reaktivacijo (Savidge in Wareing, 1981, Oribe in Kubo, 1997). V nekaterih primerih pa je za reaktivacijo kambija potreben dodatni vir IAA (Oribe in Kubo, 2003). Za ohranjanje delitev v kambiju je potrebna nenehna oskrba kambija skozi polarni transportni sistem (Sundberg in sod., 2000).

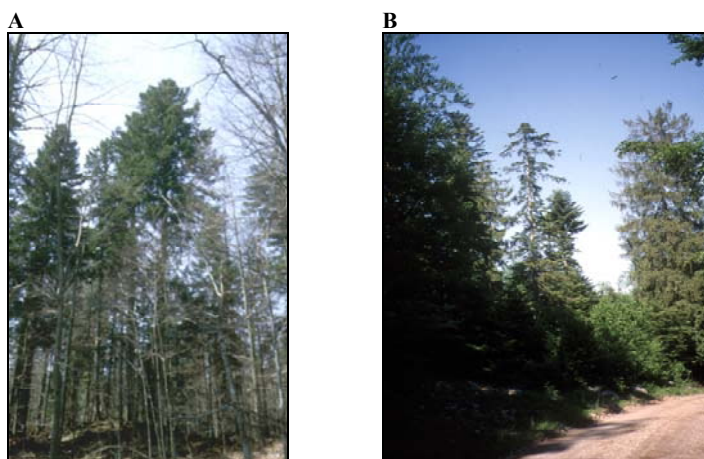
Sadike iglavcev, ki rastejo pri nižjih temperaturah, imajo v lesu debelejšše celične stene od tistih, ki rastejo pri višjih temperaturah (Denne in Dodd, 1981). Radialne dimenzije traheid naj bi bile v pozitivni korelaciji s temperaturo, večji vpliv pa naj bi imele nočne temperature. Denne in Dodd (1981) sta ugotovila, da so se z nadzorovanim ogrevanjem sadik smreke *Picea sitchensis* radialne dimenzije traheid povečale, medtem ko je debelina celičnih sten ostala nespremenjena.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 IZBOR TESTNIH DREVES IN PLOSKEV ZA PROUČEVANJE SEZONSKE DINAMIKE KSILOGENEZE V LETU 2003

3.1.1 Navadna jelka

Poskusna drevesa navadnih jelk (*Abies alba* Mill.) smo izbrali na Ravniku pri Planini, približno 50 km JV od Ljubljane. Ploskev leži na nadmorski višini 500-700 m v valovitem kraškem svetu. Kamninsko podlago sestavljajo dolomiti in apnenec. Kamninsko podlago prekrivajo rendzine in rjava pokarbonatna tla. Gozdno vegetacijo predstavlja dinarsko jelovo bukovje s primesjo javorja in bresta, *Omphalodo-Fagetum* (sin. *Abieti-Fagetum dinaricum*). Na tej ploskvi sodelavci Katedre za tehnologijo lesa že od leta 1988 sistematično opravljajo raziskave in spremljajo stanje izbranih 300-tih testnih jelk. Testna drevesa so odrasla vladajoča ali sovladajoča in zdrava ali različno prizadeta (slika 23). Drevesa so stara približno 150 let s debelnim premerom v prsni višini okrog 50 cm. Glede na oceno zdravstvenega stanja, ki je temeljila na vizualni oceni krošnje in kambijeve električni upornosti, ki je v tesni negativni zvezi s prirastkom, so bila drevesa razvrščena v tri razrede A, B in C (Torelli in sod., 1999). Ocena krošnje je bila opravljena leta 1988, merjenje električne upornosti pa leta 1989. V razredu A so bila uvrščena drevesa z zdravo krošnjo, nizko električno upornostjo in dobrim ksilemskim prirastkom. V razred C so spadala drevesa s prizadeto krošnjo, visoko električno upornostjo in slabim ksilemskim prirastkom. V vmesnem razredu B so bila bodisi drevesa z zdravo krošnjo, visoko električno upornostjo in slabim prirastkom (B1) ali pa drevesa s prizadeto krošnjo, nizko električno upornostjo in dobrim prirastkom (B2). Za pričujočo nalogo smo izbrali 6 navidezno zdravih jelk iz razreda A. V preglednici 2 so navedeni osnovni podatki o drevesih. Pri izboru dreves smo pazili, da so bila čim manj poškodovana zaradi predhodnih vzorčenj in da so rasla čim bolj skupaj, saj smo v njihovi bližini postavili vremensko postajo. Izbrana drevesa so bila namenjena tedenskemu odvzemanju vzorcev intaktnih tkiv tekom rastle sezone 2003 z namenom proučevanja procesa ksilogeneze.



Slika 23: A – Zdrava jelka iz razreda A; B – Prizadeta jelka iz razreda C (Foto: arhiv Katedre za tehnologijo lesa).

Figure 23: A – Healthy silver fir from class A; B – Declining silver fir from class C.

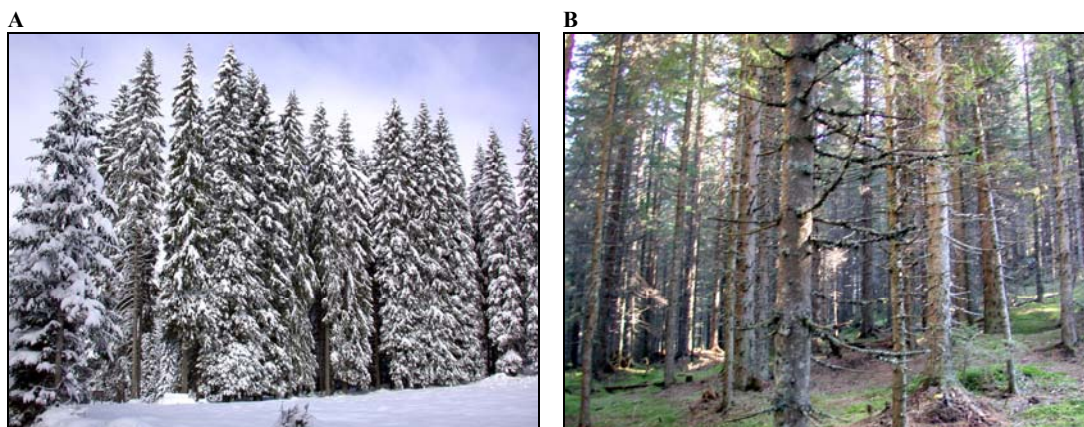
Preglednica 2: Poskusna drevesa z osnovnimi značilnostmi (arhiv Katedre za tehnologijo lesa).

Table 2: Test trees with basic characteristics (archives of Chair of Wood Technology).

številka drevesa	razred	širine branik 1989 [mm]	osutost 1999 [%]
191	A	3,9	10
192	A	3,7	15
193	A	4,5	10
195	A	4,3	25
199	A	5,1	20
208	A	3,3	30

3.1.2 Navadna smreka

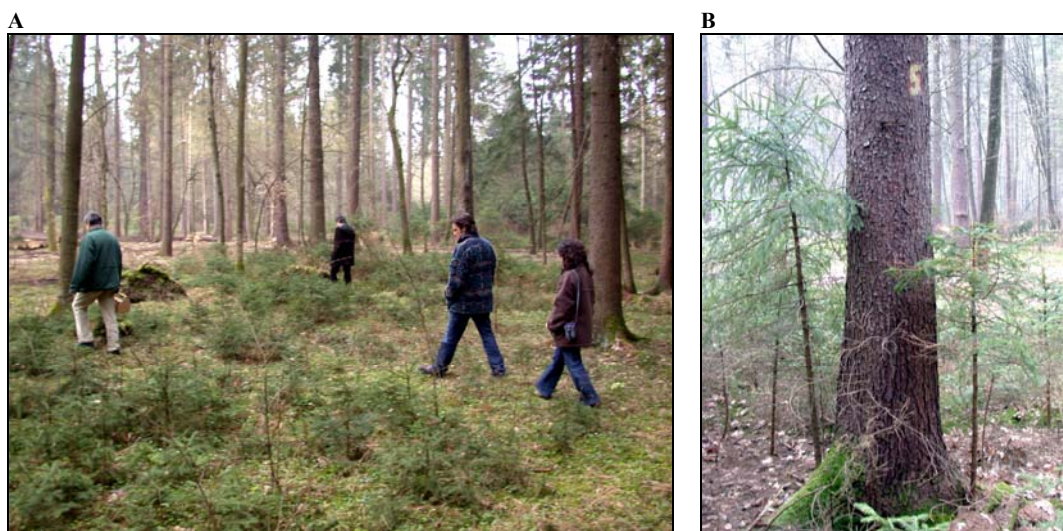
Prva raziskovalna ploskev poizkusnih smrek (*Picea abies* (L.) Karst.) je bila izbrana na Pokljuki (slika 24). Ploskev leži na nadmorski višini 1260 – 1290 m. Visoka nadmorska višina rastišča, nizke zimske temperature in večje količine zapadlega snega vplivajo na dolžino vegetacijske dobe smreke na izbranem rastišču. Sestoji so zasenčeni. Tla so srednje kislata. Mrzlične razmere prevladajo nad ostalimi ekološkimi faktorji in ustvarjajo posebne razmere za rast smrekovih gozdov z acidofilnimi zeliščnimi in mahovnimi vrstami, ki slabšajo kvaliteto tal. Za rastišče je značilna vitka izrast smreke, z gostimi tankimi in povešenimi vejami (slika 24). Les je zdrav in dobre kakovosti, le v nekaterih sekundarnih oblikah sestoji se pojavlja rdeča trohnoba. Izbrano rastišče je dokaj ekstremno za drevesa smreke (Zavod za gozdove Slovenije, GGO Bled, GE Pokljuka). Gospodarsko upravljani sestoji spadajo v *Piceetum subalpinum*. Za poizkus je bilo izbranih 11 soraslih dreves (5 za pining in 6 za odvzemanje intaktnih vzorcev) s premerom v prsni višini med 27 in 30 cm in višino med 26 in 28 m. Drevesa so bila centrična in niso imela vidnih mehanskih poškodb na deblu in koreninah ter odlomljenih vrhov. Osutost krošnje je bila pod 30%. Starost dreves je bila ocenjena na 70 let. Drevesa za metodo pining smo označili s številkami od 1 do 5, za vzorčenje intaktnih tkiv pa od 7 do 12.



Slika 24: A – Gozdovi navadne smreke na Pokljuki; B – Rastišče, na katerem so bila izbrana vzorčna drevesa (Foto: M. Zupančič).

Figure 24: A – Norway spruce forests at Pokljuka; B – Growth site where test trees were selected.

Druga ploskev testnih smrek je bila izbrana na Sorškem polju (350 m n.m.). Za rastišče je značilen nadpovprečno visok delež umetno nasajene smreke. Samo rastišče na nanosih reke Save ni primerno za smreko in je podvrženo velikim sezonskim nihanjem količine vode v tleh, ki povzroča vodni stres, zlasti v drugi polovici rastne sezone (slika 25). Za rastišče je značilna rdeča trohnoba in prizadetost dreves z lubadarjem. Sestoji so zasenčeni. Zgornji del tal je zaradi smrek zakisan. Za sestoj je značilno kmečko gospodarjenje. Za poizkus je bilo izbranih 11 soraslih dreves (5 za pining in 6 za odvzem intaktnih vzorcev) s premerom v prsni višini med 33,5 in 40,5 cm in višino med 27 in 32 m. Drevesa so bila centrična in niso imela vidnih mehanskih poškodb na deblu in koreninah ter odlomljenih vrhov. Osutost krošnje je bila pod 30%. Starost dreves je bila ocenjena na okrog 70 let. Drevesa za metodo pining smo označili s številkami od 1 do 5, za vzorčenje intaktnih tkiv pa od 1 do 6 (slika 25).



Slika 25: A – Sestoj navadne smreke na Sorškem polju; B – Eno izmed vzorčnih dreves (Foto: M. Zupančič).

Figure 25: A – Norway spruce stand at Sorško polje; B – One of the test trees.

3.2 VZORČENJE

Za raziskave sezonske dinamike kambijeve aktivnosti in nastanka ksilemske branike pri navadni jelki in navadni smreki v rastni sezoni 2003 smo izbrali metodo odvzema majhnih vzorcev intaktnih tkiv. Dodatno smo pri navadni smreki uporabili tudi metodo pining. Ta del raziskav je potekal v okviru projekta PINE.

3.2.1 Metoda odvzema intaktnih vzorcev tkiv

Intaktne vzorce tkiv smo v tedenskih intervalih odvezemali iz živih dreves v prsni višini (1,3 m nad tlemi) tekom celotnega vegetacijskega obdobja 2003, t.j. od konca aprila do konca oktobra oziroma najdlje do sredine novembra. Odvzeti vzorci ($1 \times 1 \times 3 \text{ cm}^3$) so zajemali najmlajši del žive skorje, kambij in največ dve ksilemski braniki (slika 27).

Datumi odvzemov intaktnih tkiv vzorcev in izvajanja metode pinning so prikazani v preglednici 3.

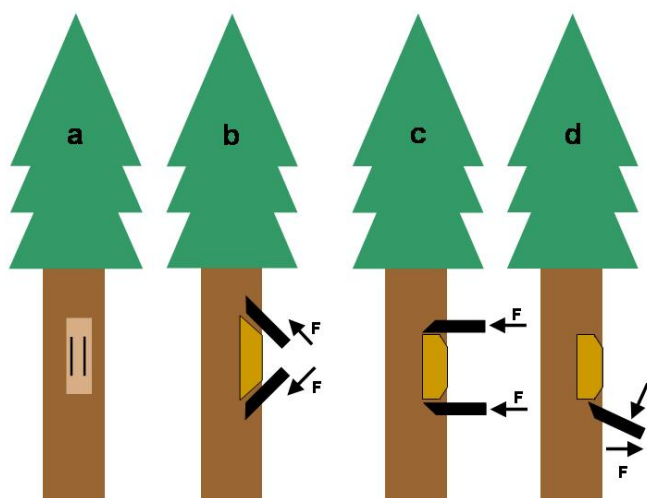
Preglednica 3: Datumi vzorčenja (odvzem intaktnih vzorcev in pinning) iz dreves na Ravniku, Sorškem polju in Pokljuki v rastni sezoni 2003.

Table 3: Date of sampling (intact tissues and pinning) from trees at Ravnik, Sorško polje and Pokljuka in the growing season 2003.

Odvzem	NAVADNA JELKA	NAVADNA SMREKA	
	RAVNIK Datum	SORŠKO POLJE Datum	POKLJUKA Datum
1	23.04.2003	25.04.2003	
2	30.04.2003	02.05.2003	
3	07.05.2003	09.05.2003	09.05.2003
4	14.05.2003	16.05.2003	16.05.2003
5	21.05.2003	23.05.2003	23.05.2003
6	28.05.2003	30.05.2003	30.05.2003
7	04.06.2003	06.06.2003	06.06.2003
8	11.06.2003	13.06.2003	13.06.2003
9	18.06.2003	20.06.2003	20.06.2003
10	25.06.2003	27.06.2003	27.06.2003
11	02.07.2003	04.07.2003	04.07.2003
12	09.07.2003	11.07.2003	11.07.2003
13	16.07.2003	18.07.2003	18.07.2003
14	23.07.2003	25.07.2003	25.07.2003
15	30.07.2003	01.08.2003	01.08.2003
16	06.08.2003	08.08.2003	08.08.2003
17	13.08.2003	15.08.2003	15.08.2003
18	20.08.2003	22.08.2003	22.08.2003
19	27.08.2003	29.08.2003	29.08.2003
20	03.09.2003	05.09.2003	05.09.2003
21	10.09.2003	12.09.2003	12.09.2003
22	17.09.2003	19.09.2003	19.09.2003
23	24.09.2003	26.09.2003	26.09.2003
24	01.10.2003	03.10.2003	03.10.2003
25	08.10.2003	10.10.2003	10.10.2003
26	15.10.2003	17.10.2003	17.10.2003
27	22.10.2003	24.10.2003	24.10.2003
28	29.10.2003	31.10.2003	
29	05.11.2003	07.11.2003	
30	12.11.2003	14.11.2003	
31	19.11.2003		

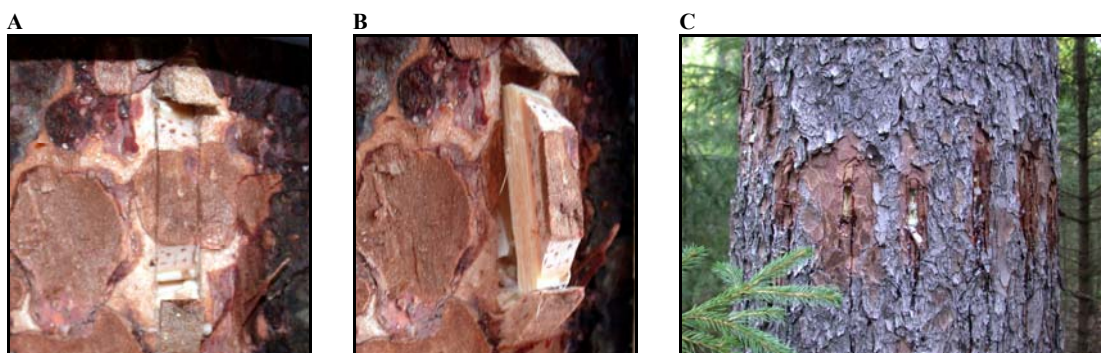
Na Pokljuki smo z odvzemanjem vzorcev pričeli kasneje in končali prej kot na Sorškem polju in Ravniku, saj smo predpostavili, da je tam zaradi višje nadmorske višine vegetacijsko obdobje krajše. Za odvzem vzorcev smo uporabili Olfa nož, dleta in kladivo. S širokim dletom smo najprej na mestu odvzema odstranili ritidom in starejši del žive skorje (slika 26A). Nato smo z ostrim nožem v vertikalni smeri dvakrat globoko zarezali v tkivo. Reza sta bila med seboj pravokotna in oddaljena za 1 cm. Z ožjim dletom in kladivom smo zasekali v tkivo v horizontalni smeri (slika 26B). Vzoredna reza sta bila

med seboj oddaljena 2-3 cm (slika 26C). Vzorec smo na koncu previdno s pomočjo dleta izvlekli iz drevesa (slika 26D in 27). Ker kambijevo območje predstavlja mehansko zelo šibko mesto, smo pri odvzemu vzorcev pazili, da tkiva nismo tlačili. S tem bi lahko porušili tkivo kambija in nastajajočega lesa ter skorje. Nevarnost za to je bila zlasti velika na začetku in višku vegetacije, ko je bilo območje teh tkiv zelo široko. Intaktne vzorce smo jemali po celotnem obodu drevesa (slika 27) in pazili, da je bila razdalja med sosednjimi vzorci vsaj 10 cm, da novi vzorec ne bi vseboval travmatskih smolnih kanalov in poranitvenega lesa, ki so nastali kot odziv kambija na mehansko poškodbo ob odvzemu sosednjega vzorca.



Slika 26: Shematski prikaz odvzema intaktnih vzorcev tkiv: A – Odstranitev odvečnega ritidoma in najstarejšega dela žive skorje, vertikalna vzporedna reza z Olfa nožem; B – Horizontalna vzporedna zaseka z dletom pod kotom približno 45°; C – Horizontalna zaseka z dletom pod pravim kotom; D – S strižno silo smo ločili vzorec od preostalega tkiva in ga izvlekli iz debla. Velikost vzorca je bila 1 x 1 x 3 cm³.

Figure 26: Schematic diagram of sampling of intact tissue: A – Removal the excess of rhytidome and the oldest part of living bark; parallel cuts in vertical direction using a sharp knife; B – Parallel cuts in horizontal direction at angle of 45° using a sharp chisel; C - Parallel cuts in horizontal direction at angle of 90° using a sharp chisel; D – Removal of the sample from a tree stem. Sample size was 1 x 1 x 3 cm³.



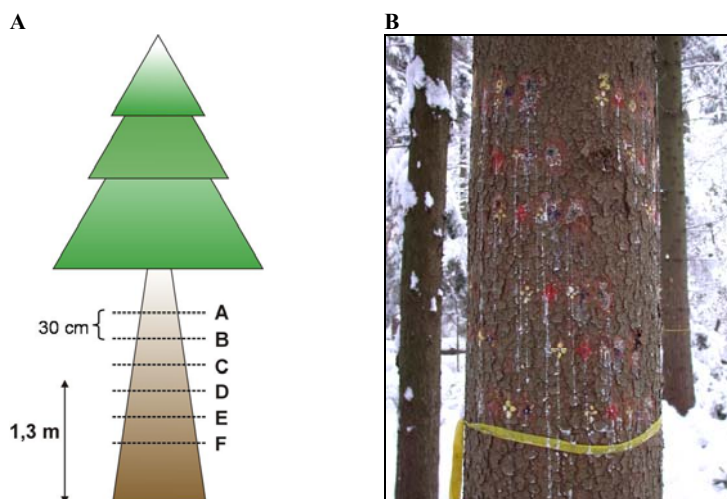
Slika 27: A – Vzorec tik pred odvzemom iz debla drevesa; B – Vzorec ločen od preostalega tkiva; C – Prikaz razporeditve vzorčenja po obodu drevesa (Foto: M. Zupančič).

Figure 27: A – Sample just before removal from tree stem; B – Sample separated from the remaining tissue; C – Arrangement of the sampling around the stem circumference.

Na terenu smo takoj po odvzemu iz drevesa vzorce shranili v označeni prahovki s fiksacijsko tekočino FAA (500 ml FAA vsebuje 25 ml 37% formalina, 450 ml 50% etanola, in 25 ml 100% očetne kisline) ter jih prinesli v laboratorij za nadaljnjo obdelavo za pripravo trajnih anatomskih preparatov prečnih prereзов.

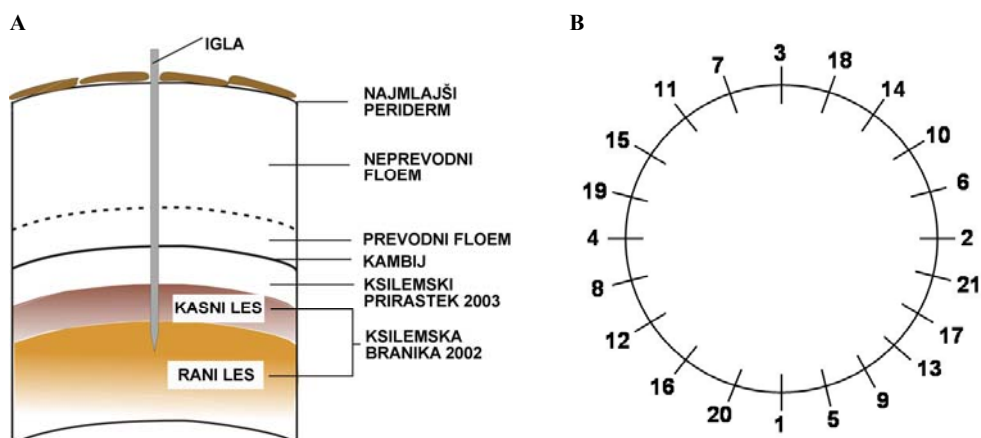
3.2.2 Metoda pining

Eksperiment pining smo izvajali v tedenskih intervalih v rastni sezoni 2003 (slika 28 in 29). Pining smo izvedli na isti dan kot odvzemanje intaktnih vzorcev tkiv (preglednica 3). Na vsakem drevesu smo najprej označili 6 nivojev (A, B, C, D, E in F), na katerih smo v nadaljevanju poskusa z iglo zabadali v drevesa. Posamezni nivoji na drevesih so bili med seboj oddaljeni približno 30 cm in razporejeni, kot je prikazano na spodnji sliki 27A. Vbodi posameznega nivoja so bili med seboj odmaknjeni približno 3 cm, s čimer smo poskušali izključiti vpliv ranitvenih odzivov sosednjih vzorcev. Tedensko smo smo na vsakem drevesu naredili 6 poškodb z iglo premera 1,75 mm (slika 28B). Pred vsakim vbodom smo z dletom odstranili del ritidoma oziroma mrtvega dela skorje. Igla je prodrla skozi preostali del ritidoma, ličje, kambij ter ksilemski prirastek nastal v letu 2003 do trenutka vboda (slika 29A). Vbode smo označili s 4 barvami (modro, rumeno, rdečo in zeleno), da smo jih lažje ločili (slika 29B). Vbodi so bili na prečnem prerezu debla razporejeni, kot kaže slika 29. Vsak naslednji vbod smo zamaknili za četrtnino debla v nasprotni smeri urinega kazalca. V nalogi smo raziskali nastajanje ksilemske branike pri vzorcih nivoja C. V primerih, ko so bile anatomske strukture preiskovanih vzorcev nejasne, smo uporabili vzorce enega izmed preostalih 5 nivojev (A, B, D, E in F). Vsa poskusna drevesa določena za pining smo po zaključku vzorčenja posekali, saj smo na njih opravili še druge analize v okviru projekta PINE. Pri poseku so sodelovali kolegi iz Finske in Gozdarskega inštituta Slovenije. Material smo pripeljali v mizarsko delavnico Oddelka za lesarstvo, kjer smo ga v nadaljevanju obdelali.



Slika 28: Metoda pining: A – Shematski prikaz nivojev vbodov z iglo. B – Označena mesta vbodov z različnimi barvami (Foto: M. Zupančič).

Figure 28: Pinning method: A – Schematic representation of the pinning levels in one tree. B – Pinning hoels marked with different colours.

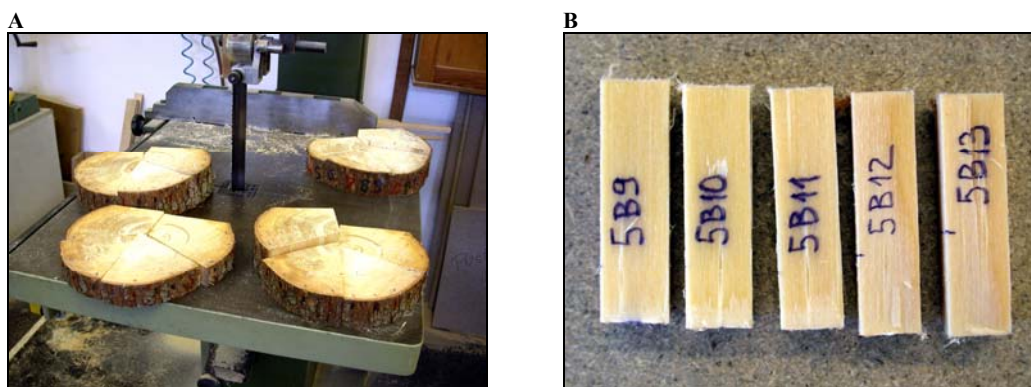


Slika 29: Metoda pinning: A – Shematski prikaz z iglo prebodenih tkiv v prečnem prerezu. B – Shematski prikaz razporeditve vbodov v prečnem prerezu debla. Zaporedne številke ustrezajo datumom v preglednici 3.

Figure 29: Pinning method: A – Schematic diagram of the punctured tissues with the needle in the cross-section of a stem. B – Scheme of the arrangements of the pinning holes in the cross-section. Successive numbers correspond to the dates showed in table 3.

3.2.2.1 Priprava vzorcev iz eksperimenta pinning v delavnici

Del debla, na katerem so bili razvrščeni vbodi, smo v mizarski delavnici Oddelka za lesarstvo razžagali na kolute s tračno žago (slika 30A). Sledilo je žaganje kolotov v radialni smeri. Z dletom smo posamezni vzorec širine 1 cm (tangencialne dimenzije) ločili od koluta tako, da je le-ta vseboval zadnje tri ksilemske branike, kambij in najmlajši del žive skorje (slika 30B). Vsak vzorec smo na strani lesa s tintnim svinčnikom označili. Dobljene vzorce ($1 \times 1 \times 2 \text{ cm}^3$) smo obdelali še na krožni žagi in jih ustrezno označili ter shranili v označenih prahovkah s fiksacijsko tekočino FAA. V nadaljevanju smo v laboratoriju pripravili trajne anatomske preparate prečnih prerezov.



Slika 30: Priprava vzorcev lesa iz eksperimenta pinning. A – Razrez dela debla na kolute; B – Označeni vzorci (Foto: M. Zupančič).

Figure 30: Preparing of wood samples from pinning experiment. A – Cutting stem part into discs; B – Marked samples.

3.3 PRIPRAVA TRAJNIH PREPARATOV ZA SVETLOBNO MIKROSKOPIJO Z DRSNIM MIKROTOMOM

Po enem tednu smo fiksirane intaktne vzorce in vzorce pining pričeli dehidrirati v etanolni vrsti (30%, 50% in 70%). V vsaki raztopini so bili vzorci 5 do 7 dni. Ko so bili vzorci intaktnih tkiv v 50% alkoholu, smo z britvico odstranili odvečni del kolabiranega floema in starejše branike ksilema. V delavnici smo s krožno žago odrezali poševni del količka na vsaki strani, tako da je imel vzorec na koncu obliko kvadra. Intaktne vzorce tkiv smo trajno shranili v označenih 15 ml penicilinkah v 70% etanolu (slika 31). Vzorce pining smo trajno shranili v označenih prahovkah v 70% etanolu. Z drsnim mikrotomom Leica SM 2000R smo z jeklenimi noži odrezali 25 µm debele prečne rezine. Temu je sledilo barvanje s safraninom (0,5% v 95% etanolu) in astra modrim (0,5% v 95% etanolu), ki različno obarvata celice v različnih fazah ksilogeneze. Rezine smo pustili najmanj 10 minut v safraninu, ki rdeče obarva polifenolne komponente, kot je lignin, nato smo jih sprali s 95% etanolom. Z astra modrim, ki obarva predvsem celulozne komponente celične stene, smo rezine barvali največ 30 sekund zaradi agresivnosti barvila. Sledilo je spiranje rezin s 95% etanolom, dokler nismo odstranili odvečno barvilo. Rezine smo prenesli na objektno steklo, prepajali z vklopnim medijem Euparal, prekrili s krovnim steklom, odstranili mehurčke ulete v vklopnem mediju ter preparate obtežili z 200 g kovinskimi utežmi in pustili vsaj 24 ur, da se je smola strdila. Trajne preparate prečnih prerezov smo označili enako kot ustrezne vzorce.



Slika 31: Trajno shranjeni intaktni vzorci tkiv v penicilinkah v 70% etanolu (Foto: M. Zupančič).

Figure 31: Permanent preservation of the samples of intact tissues in 70% of ethanol.

3.4 ANALIZA SLIKE

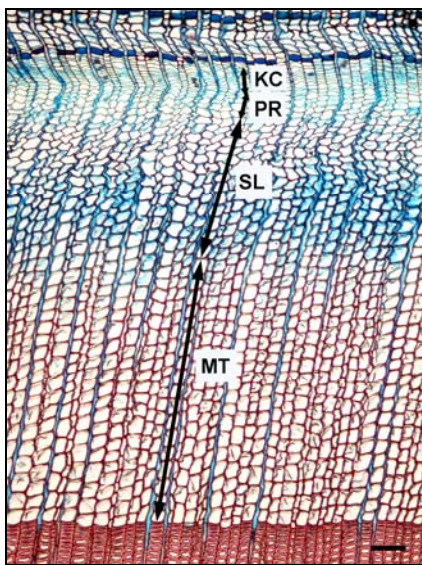
Vse potrebne histometrične analize smo opravili s sistemom za analizo slike sestavljenem iz svetlobnega mikroskopa Nikon Eclipse E800, digitalne kamere (PIXElink, PL-A66Z Camera kit), osebnega računalnika ter programa za analizo slike Lucia G 4.8. Uporabljali smo presežno mikroskopijo in polarizirano svetlobo. Za meritve smo uporabili objektivne z 1x, 2x, 4x, 10x, 20x in 40x povečavo. Analiza slike slikovne informacije spremeni v numerične (Levanič, 1999). Sistem nam je omogočal, da smo potrebne analize opravili na neposreden način, na t.i. »živi sliki«. Preparato smo namestili na objektno mizo mikroskopa. Z zajemom željenega področja preparata s kamero smo na računalniškem zaslonu dobili živo sliko. Ob vsaki spremembi pozicije področja na preparatu nameščenem na objektni mizi mikroskopa se je istočasno spremenila tudi slika na ekranu. Pred meritvami smo razdalje na zaslonu umerili oziroma kalibrirali s standardnim merskim sistemom (cm, mm in µm) za vsak posamezen objektiv. Za lažje štetje celic in merjenje

debelinskega prirastka smo po potrebi med delom na mikroskopu spreminjali osvetlitev in globinsko ostrino slike. Program Lucia G 4.8. nam je omogočal poljubne nastavitve kontrasta, svetlosti in deleža rdeče, zelene oziroma modre barve (sistem RGB) na ekranu. Z obračanjem kamere oziroma merilne mize smo lahko nastavili optimalno mesto za merjenje in štetje ksilemskega prirastka. Vse meritve so smo shranili v tekstovne datoteke (.txt) poimenovane z ustreznimi kraticami. Rezultate meritev smo v nadaljevanju prenesli v program Microsoft Excel in jih obdelali. Za statistične analize smo uporabili program Statgraphics.

3.5 HISTOMETRIČNE ANALIZE

3.5.1 Vzorci intaktnih tkiv

Histometrične raziskave smo opravili na najkvalitetnejši rezini na preparatu, kjer smo v nastajajoči ksilemski braniki 2003 prešteli vse celice v posameznih fazah ksilogeneze: kambijeve celice (KC), traheide v postkambijski rasti (PR), traheide v procesu sinteze sekundarne celične stene in lignifikacije (SL) ter zrele traheide (MT) (slika 32). Analize smo opravili v treh radialnih nizih vsakega preparata in nato izračunali povprečje. Celice v različnih razvojnih fazah smo določili na osnovi selektivnega obarvanja z barviloma safranin in astra modro ter z uporabo polarizirane svetlobe. Kambijeve celice in ksilemske celice v fazi postkambijske rasti smo identificirali po modro obarvanih, primarnih celičnih stenah ter citoplazmi v celičnih lumnih. Začetek sinteze sekundarne celične stene smo določili s pomočjo polarizirane svetlobe. Rdeče obarvane celične stene in prazni lumni so bili značilni za zrele odmrle traheide (slika 32).



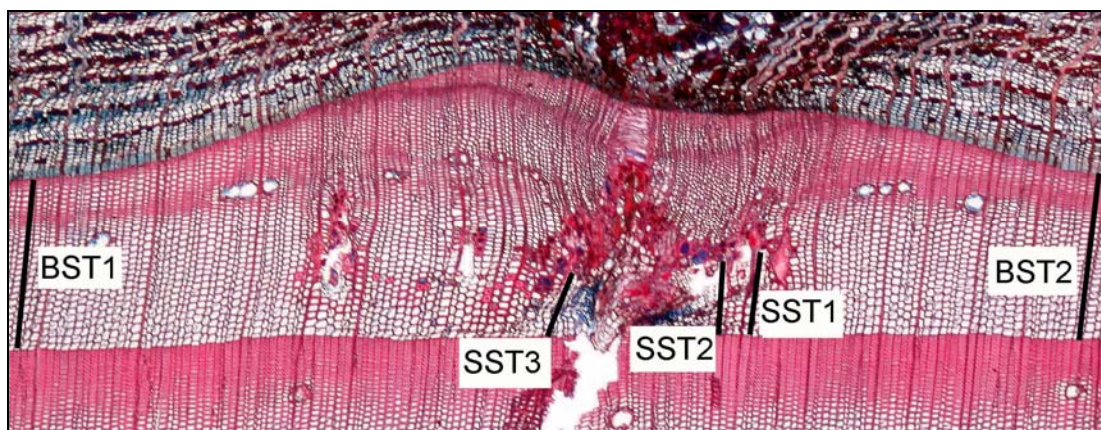
Slika 32: Posamezne faze ksilogeneze na prečnem prerezu. KC – kambijeve celice; PR – traheide v fazi postkambijske rasti; SL – sinteza sekundarne celične stene in lignifikacija; MT – zrele traheide. Daljica = 100 μ m

Figure 32: Individual phases of xylogenesis on cross-section. KC – cambial cells; PR – tracheids in phases of postcambial growth; SL – synthesis of the secondary cell wall and lignification; MT – mature tracheids. Scale bars = 100 μ m

3.5.2 Pining

Anatomski znaki nastali pri vbodu igle v različnem času rastne sezone so služili za postavitve kriterijev za histometrične analize. Za določitev ksilemskega prirastka nastalega do trenutka vboda z iglo smo merili in šteli celice v fazi diferenciacije (t.j. celice v postkambijske rasti in celice v fazi odlaganja sekundarne celične stene ter lignifikacije) in popolnoma oblikovane traheide (slika 33). V meritve nismo vključili kambijevih celic z ozkimi radialnimi dimenzijami, ki so se nahajale v kalusu. Prešteli smo samo ohranjene ostanke ksilemskih celic, ne pa kalusnih celic. Če so bili izbrani nizi poškodovani ali prekinjeni oziroma so bile v njih razne anomalije, smo pri štetju pomagali s celicami v sosednjih radialnih nizih. Vendar pa smo analize opravili v istem radialnem nizu, dokler je bilo mogoče. V drugi polovici rastne sezone je mejo nastalega ksilemskega prirastka do trenutka vboda predstavljal tudi prekinjen pas kasnega lesa.

Za raziskave nastajanja sezonske dinamike ksilemske branike v rastni sezoni 2003 smo pri preiskovanih smrekah iz Pokljuke in Sorškega polja prešteli ksilemski prirastek nastal do trenutka poškodbe drevesa z iglo ter celotno ksilemsko braniko, nastalo v rastni sezoni 2003 levo in desno od kalusa. Ksilemski prirastek smo izrazili kot število aksialnih traheid v radialnem nizu (slika 33). V celotni ksilemski braniki 2003 smo prešteli ksilemske celice v dveh radialnih nizih. Radialna niza smo izbrali na robovih preparata, s čimer smo se izognili nenormalno povečanem prirastku v neposredni bližini igelnega kanala nastalega ob poškodbi. Ksilemski prirastek 2003, ki je nastal do dneva vboda z iglo, smo prikazali kot število celic. Šteli smo celice v radialnih nizih aksialnih traheid med kalusom in terminalnimi traheidami kasnega lesa branike 2002. Prešteli smo vsaj enega in največ štiri radialne nize celic (slika 33).



Slika 33: Prikaz analiziranih mest in znakov na vzorcu; BST1, BST2 – število nastalih celic v braniki 2003; SST1, SST2, SST3 – število nastalih celic do datuma vboda.

Figure 33: Representation of the analysed locations and symbols in the sample; BST1, BST2 – no. of the formed cells in the xylem growth ring 2003; SST1, SST2, SST3 – no. of the formed xylem cells till the date of pinning.

3.6 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV IN UPORABA GOMPERTZOVE FUNKCIJE

3.6.1 Vzorci intaktnih tkiv

Pri vsakem vzorcu smo izračunali povprečno število celic v posamezni fazi ksilogeneze (X_i) branike 2003 iz treh radialnih nizov (slika 32):

$$X_i = \frac{\sum_{j=1}^n x_{ij}}{n} \dots 2 \leq n \leq 3 \quad (1)$$

pri čemer x predstavlja posamezno fazo ksilogeneze, i datum vboda in zajema vrednosti od 1 do 31 (Ravnik) ali 30 (Sorško polje) ali 25 (Pokljuka), n zajema število meritev posamezne faze ksilogeneze (kambijeve celice, postkambijska rast, sinteza sekundarne stene in lignifikacija ter zrele traheide), j pa zaporedno meritev na posameznem vzorcu.

Skupno število nastalih celic (Y_i) v braniki 2003 smo dobili tako, da smo za vsak datum sešteli povprečno število celic v posamezni fazi diferenciacije (X_i):

$$Y_i = \sum_{i=1}^n X_i \quad (2)$$

pri čemer (X_i) predstavlja povprečno število ksilemskih celic branike 2003 v posamezni fazi diferenciacije (postkambijska rast, sinteza sekundarne celične stene in lignifikacije ter zrele traheide), i datum vboda in zajema vrednosti od 1 do 31 (Ravnik) ali 30 (Sorško polje) ali 25 (Pokljuka), n število faz diferenciacije.

3.6.2 Pining

Z analizami smo za vsak vzorec pridobili podatek o številu celic (SST_i) nastalih od začetka delitev v kambiju do dneva vboda (slika 33). Podobno smo določili število celic (BST_i) v celotni ksilemski braniki 2003 distalno od kalusa za vsak posamezen vzorec.

Pri vsakem vzorcu smo izračunali povprečno število celic (BST_i) v braniki 2003:

$$BST_i = \frac{BST_{1_i} + BST_{2_i}}{2} \quad (3)$$

pri čemer i predstavlja datum vboda in zajema vrednosti od 1 do 30 (Sorško polje) ali 25 (Pokljuka), kjer 1 ustreza datumu začetka kambijeve aktivnosti, 30 (Sorško polje) ali 25 (Pokljuka) pa datumu zadnjega vboda v letu 2003.

Izračunali smo povprečno število celic prirastka (SST_i) 2003 od začetka kambijeve aktivnosti do datuma ranitve (povprečje največ štirih meritev) vsakega vzorca:

$$SST_i = \frac{\sum_{j=1}^n SST_{ij}}{n} \quad 1 \leq n \leq 4 \quad (4)$$

pri čemer i predstavlja datum vboda in zajema vrednosti od 1 do 30 (Sorško polje) ali 25 (Pokljuka), kjer 1 ustreza datumu začetka kambijeve aktivnosti, 30 (Sorško polje) ali 25 (Pokljuka) pa datumu zadnjega vboda v letu 2003, n zajema število meritev na mestu vboda in j zaporedno meritev na posameznem vzorcu.

Podatke smo preračunali v programu Microsoft Excel. V tem programu smo narisali tudi različne krivulje prikazov sezonske dinamike kambijeve aktivnosti.

3.6.3 Gompertzova funkcija

Za vsa tri rastišča smo izdelali modelno krivuljo nastanka ksilemske branike 2003. Vse statistične izračune smo opravili v programu Statgraphics. Za izdelavo modela smo uporabili Gompertzovo funkcijo (Zeide, 1993, 2004, Deslauriers in sod., 2003a, b, Rossi in sod., 2003):

$$y = A \exp(-\exp(B - k * t)) \quad (5)$$

kjer je y tedenska kumulativna vsota celic, t so Julijanski dnevi, kjer je 1. januar – 1. dan in 31. december – 365. dan, A zgornja asimptota in predstavlja maksimalno število celic, B mesto na osi x in oceni začetek kambijeve aktivnosti ter k mesto prevoja krivulje.

Preračunavanje izmerjenih tedenskih prirastkov in uporaba različnih funkcij, ki se prilegajo biološkemu trendu sezonske rasti drevesa, skušajo odpraviti variabilnosti v številu celic oziroma širini znotraj iste branike ter s tem ustrezno oceniti ksilemski razvoj posameznega drevesa oziroma izbranega rastišča tekom rastne sezone (Rossi in sod., 2003, Deslauriers in sod., 2003a, b, Deslauriers in Morin, 2005). Nastanek ksilemske branike je mogoče opisati z različnimi funkcijami (logistična, Weibullova, monomolekularna, Korfova, Richardsova itd.), vendar pa se je Gompertzova funkcija izkazala za najustreznejšo zaradi asimetrične oblike (Zeide, 1993, 2004, Camarero in sod., 1998, Deslauriers in sod., 2003a, b, Mäkinen in sod., 2003, Rossi in sod., 2003).

Za vse tri ploskve smo določili mesto prevoja posameznih modelnih krivulj. Prevoj Gompertzove funkcije se ujema z maksimalno vrednostjo prvega odvoda funkcije y' :

$$y' = A k \exp(-\exp(B - k * t)) \exp(B - k * t) \quad (6)$$

kjer je y tedenska kumulativna vsota celic, t datum, A zgornja asimptota in predstavlja maksimalno število celic, B mesto na osi x in oceni začetek kambijeve aktivnosti ter k mesto prevoja krivulje. S prvim odvodom Gompertzove funkcije smo izračunali dnevni

prirastek celic v vsakem tednu, s čimer smo dobili podatek o stopnji debelinske rasti za vsako rastišče.

Pri maksimalni vrednosti prvega odvoda y' je drugi odvod $y'' = 0$:

$$y'' = y'k (\exp(B - k * t) - 1) = 0 \quad (7)$$

Gompertzova funkcija ima prevoj tipa »S«, zato y'' preide iz pozitivnih vrednosti na negativne.

Drugi odvod y'' je enak 0 pri

$$t = B/k \quad (8)$$

kjer je t mesto prevoja na horizontalni osi in predstavlja obdobje maksimalne celične produkcije.

Iz parametra k Gompertzove funkcije, ki določa dinamiko rasti, smo izračunali čas d , ki je bil potreben za nastanek glavnine ksilemske branike 2003 pri drevesih na posameznem rastišču po formuli:

$$d = 4/k \quad (9)$$

kjer k predstavlja mesto prevoja krivulje.

3.7 KLIMATSKI PODATKI

Na rastišču Ravnik smo v neposredni bližini proučevanih dreves na začetku vegetacijskega obdobja 2003 postavili vremensko postajo (Davis Vantage Pro Radio-Kit). Postaja je bila sestavljena iz LCD prikaza z anteno, iz nosilca z zbiralnikom dežja in s senzorjem temperature in vlage ter iz anemometra z nosilcem in sončnim panelom za napajanje (slika 34). Vremenska postaja je tekom celotnega vegetacijskega obdobja beležila klimatske parametre: temperatura, padavine, relativna zračna vlažnost, hitrost vetra, smer vetra, zračni tlak itd. Program smo nastavili tako, da so se podatki beležili vsako uro. Vsake tri tedne smo podatke iz postaje prenesli na prenosni računalnik. V laboratoriju smo jih iz programa Weatherlink 53 izvozili v program Microsoft Excel in jih obdelali. Potrebne klimatske podatke za leto 2003 za rastišči Pokljuka in Sorško polje smo kupili od Meteorološkega zavoda Slovenije. Podatki za Sorško polje so bili iz Brnika, ki je 2 km oddaljen od poskusnih dreves. Podatki za Pokljuko so bili zajeti s klimatsko postajo na Rudnem polju, ki je 2 km oddaljeno od testne ploskve. Iz dobljenih podatkov smo v programu Microsoft Excel izračunali povprečne, maksimalne, minimalne dnevne temperature ter dnevno količino padavin.



Slika 34: Vremenska postaja Davis postavljena na Ravniku (Foto: M. Zupančič).

Figure 34: Weather station Davis at Ravnik.

3.7.1 Analiza posameznih klimatskih parametrov in ksilemskega prirastka

Za proučitev zveze med temperaturnimi parametri, padavinami in ksilemskim prirastkom 2003 na izbranih treh rastiščih smo uporabili enačbo linearne regresije. Izračunali smo korelacijske koeficiente med dejanskim povprečnim tedenskim prirastkom in vremenskimi spremenljivkami, kot so: povprečna tedenska temperatura zraka (T_{pov}), povprečna minimalna tedenska temperatura zraka (T_{min}), povprečna maksimalna temperatura zraka (T_{max}), odčitana tedenska minimalna temperatura zraka ($Ted T_{min}$), odčitana tedenska maksimalna temperatura zraka ($Ted T_{max}$) in tedensko vsoto padavin (P). Povprečne tedenske vrednosti smo izračunali za 1 teden nazaj od dneva vzorčenja. Poleg tega smo tedenske vrednosti zamikali za 1 dan od dneva vzorčenja do največ 7 dni zamika od dneva vzorčenja. Vpliv naštetih vremenskih spremenljivk smo na vsakem rastišču izračunali za rani in za kasni les posebej.

Linearna enačba:

$$prirastki = a + b * (T_{pov}, T_{max}, Ted T_{max}, T_{min}, Ted T_{min}, P) \quad (10)$$

kjer je T_{pov} povprečna tedenska temperatura zraka, T_{max} odčitana tedenska maksimalna temperatura zraka, $Ted T_{max}$ povprečna maksimalna tedenska temperatura zraka, T_{min} odčitana tedenska minimalna temperatura zraka, $Ted T_{min}$ povprečna minimalna tedenska temperatura zraka in P tedenska vsota padavin.

3.8 OGREVANJE IN HLAJENJE DREVES V LETU 2004

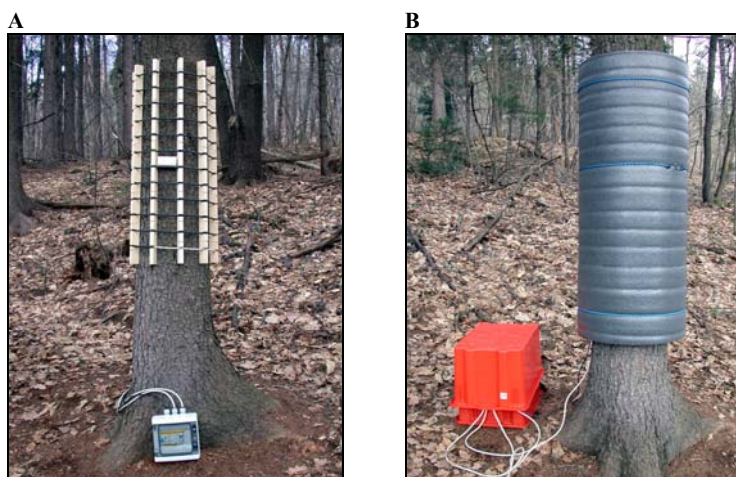
3.8.1 Izbor poskusnih dreves

Za poskus eksperimentalnega ogrevanja in ohlajanja dela debla drevesa smo izbrali tri navidezno zdrave navadne smreke (*Picea abies*) v Ljubljani. Drevesa so rasla na južnem pobočju Rožnika (m n.m.) in so bila med seboj oddaljena največ 10 metrov. Premer vseh dreves je bil okrog 35 cm. Eno drevo smo ogrevali, drugo pa hladili. Tretje drevo, na

katerem nismo opravljali poskusov, je služilo za kontrolo. Število dreves je bilo omejeno zaradi zahtevnosti izvedbe eksperimenta na odraslih drevesih.

3.8.2 Postavitev grelnega sistema

Grelni eksperiment smo zastavili 29.3.2004, pred pričetkom redne kambijeve aktivnosti in ga zaključili 3.5.2004. Del debla drevesa smo ogrevali s samoregulirnim grelnim kablom (FSM-17, 17W/+5°C, 11W/25°C, 230V) dolžine 15 metrov. Spodnji del ogrevanega debla je bil od tal oddaljen 70 cm, zgornji pa 170 cm. Na deblo smo najprej pritrdili 10 distančnikov širine 2 cm in globine 4 cm. Distančniki so bili med seboj razmaknjeni po 12 cm. V 2 cm široke utore distančnikov smo namestili grelni kabel in ga spiralno ovili okrog debla drevesa na dolžini 1 m (slika 35A). Razmak med navoji kabla v vertikalni smeri je znašal 7 cm. Grelni kabel je bil od skorje oddaljen 2 cm. Med grelni kabel in letvice smo približno v sredino sistema pritrdili termometrski senzor. Celoten sistem smo ovili s toplotno izolacijo debeline 15 mm. Višina toplotne izolacije je znašala 1,4 m, dolžina pa 8 m, tako da je bila celotna debelina izolacije vsaj 5 cm. Razmak med skorjo in izolacijo je bil 4 cm. Na zgornji in spodnji strani smo sistem izolirali še s peno širine 15 cm, ki smo jo zatlačili med izolacijo in deblo (slika 35B). Zgornjo stran sistema smo pred dežjem zaščitili še s folijo. Želena temperaturo smo v prostoru med izolacijo in skorjo nastavili na 23-25°C s pomočjo temperaturnega regulatorja ITR 0-60°C s tipalom in jo dnevno nadzorovali. Stikalni blok z diferenčno in kratkostično zaščito ter temperaturni regulator smo pred vremenom zaščitili s plastičnim zabojem.



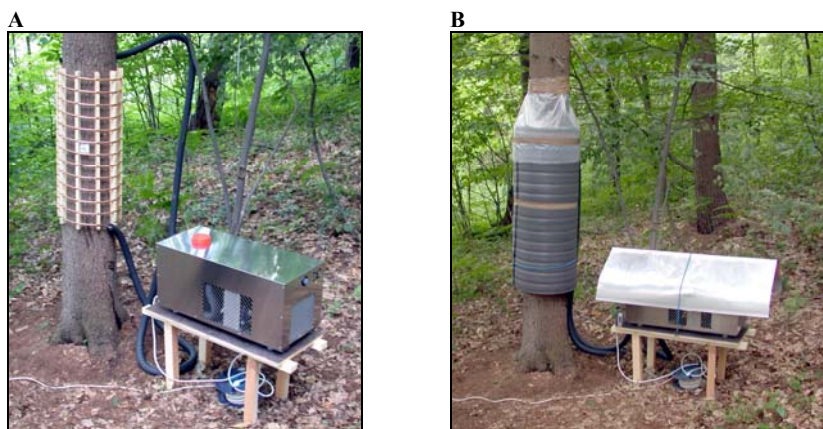
Slika 35: A – Postavitev distančnikov in grelnega kabla okrog dela debla drevesa. Vmes je nameščen temperaturni senzor. B – Postavljen in izoliran grelni sistem (Foto: M. Zupančič).

Figure 35: A – Placing of the heating cable around the stem circumference. B – Isolated heating system.

3.8.3 Postavitev hladilnega sistema

Del debla drugega drevesa smo začeli ohlajati 14.6.2004, na višku kambijeve aktivnosti. Poskus je potekal do 20.7.2004. Za hlajenje smo uporabili pretočni hladilni sistem (dimenzije 900 x 400 x 400 mm). Sestavljen je bil iz hladilnega agregata (hladilna moč

sistema 720 W pri -10°C , električna moč 800 W-230V) za hlajenje vode v rezervoarju (volumen 20 l). Uporabljen je bil hladilni plin R 404, ki ni škodljiv ozonu. Obtočna črpalka je poganjala hladilno tekočino po bakreni cevi, ki je hladila del debla. Spodnji del hlajenega debla je bil od tal oddaljen 70 cm, zgornji pa 170 cm. Na deblo smo najprej pritrdili 10 distančnikov širine 2 cm in globine 4 cm. Distančniki so bili med seboj razmaknjeni po 12 cm. V 2 cm široke uture distančnikov smo namestili bakreno cev in jo spiralno ovili okrog debla drevesa na dolžini 1 m (slika 36A). Bakreno cev smo ovili okrog enega metra debla drevesa na dolžini 1 metra. Razmak med navoji bakrene cevi v vertikalni smeri je znašal 7 cm. Bakrena cev je bila od skorje oddaljena 2 cm. Med bakreno cev in letvice smo približno v sredino sistema pritrdili termometriški senzor. Celoten sistem smo ovili s toplotno izolacijo debeline 15 mm. Višina toplotne izolacije je znašala 1,4 m, dolžina pa 8 m, celotna debelina izolacije je bila vsaj 5 cm. Razmak med skorjo in izolacijo je bil 4 cm. Na zgornji in spodnji strani smo sistem izolirali s peno širine 15 cm, ki smo jo zatlačili med izolacijo in deblo (slika 36B). Zgornjo stran sistema smo pred dežjem zaščitili še s folijo. Želena temperaturo smo v prostoru med izolacijo in skorjo brez stopenjsko nastavili na $9-11^{\circ}\text{C}$ s pomočjo kapilarnega termostata in jo dnevno nadzorovali. Pretočni hladilni sistem smo postavili na lesen podstavek in ga pred vremenom zaščitili z aluminijasto streho.



Slika 36: A – Postavitev distančnikov in bakrenih cevi okrog dela debla drevesa. Vmes je nameščen temperaturni senzor. B – Postavljen in izoliran hladilni sistem (Foto: M. Zupančič).

Figure 36: A – Placing of the copper tubes around the stem circumference. B – Isolated cooling system.

3.8.4 Vzorčenje

Intaktne vzorce tkiv najmlajšega dela žive skorje, kambija in zunanjega dela ksilema smo pri obeh poskusih odvzeli na dan zastavitve eksperimenta in nato vsakih 10 dni (preglednica 4). Vzorce tkiv smo pri ogrevanju, hlajenju in kontrolnem drevesu odvzeli v prsni višini (1,3 m nad tlemi). Dodatno smo pri ogrevanju in hlajenju drevesu odvzeli vzorce še približno 10 cm nad izoliranim delom debla, da smo proučili vpliv povišane oziroma znižane temperature na kambijevo aktivnost nekoliko stran od mesta namestitve sistema. Po vsakem odvzemu smo grelni oziroma hladilni sistem namestili nazaj na drevo. Naknadno smo vzorce odvzeli po zaključku kambijeve aktivnosti, 16.12.2004, da smo

proučili vpliv nadzorovanega ogrevanja in hlajenja na anatomsko zgradbo in širino ksilemskega in floemskega prirastka. Vzorce smo takoj po odvzemu fiksirali v FAA. Po enem tednu je sledila dehidracija vzorcev v etanolni vrsti (30%, 50% in 70%) (glej tudi poglavje 3.3). Med postopkom dodatnega obrezovanja vzorcev, smo v radialni smeri z britvico odstranili 3 mm širok (tangencialna dimenzija) del tkiva, ga ustrezno skrajšali, shranili v 70% alkoholu in ga namenili za kasnejšo pripravo rezin za prepajanje z umetno smolo za raziskave s transmisijsko elektronsko mikroskopijo (TEM) in UV-mikrospektrofotometrijo (UMSP). Pripravili smo obarvane (safranin in astra modro) trajne preparate prečnih prereзов za svetlobno mikroskopijo (SM) z drsnimi mikrotomom (glej tudi poglavje 3.3), kjer je bila debelina preparatov 25 μm in z rotacijskim mikrotomom, kjer je bila debelina preparatov 14 μm (glej tudi poglavje 3.9.3). Za podrobnejše anatomske in ultrastrukturne raziskave tkiv smo pripravili še poltanke preparate prečnih prereзов obarvane s toluidin modrim za SM (glej poglavja 3.9.4, 3.9.5 in 3.9.5.1), neobarvane poltanke preparate prečnih prereзов za UMSP (glej poglavja 3.9.4, 3.9.5 in 3.9.7) ter ultra tanke preparate prečnih prereзов tkiv obarvanih s kalijevim permanganatom za TEM (glej poglavja 3.9.4, 3.9.5 in 3.9.7).

Preglednica 4: Datumi vzorčenja pri poskusu ogrevanja (A) in hlajenja (B) debla pri smreki v letu 2004.

Table 4: Sampling dates of the (A) heating and (B) cooling stem of Norway spruce in the year 2004.

A		B	
GRETJE		HLAJENJE	
odvzem	datum	odvzem	datum
1.	14.6.2004	1.	29.3.2004
2.	24.6.2004	2.	9.4.2004
3.	6.7.2004	3.	21.4.2004
4.	20.7.2004	4.	3.5.2004

Potrebne klimatske podatke med izvajanjem obeh eksperimentov smo za Ljubljano v letu 2004 dobili od Gozdarskega inštituta Slovenije, ki je imel postavljeno vremensko postajo (Davis Vantage Pro Radio-Kit) 50 m od testnih dreves. Vremenska postaja je klimatske parametre (temperatura zraka, padavine) beležila vsakih 10 min. Iz dobljenih podatkov smo v programu Excel izračunali povprečne, maksimalne in minimalne dnevne temperature ter dnevno količino padavin.

3.9 OGREVANJE IN HLAJENJE DREVES V LETU 2005

3.9.1 Izbor poskusnih dreves

Za poskus eksperimentalnega ogrevanja in ohlajanja dela debla drevesa v letu 2005 smo ponovno izbrali tri navidezno zdrave navadne smreke (*Picea abies*) v Ljubljani. Drevesa so rasla na južnem pobočju Rožnika (323 m n.m.) in so bila med seboj oddaljena največ 6 metrov. Premer dreves je bil okrog 33 cm. Eno smo ogrevali, drugo pa hladili. Tretje drevo, na katerem nismo opravljali poskusov, je služilo za kontrolo. Število dreves je bilo omejeno zaradi zahtevnosti izvedbe eksperimenta na odraslih drevesih.

3.9.2 Zastavitev eksperimentov ogrevanja in hlajenja

V letu 2005 smo oba eksperimenta (ogrevanje in hlajenje) zastavili na isti dan, nekoliko pred pričetkom redne kambijeve aktivnosti 26.4.2005. Način zastavitve obeh eksperimentov je bil enak kot v letu 2004 (glej poglavja 3.8.2 in 3.8.3). Temperaturo ogrevanja smo nastavili na 24-25°C, hlajenja pa 9-11°C. Eksperiment hlajenja smo zaključili 20.9.2005, saj so konec septembra povprečne temperature zraka padle pod 15°C. Z ogrevanjem smo nadaljevali še tri tedne, do 11.10.2005. Povprečne temperature so se tedaj gibale okrog 10°C. Intaktne vzorce tkiv najmlajšega dela žive skorje, kambija in zunanjega dela ksilema smo pri ogrevanju, hlajenju in kontrolnem drevesu odvzeli v prsni višini (1,3 m nad tlemi) na dan zastavitve eksperimenta in nato vsakih 20 dni (preglednica 5). Dodatno smo vzorce odvzeli 4.11.2005, po zaključku obeh eksperimentov, da smo proučili vpliv nadzorovanega ogrevanja in hlajenja na anatomsko zgradbo in širino ksilemskega in floemskega prirastka. Po vsakem odvzemu smo grelni oziroma hladilni sistem namestili nazaj na drevo. Vzorce smo takoj po odvzemu fiksirali v FAA. Po enem tednu je sledila dehidracija vzorcev v etanolni vrsti (30%, 50% in 70%). Trajne preparate prečnih prereзов debeline 14 µm za SM smo pripravili z rotacijskim mikrotomom po postopku opisanem v poglavju 3.9.3.

Preglednica 5: Datumi vzorčenja pri poskusu ogrevanja (A) in hlajenja (B) debla pri smreki v letu 2005.

Table 5: Sampling dates of the (A) heating and (B) cooling stem of Norway spruce in the year 2005.

GRETJE IN HLAJENJE	
odvzem	datum
1.	26.4.2005
2.	17.5.2005
3.	7.6.2005
4.	28.6.2005
5.	19.7.2005
6.	9.8.2005
7.	30.8.2005
8.	20.9.2005
9.	4.10.2005
10.	4.11.2005

Pri tem poskusu smo pri vsakem odvzemu s termočleni (KM 1250) izmerili temperaturo kambija v izoliranem delu debla ter 10 cm nad in pod njim. Tik pred posamezno meritvijo smo z vijakom zbrušenim v ostro konico (premer 4 mm) naredili luknjo do kambijevega območja. Vanjo smo namestili termo člena in luknjo zamašili z drobno vejico, da se je vzpostavila temperatura v merjenem območju (slika 37). Na vsakem merilnem območju smo napravili dve luknji in po trikrat odčitali temperaturo.



Slika 37: Merjenje temperature v kambijevem območju (Foto: M. Zupančič).

Figure 37: Temperature measurements in the cambial region.

Potrebne klimatske podatke za čas med izvajanjem obeh eksperimentov smo dobili od Gozdarskega inštituta Slovenije, ki je imel postavljeno vremensko postajo (Davis Vantage Pro Radio-Kit) 50 m od testnih dreves. Vremenska postaja je klimatske parametre (temperatura zraka, padavine, tlak, vlažnost,...) beležila vsakih 10 min. Iz dobljenih podatkov smo v programu Excel izračunali povprečne, maksimalne, minimalne dnevne temperature ter dnevno količino padavin.

3.9.3 Priprava rezin za svetlobno mikroskopijo z rotacijskim mikrotomom

Vzorke tkiv za pripravo trajnih prečnih prereзов z rotacijskim mikrotomom je bilo potrebno predhodno prepojit s parafinom. Intaktnim vzorcem smo odvzeli manjši košček tkiva okvirnih dimenzij 2 x 3 x 5 mm³. Vsak posamezni vzorec smo vstavili v kaseto, na katero smo predhodno s svinčnikom zapisali oznako vzorca. Kasete z vzorci smo dali v 70% alkohol, da se niso posušili. Ko smo pripravili zadostno število kaset (60-70) in napolnili reagenčno posodo komore za preparacijo tkiv Leica TP 1020, smo pričeli s postopkom dehidracije z etanolom in bio-clearom (D-limonen) ter prepajanja vzorcev s parafinom. Komori sestavljeni iz 12 reagenčnih posod smo nastavili ustrezen program, po katerem je potekalo prepajanje vzorcev. Postopek prepajanja je prikazan v preglednici 6.

Preglednica 6: Postopek prepajanja vzorcev s parafinom.

Table 6: Paraffin embedding procedure of the samples.

reagent	koncentracija (%)	trajanje (ur)
etanol	70	2
etanol	70	1,5
etanol	90	1,5
etanol	90	1,5
etanol	95	1,5
etanol	100	1,5
etanol	100	1,5
bio-clear	100	1,5
bio-clear	100	1,5
bio-clear	100	1,5
parafin		2
parafin		2

Ko je bil postopek prepajanja zaključen, smo pripravili parafinske bloke s tkivi. Kasete z vzorci smo postavili na grelno ploščo parafinskega dispenzerja Leica EG 1120, ki je bila ogreta na 60°C. Parafin se je pri tem v kaseti stalil. Kaseto smo odprli in obdržali tisto polovico kasete, na kateri je bila s svinčnikom napisana oznaka vzorca. Pravilno orientiran vzorec s staljenim parafinom smo postavili v kovinsko posodico in ga zalili s staljenim parafinom (58°C), s čimer smo poskušali preprečiti nastajanje mehurčkov. Posodico postavili v petrijevko z mrzlo vodo in z ogrevano pinceto Leica EG F držali vzorec na mestu toliko časa, da se je parafin nekoliko strdil (robovi so postali belkasti). V naslednjem koraku smo postavili na posodico označeno polovico kasete, dolili parafin in jo postavili na mizo za toliko časa, da se je parafin strdil. Vzorce smo postavili v zmrzovalnik za približno 30 minut, da smo lahko odstranili parafinske bloke iz posodic.

Rezanje prečnih prerezov tkiv je potekalo s polavtomatskim rotacijskim mikrotomom Leica RM 2245. Uporabljali smo nizko profilne jeklene nože za rezanje trših tkiv Feather N34H za enkratno uporabo. Najprej smo ploskev namenjeno za rezanje prikrojili na ustrezno velikost, odstranili presežni parafin in ploskev izravnali. Ker je smrekov kasni les relativno trd, smo bloke vzorcev pred rezanjem položili v posodo z vodo (sobne temperature) za nekaj ur, da se je ksilemsko tkivo nekoliko zmehčalo. Debelina rezin je bila 10-14 µm. Odrezane rezine smo najprej položili v posodo s hladno vodo. Nato smo jih prestavili v vodo ogreto na 40°C, ki je bila v vodni kopeli Leica HI 1210. Ob tem so se rezine nekoliko raztegnile. Rezine smo pobrali iz vode z objektnim steklom premazanim z albuminom, s čimer smo povečali oprijemnost. Objektna stekla z rezinami smo položili v pečico na 70°C za približno 30 minut.

Preparate smo obarvali z barviloma safranin in astra modro. Pred tem je bilo potrebno odstraniti parafin iz rezin po postopku opisanem v preglednici 7. Barvanje rezin je potekalo podobno kot pri pripravi preparatov debeline 25 µm narezanih z drsnim mikrotomom (glej poglavje 3.3). Razlika je bila v le tem, da smo tokrat barvali rezine, ki so že bile nameščene na objektnem steklu. Poleg tega smo čas barvanja v safraninu podaljšali na 1 uro.

Preglednica 7: Postopek odstranjevanja parafina iz rezin.

Table 7: Procedure of the removal of the paraffin from the sections.

reagent	koncentracija (%)	trajanje (min)
bio-clear	100	10
bio-clear	100	10
etanol	95	10
etanol	95	10
etanol	95	10

3.9.4 Prepajanje vzorcev z epoksi smolo za LM, TEM in UMSP

Prepajanje vzorcev z epoksidno smolo je potekalo v Laboratoriju za histologijo in elektronsko mikroskopijo na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Vzorce tkiv smo najprej ustrezno pripravili za prepajanje z epoksidno smolo po modificiranem postopku, kot ga opisuje Spurr (1969). V nadaljevanju bomo tako

pripravljeni umetno smolo imenovali »Spurr«. Postopek nadaljnje dehidracije vzorcev z etanolom in acetonom je prikazan v spodnji preglednici 8.

Preglednica 8: Postopek dehidracije tkiv z etanolom in acetonom za vklapljanje v umetno smolo Spurr.

Table 8: Procedure of the dehydration of tissue with ethanol and acetone for embedding in Spurr's epoxy resin.

reagent	količina (ml)	trajanje (min)	koncentracija (%)
etanol	30	30	70
etanol	30	30	95
etanol	30	30	95
etanol	30	30	100
aceton	30	30	100
aceton	30	30	100

Pripravili smo mešanico smole Spurr, ki sestoji iz sledečih komponent:

- ERL 4206: vinil ciklohesen dioksid (epoksidni monomer);
- DER 736: diglicidilni eter polipropilenskega glikola (fleksibilizator);
- NSA: nonenil sukcinil anhidrid (utrjevalec);
- DMAE (S-1): dimetil aminoetanol (pospeševalec).

Spurr je ena izmed smol, ki se uporabljajo za vklapljanje vzorcev tkiv pregledovanju s TEM. Omenjena smola zelo dobro in hitro prodira v tkivni material in je manj viskozna (60 cp pri 25°C) od smole Epon ali Araldit. Spurr se zlahka zmeša, ima dolg čas želiranja z minimalnim zamreženjem ali samopolimerizacijo mešanice pri sobni temperaturi. Trdoto smole je mogoče nadzorovati, polimerizacija je hitra, rezanje vklopljenih tkiv s steklenim oziroma diamantnim nožem ne predstavlja težav. Spurr (1969) navaja tri različne mešanice smole: mehko, normalno in trdo. V našem primeru smo uporabili mešanico normalno trde smole (preglednica 9). Priprava mešanice je potekala v stekleni čaši zaradi njene reaktivnosti s polimernimi materiali.

Preglednica 9: Priprava mešanice normalno trdega "Spurra".

Table 9: Composition of standard Spurr's embedding medium.

komponenta	količina (g)
ERL = VCD	20
DER 736	12
NSA	52
DMAE	0,8
Skupaj	84,8

Pripravi mešanice je sledilo prepajanje vzorcev tkiv po postopku prikazanem v preglednici 10. Infiltracija je potekala pri sobni temperaturi. Vzorce tkiv, ki so se nahajali v označenih 1,5 ml epicah, smo dali v mešalnik, da je bilo prepajanje intenzivnejše. Ker je mešanica smole Spurr strupena, je delo vseskozi potekalo v zračenem digestoriju. Med menjavami komponent smo uporabljali dvojne rokavice in zaščitno masko na ustih in nosu. Skupno je infiltracija potekala 48 ur oziroma dva dni.

Preglednica 10: Postopek prepajanja vzorcev z umetno smolo Spurr.

Table 10: Infiltration procedure of the samples with Spurr's epoxy resin.

komponenta	trajanje (h)
1 del "Spurr" : 1 del acetona	17
čisti "Spurr"	9 ur
čisti "Spurr"	22 ur

Za polimerizacijo smo vzorce tkiv vložili v primerno velike plastične modele. Za vsak odvzem smo pripravili po dva vzorca. V model smo položili tudi listke z ustreznimi oznakami. Nato smo vse skupaj zalili s čisto smolo in pri tem pazili, da nismo ustvarili mehurčkov, ki bi oteževali popolno prepajanje vzorcev tkiv. Gladina zalite smole je bila izbočena, ker se med sušenjem oziroma strjevanjem še nekoliko skrči. Modele zalite s smolo smo položili na stekleno posčo in jih položili v sušilnik s temperaturo nastavljeno na 60°C. Polimerizacija je potekala dva dni in pol (preglednica 11).

Preglednica 11: Postopek polimerizacije vzorcev z umetno smolo Spurr.

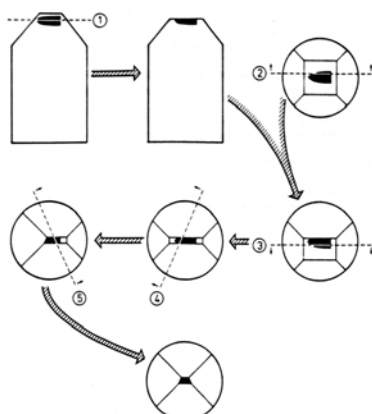
Table 11: Polimersation procedure of the samples with Spurr's epoxy resin.

komponenta	temperatura (°C)	trajanje (h)
čisti "Spurr"	60	63

Bloke vklopljenih tkivnih vzorcev smo po tem času vzeli iz sušilnika in počakali da so se na sobni temperaturi ohladili, da smo jih lahko vzeli iz modelov. Sledila je priprava poltankih preparatov za SM in UMSP, ki je potekala na Oddelku za lesno biologijo na Univerzi v Hamburgu v Nemčiji.

3.9.5 Priprava poltankih rezin za svetlobno mikroskopijo z ultramikrotomom

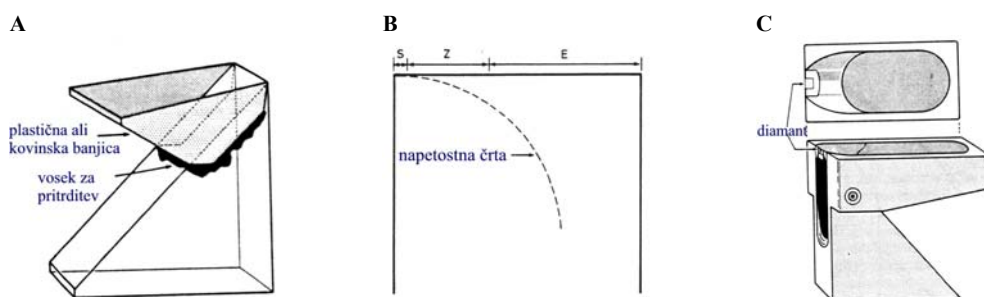
Preden smo blok vzorca tkiv vstavili v vpenjalo ultramikrotoma Ultracut E PABISH smo vse kote nastavili na 0°. Blok smo v vpenjalu z vijakom čvrsto privili. Sledilo je grobo rezanje blokov z britvico v obliko prirezane piramide. Pripravili smo ustrezno površino za rezanje, odstranili presežni vklopni medij in ploskev izravnali. Postopek je podrobneje prikazan na sliki 38. Očiščena ploskev rezanja je imela obliko trapeza, ki je bila najustrežnejša za izdelavo večje serije rezin v obliki traku. Rezilo britvice je moralo biti brezhibno ostro, da so bile površine stranic ter robovi trapezov popolnoma gladki. Takrat so se svetili. Na ploskvi rezanja smo odstranili vse kovinske drobce, saj bi lahko med rezanjem poškodovali ali uničili nož. Kadar so bili vzorci tkiv v bloku majhni, smo na robu stranice, kjer se je odrezovanje začelo, ohranili del vklopnega medija. V tem primeru smo kvaliteto odrezanih rezin zaradi nehomogenosti lesnega tkiva izboljšali.



Slika 38: Shematski prikaz obrezovanja in oblikovanja bloka. Vzorec tkiva črne barve je v principu mogoče s petimi glavnimi rezi oblikovati v trapez. Rez 1 je narejen paralelno s površino rezanja in odstrani presežni vklopni medij ter izravna površino rezanja. Rezi 2-5 so narejeni pod določenimi koti na površino rezanja in dokončno oblikujejo prirezano piramido. Reza 2 in 3 predstavljata glavni stranici trapeza, ki morata biti med seboj paralelni. Reza 4 in 5 predstavljata stranski stranici trapeza, ki morata biti pod istim kotom glede na osnovni stranici (Robinson in sod., 1987).

Figure 38: Schematic representation of a block trimming procedure. The object can be trimmed into a trapezium form with five cuts using a hand-held razor blade. Cut 1 is made parallel to the flat surface of the block and removes the excess of the embedding medium. The surface of the block is flat. Cuts 2-5 are performed at an angle to this surface. Cuts 2 and 3 are the main sides of the trapezium and should be parallel to each other. Cuts 4 and 5 are lateral sides of the trapezium and should be at the same angle to the main sides (Robinson et al., 1987).

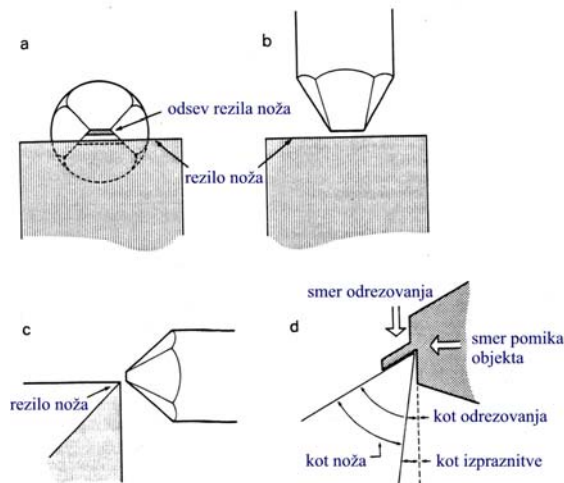
Nosilec z blokom smo vpeli v rezalno roko. V držalo za rezilo smo vpeli stekleni nož (slika 39). Ob opazovanju skozi binokular smo stekleni nož počasi in previdno ročno približevali rezalni roki z vpetim blokom. Nož in vzorec smo nastavili paralelno enega z drugim. Rezilo noža smo počasi še nekoliko približali bloku. S steklenim nožem smo napravili toliko rezin, da je bila površina rezanja popolnoma gladka in izravnana.



Slika 39: A – Stekleni nož s plastično banjico pritrjeno z voskom; B – Ostrina steklenega noža. Območje S se za rezanje ne uporablja, ker ima zelo slabo ostrino. Območje Z je najostrejšje in predstavlja približno 1/3 noža. Območje E je manjše ostrine in se največkrat uporablja za predpripravo površine za rezanje; C – Diamantni nož vključen v kovinsko ogrodje z banjico (Robinson in sod., 1987).

Figure 39: A – Glass knife with the plastic trough sealed with wax; B – Sharpness of the glass knife. Region S is not used for sectioning. Region Z is the sharpest region presenting about 1/3 of the knife edge. Region E is less sharp and is normally used for preparing the surface for sectioning; C – Diamond knife included in the metal framework with the trough (Robinson et al., 1987).

Preden smo v nadaljevanju uporabili diamantni nož, smo ponovno preverili površino rezanja in robove trapeza in jih v primeru, ko je bilo to potrebno, popravili (slika 38). Dimantni noži so zelo primerni za rezanje trših ali nehomogenih tkiv, saj so zelo ostri in trdi, zato se ob pravilni uporabi počasi obrabijo. Blok smo vpeli v rezalno roko. Diamantni nož namenjen rezanju poltankih rezin smo zelo previdno očistili s stiroporom pomočenim v etanol in ga nato sprali z bi-destilirano vodo. Diamantno rezilo noža smo pazljivo osušili s čistim filtrirnim papirjem, ne da bi se dotaknili rezila. Nož smo vpeli v rezilno držalo. Kot držala smo nastavili na 6° . Nož smo ročno previdno približali bloku na razdaljo 3 mm in ga nato čvrsto pritrdili. V nadaljevanju smo nož toliko časa približevali bloku, dokler med njima nismo opazili le zelo tanke reže svetlobe (slika 40). Ob tem smo ponovno preverili, ali sta blok in nož resnično vzporedna eden z drugim. Blok smo postavili neposredno pod rezilo noža. Banjico noža smo napolnili z bi-destilirano vodo, da je bila gladina vode konkavna. Gladina vode je bila med rezanjem zelo pomembna, saj se pri preveč konkavnem menisku rezine nakopičijo ob rezilu in gubajo. Nasprotno pa se pri konveksnem menisku omoči hrbet rezila noža ter ploskev rezanja bloka, kar preprečuje izdelavo rezin v obliki traku. Uporaba destilirane vode se je izkazala za zelo ustrezno, saj tekočina ne sme prehitro hlapeti, ne sme reagirati z odrezanim tkivom in mora imeti visoko površinsko napetost. S pomočjo injekcijske brizgalke smo odvzeli presežek vode v banjici, tako da je bil odboj svetlobe na vodni gladini največji in smo ob rezilu videli rahlo senco. Debelina rezanja poltankih rezin je bila približno $1\mu\text{m}$, hitrost pa 1 mm/s . Med rezanjem smo pazili, da blok ni bil omočen. V nasprotnem primeru smo rezanje prekinili, vzorec in hrbet rezila noža pa osušili s čistim filtrirnim papirjem.



Slika 40: Prikaz odrezovanja; a – c Ustrezna postavitev bloka vzorca tkiv glede na rezilo noža z različnih pogledov; d – Geometrijski parametri pri odrezovanju (Robinson in sod., 1987).

Figure 40: Schematic diagram of sectioning; a – c The correct orientation of the trimmed block with respect to the cutting edge of the knife as seen from different orientations; d – Geometrical parameters characterizing sectioning (Robinson et al., 1987).

Rezine smo jih pobrali iz vode s pomočjo steklene palčke in jih položili na kapljico bi-destilirane vode na čistem objektnem steklu. Objektno steklo z rezinami smo ustrezno označili in položili na vročo grelno ploščo ogreto na približno 80° za najmanj 10-20 minut.

3.9.5.1 Postopek obarvanja s toluidin modrim

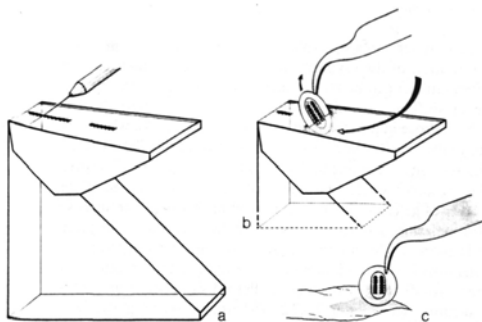
Za barvanje pol tankih preparatov smo uporabili 1% vodno raztopino barvila toluidin modro. Objektna stekla s preparati smo namakali v raztopini barvila 1 do 2 uri. Nato smo jih najprej izpirali z destilirano vodo, sledila je dehidracija v 96% etanolu. Preparato smo nato položili v ksilen za 5 minut in jih nato vklopili v Eukitt. Preparato smo čez noč obtežili s svinčenimi utežmi. Barvilo celične stene traheid v različnih fazah diferenciacije selektivno obarva. Popolnoma oblikovane in lignificirane celične stene so se obarvale zeleno modro, nelignificirane celične stene traheid pa vijolično modro.

3.9.6 Priprava ultra tankih rezin za TEM z ultramikrotomom

3.9.6.1 Postopek priprave ultra tankih rezin za TEM

Ko so bile poltanke rezine prečnih prerezov pripravljene, smo jih pregledali pod svetlobnim mikroskopom ter določili območje tkiva za nadaljnjo pripravo ultra tankih rezin za TEM. V ta namen smo z zelo ostro britvico ploskev trapeza zmanjšali na približno 1/10 prvotne. Pri tem smo pazili, da sta bili osnovni stranici trapeza vzporedni, stranski stranici pa pod enakim kotom glede na osnovni stranici. Ko je bila ploskev zmanjšana, smo preverili, da na rezalnih ploskvah ni bilo nobenega kovinskega drobca, ki bi lahko poškodoval rezilo diamantnega noža. Blok smo nato vpeli v rezalno roko. Diamantni nož brezhibne ostrine namenjen rezanju ultra tankih rezin smo pred vpetjem v rezalno držalo očistili s stiroporom pomočenim v etanol. Kot držala noža je bil nastavljen na 6°. Diamantni nož smo čvrsto pritrdili v držaj noža na razdalji približno 3 mm od bloka, nato smo nož približevali bloku toliko časa, dokler nismo med njima skozi binokular zasledili le tanke reže svetlobe. Ob tem smo preverili, ali sta ploskev vzorca in diamantno rezilo noža popolnoma vzporedna eden na drugega. V nadaljevanju smo blok nastavili tik pod rob rezila. Banjo diamantnega noža smo napolnili z bi-distilirano vodo do konkavnega meniska, nato pa odvečno vodo odstranili z brizgalko. Debelina rezanja ultra tankih rezin je bila 90-100 nm. Hitrost rezanja je bila 1 mm/s. Ko je ultramikrotom avtomatsko odrezoval rezine, smo zapustili prostor, s čimer smo preprečili tresenje naprave zaradi premikanja, dvigovanje prahu zaradi dihanja in podobne nezaželene dejavnike, ki bi lahko vplivali na kvaliteto rezin. Narezane rezine, ki so plavale na vodi, so bile svetlo zlatosrebrne barve, kar je značilno za rezine debeline 90-100 nm. Odrezali smo približno 30-50 rezin (približno 10-15 minut rezanja). Ker so se rezine pri rezanju nekoliko zgnetle, smo jih raztegnili s pomočjo palčke pomočene v kloroform. Palčko smo nekaj sekund pridržali nad banjico z rezinami in pazili, da je nismo pomočili v vodo oziroma se z njo dotaknili diamantnega rezila. Zaradi toksičnosti ksilena smo poskrbeli za ustrezno odzračevanje. Sledilo je pobiranje rezin iz banjice. Najprej smo jih s trepalnico pritrjeno na palčki zelo previdno potisnili skupaj in pazili, da jih nismo poškodovali. Rezine smo nato položili na mrežice z velikostjo okenc 100 in 300. Na eno mrežico smo navadno položili 3 do 10 rezin. Za vsak vzorec smo pripravili 3 mreže z okenci velikosti 100 (večji pregled nad tkivom, rezine so na mrežici bolj stabilne, saj so le-te prevlečene s filmom) ter 3 mreže 300 (imajo prednost, da se jih lahko z elektronskim curkom v TEM še naknadno nekoliko raztegne, vendar pa se hitreje raztrgajo). Mreže 100 smo najprej s pinceto previdno odstranili iz petrijevke. Z zelo fino pinceto smo prijeli mrežo in jo pod kotom 45° potisnili v vodo tako, da so se rezine gibale proti mreži (slika 41). S trepalnico nameščeno na leseni palčki smo rezine zelo previdno pritrdili na mrežo. Ko je bilo na mreži zadosti rezin, smo

mrežo potegnili iz vode, osušili s čistim filtrirnim papirjem ter položili v označeno petrijevko s filtrirnim papirjem in jo takoj pokrili, da bi preprečili kontaminacijo s prahom, delci ipd. Iz istih razlogov smo uporabljeno pinceto in trepalnico vsakič očistili z bi-distilirano vodo. Za zajem rezin na mrežici 300 smo si pomagali s posebno zanko »perfect loop«, s katero smo se v vertikalni smeri previdno približali skupini rezin na vodni gladini v banji. Z zanko smo se dotaknili vodne gladine tako, da so bile rezine zajete in jo nato dvignili iz vode. Pri tem je na zanki ostala kapljica vode skupaj z rezinami. V naslednjem koraku smo kapljico vode z rezinami previdno položili na mrežo 300, ki je bila v petrijevki. Ob tem smo pazili, da je bila matirana stran mreže obrnjena navzgor. S filtrirnim papirjem smo odstranili odvečno vodo med mrežo in zanko. Ko je bila voda odstranjena, smo zanko skupaj z mrežo, na kateri so bile nameščene rezine, postavili na filtrirni papir v označeni petrijevki. Mrežo in zanko smo ločili s pomočjo igle, ki smo jo postavili neposredno na mesti na mrežo, kjer ni bilo nobene rezine. Petrijevko smo po končanem postopku označili, pokrili s pokrovom, očistili zanko in iglo ter pripravili še preostali dve mreži 300. Rezanju je sledilo kontrastiranje s kalijevim permanganatom.



Slika 41: Shema pobiranja rezin iz banjice; a – Razdelitev traku rezin na krajše odseke s pomočjo trepalnice pritrjene na palčki; b – Pobiranje rezin iz banjice na mrežo v prikazani smeri; c – Osušitev mreže s koščkom filtrirnega papirja (Robinson in sod., 1987).

Figure 41: Picking up sections from the trough. a – Separating a ribbon of sections with the help of a mounted eyelash; b – Picking up sections from trough on the grid; c – Drying a grid with a piece of filter paper (Robinson et al., 1987).

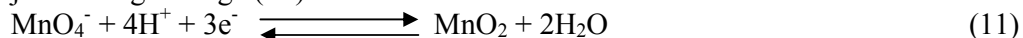
3.9.6.2 Kontrastiranje s kalijevim permanganatom

Biološki vzorci so slabo kontrastni, saj vsebujejo elemente z nizkim atomskim številom (lahka jedra), kot so C, H, O, ki šibko sipajo elektrone, zato jih je potrebno impregnirati s solmi težkih kovin npr. Os, Mn, U, Pb, W. Omenjene kovine imajo visoko atomsko število in veliko gostoto in na njih pride do velikega sipanja elektronov. Z ustrezno fiksacijo oziroma selektivnim obarvanjem različnih struktur je torej mogoče kontrast povečati. Temnejša področja imajo večjo gostoto in obratno. V TEM se kalijev permanganat (KMnO_4), poleg osmijevega tetroksida (OsO_4), pogosto uporablja kot fiksativ ali barvilo v citoloških študijah rastlinskih in živalskih tkiv. Kalijev permanganat se uporablja za kvalitativno dokazovanje prisotnosti lignina v celičnih steni (Bland in sod., 1971, Parham, 1974, Kutscha in Schwarzmam, 1975, Hoffmann in Parameswaran, 1976, Cotè, 1981, Robinson, in sod., 1987, Saka, 1991, 1992, Donaldson, 1991, 1992, 2001, Goodhew in sod., 2001, Gričar, 2001, Singh in Daniel, 2001, Chaffey, 2002, Rensing, 2002, Schmitt in sod., 2003, Schmitt in Melcher, 2004, Gričar in sod., 2003a, b, 2005). Je oksidant in

reagira s komponentami lignina, zlasti z di-, tri- hidroksi fenoli, ki kalijev permanganat reducira v manganove okside (MnO_2 , Mn_2O_3), zato so elektronsko gostejša področja v slojih celične stene odvisna od prisotnosti fenolnih hidroksilnih skupin, oziroma naraščajoče stopnje lignifikacije (Bland in sod., 1971). Porazdelitev lignina v različnih slojih celične stene lahko s to metodo ocenimo le kvalitativno (Saka, 1992).

Bland in sodelavci (1971) so podrobneje raziskali, s katerimi komponentami oziroma skupinami v lesu reagira kalijev permanganat. Rezultati so pokazali, da najintenzivneje reagira z di-, tri- hidroksi fenoli. Intenzivno so reagirale tudi nenasičene alkoholne skupine ($-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2\text{OH}$) in pripadajoče aldehidne skupine ($-\text{CH}=\text{CH}-\text{CHO}$). Ravno tako so s kalijevim permanganatom reagirale nenasičena nefenolna aromatska kislina – cinamilna kislina, aromatske nefenolne kisline s hidroksiliranimi stranskimi verigami ter vse fenolne kisline. Nasičene nefenolne kisline niso kazale pozitivne reakcije s KMnO_4 , zato so karboksilne skupine kot možna reakcijska mesta izključili. V ligninu naj bi bile najštevilnejše reaktivne skupine proste fenolne siringilne in gvajacilne skupine, ki naj bi bile v največji meri odgovorne za reakcije s kalijevim permanganatom. Holoceluloze niso reagirale s KMnO_4 (Bland in sod., 1971). Mnenja o specifičnosti kalijevega permanganata za lignin so deljena. Po Hoffmanu in Parameswaranu (1976) naj bi se s KMnO_4 obarvale tudi kislinske skupine polisaharidov. Raztopina KMnO_4 vsebuje poleg manganatnega iona tudi kalijeve katione (K), ki naj bi se vezali na kislinske skupine polisaharidov. Ker razliki v atomskih masah med kalijem K (39,1) in manganom Mn (54,9) nista tako veliki in ker imata oba atoma enako število elektronskih lupin, bi lahko pričakovali, da povzročita podobno elektronsko gostoto. Vsaj native kislinske hemiceluloze ter pektini naj bi se obarvali s KMnO_4 , če njihovi anionski centri niso vnaprej blokirani. Vendar pa so nadaljnje študije pokazale, da naj bi do obarvanja prišlo le pri predolgi izpostavitvi rezin relativno visokim koncentracijam KMnO_4 pri povišani temperaturi. Pri normalnih razmerah holoceluloze niso kazale vidnih reakcij s kalijevim permanganatom (Bland in sod., 1971, Parham, 1974).

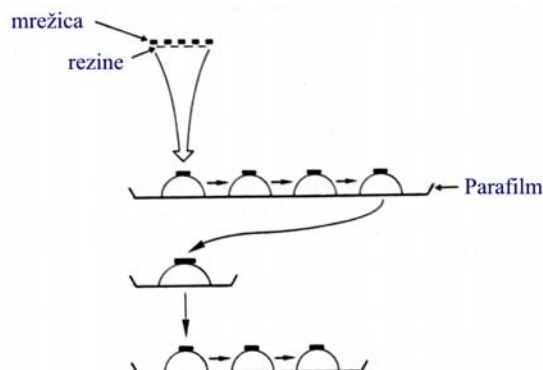
Ker se za kontrastiranje navadno uporablja KMnO_4 v vodni raztopini natrijevega citrata (šibka alkalna raztopina) (Lazarini in Brenčič, 1992, Schmitt in Melcher, 2004) poteka redukcija do manganovega (IV) oksida:



Pri barvanju s KMnO_4 smo 1% vodni raztopini kalijevega permanganata dodali 0,1% natrijevega citrata (Spurr, 1969, Kutscha in Schwarzmanna, 1975, Donaldson, 1992, Schmitt in Melcher, 2004). To naj bi povečalo obarvanost lignificiranih delov celične stene in preprečilo obarvanja drugih komponent celične stene. Natrijevo citratno barvilo naj bi reagiralo z ligninskimi komponentami, ker se natrij kot kation veže na anionska mesta. Pri reakciji kalijevega permanganata z ligninom naj bi se vezava teh natrijevih kationov na anionska mesta v ligninu povečala (Kutscha in Schwarzmanna, 1975).

Za vsako mrežico z rezinami je zadostovala ena kapljica KMnO_4 . V petrijevko smo položili Parafilm (papir prevlečen s parafinom), na katerega smo kanili kapljice KMnO_4 (slika 42). Na te kapljice smo položili mrežice tako, da je bila matirana površina obrnjena proti kapljici. Preden smo položili naslednjo mrežico na kapljico, smo počakali 20 sekund. Po 3 minutah smo mrežice v istem vrstnem redu vzeli s kapljic in jih pomočili v dve časi z

destilirano vodo. Najprej v prvo štirikrat počasi ter zatem v drugo čašo dvajsetkrat hitro. Mrežice smo po izpiranju osušili s filtrirnim papirjem in jih položili nazaj v petrijevko ter pokrili s pokrovom.



Slika 42: Barvanje rezin z lebdenjem mrežic na kapljicah kalijevega permanganata (Robinson in sod., 1987).

Figure 42: Staining the sections by floating the grids on the droplets of potassium permanganate (Robinson et al., 1987).

Ultrastrukturne preiskave odvzetega tkiva smo opravili s transmisijским elektronskim mikroskopom PHILIPS CM 12 TEM. Pospeševalna hitrost pri opazovanju preparata s TEM je navadno zmanjšana na 40-60 kV zaradi večjega kontrasta. Fotografije celičnih sten traheid smo posneli na različnih oddaljenostih od kambija in v različnih razvojnih fazah. Mesta opazovanja oziroma slikanja smo natančno zabeležili.

3.9.7 Priprava poltankih rezin za UMSP ter analize z UMSP

Postopek priprave poltankih rezin debeline 1 μm za UMSP je podoben pripravi poltankih rezin za SM (glej poglavje 3.9.5). Uporabili smo diamantni nož, ki je primernejši za pripravo gladkih, ravnih površin rezin enakomernih debelin. Razpoke oziroma gube močno vplivajo na izmerjene UV absorpcijske spektre in posledično vodijo do napačnih izračunov vsebnosti lignina. Rezine, ki so plavale na vodi v banjici, smo s stekleno palčko pobrali in položili na kapljico bi-destilirane vode na objektnem kvarčnem steklu. Kvarčna stekla nastanejo pri ohlajevanju taline SiO_2 in so popolnoma prepustna za vidno in UV svetlobo. Stekla so zelo krhka, imajo visoko tališče (1713°C) in brez težav zdržijo hitre temperaturne spremembe. Objektno kvarčno steklo z rezinami smo ustrezno označili in položili na vročo grelni ploščo ogreto na približno 80° za najmanj 10-20 minut. Zatem smo kvarčno steklo položili v označeno petrijevko ter jo pokrili s pokrovom. Za UV mikroskopijo je fiksacijska tekočina FAA ustrežnejša od pogosto uporabljenega glutaraldehida, saj ima slednji UV absorpcijski maksimum pri 280 nm, tako kot lignin (Takabe, 2002). Vklonni mediji, ki se navadno uporabljajo pri TEM (razne epoksi smole), so ravno tako primerni za UV mikroskopijo. V našem primeru smo uporabili Spurr. Včasih je potrebno vklonni medij odstraniti iz vzorca, zlasti pri določanju nizkih koncentracij lignina (Fukuzawa, 1992).

Zaradi svojega aromatskega značaja lignin absorbira UV svetlobo, medtem ko je druge komponente celične stene (celuloza, pektini ter hemiceluloze), z izjemo ekstraktivov, ne

absorbirajo. UV-mikrospektrofotometrija se uporablja za polkvantitativno določevanje porazdelitve lignina znotraj slojevite celične stene ksilemskih celic. Metoda temelji na UV iluminaciji poltankih prečnih rezin ksilemskega tkiva. Lignin iglavcev kaže značilni absorpcijski spekter z absorpcijskim maksimumom okrog 212 in 280 nm zaradi prisotnosti fenilpropanskih skupin ter nekaterih kromofornih strukturnih elementov. Nobena druga komponenta celične stene ne kaže UV absorpcijskih lastnosti v istem spektralnem območju kot lignin. Intenzivnost absorpcije je odvisna od koncentracije lignina v posameznih območjih celične stene. UV absorpcijski maksimum zavisi od strukturne zgradbe lignina, kar omogoča ločevanje med ligninom pri listavcih in iglavcih zaradi različnih razmerij gvajacilnih in siringilpropanskih enot. Lignin iglavcev je v glavnem sestavljen iz gvajacilnih enot z absorpcijskim maksimumom pri 280 nm, lignin listavcev pa sestoji iz gvajacilnih ter siringilnih enot v različnih razmerjih, z absorpcijskim maksimumom pri nekoliko nižjih valovnih dolžinah, in sicer v območju med 270-278 nm. Razlike naj bi bile posledica višje simetričnosti fenilpropanskih enot lignina listavcev zaradi večjega deleža siringilnih enot (Scott in sod., 1969, Fukuzawa in Imagawa, 1981, Saka in sod., 1982, Boutelje in Eriksson, 1984, Fengel in Wegener, 1989, Saka, 1991, Sakakibara, 1991, Fukuzawa, 1992, Okuyama in sod., 1998, Kleist in sod., 1999, Koch in Kleist, 2001, Takabe, 2002, Grünwald in sod., 2002a, b, Schmitt in sod., 2003, Koch in Grünwald, 2004, Gričar in sod., 2005).

Pred opazovanjem rezin pod UV-spektrofotometrom smo na rezine kanili 1-3 kapljice imerzijskega glicerina, ki ne absorbira UV svetlobe, s čimer smo povečali efektivno aperturo objektiva in s tem lomni količnik ($n_D = 1,46$). Zatem smo rezine prekrili s krovnim kvarčnim steklom in namestili na UV-mikroskop. Naše točkovne analize so potekale z UV mikroskopskim točkovnim merjenjem z velikostjo točke $1 \mu\text{m}^2$. Dobili smo kvantitativne meritve koncentracije lignina po Beer – Lambertovem zakonu:

$$UV \text{ absorbanca} = \varepsilon * C * d \quad (12)$$

pri čemer je ε absorpcijski koeficient, ki je odvisen od zgradbe lignina, C je volumska koncentracija lignina ter d debelina absorpcijskega sloja (debelina preparata). Debelina rezine je za kvantitativne meritve zelo pomemben parameter. Absorbanca je večja pri debelejših rezinah. Vendar pa se pri predebelih rezinah pojavijo napake, kot so svetlobna razpršenost, neparalelna iluminacija ali difrakcija. Priporočena debelina rezin je 0,5-1 μm oziroma največ 2 μm . V primeru, da sta ε in d konstantni, je koncentracija lignina C proporcionalna UV absorbanci. Kot smo že omenili, je lignin v lesu iglavcev sestavljen predvsem iz gvajacilnih enot, zato je ε v različnih morfoloških območjih celične stene konstanten (Scott in sod., 1969, Fukuzawa, 1992, Okuyama in sod., 1998, Kleist in sod., 1999, Gindl in sod., 2000, Takabe, 2002, Koch in Grünwald, 2004).

Če predpostavljamo, da je debelina celične stene na prečnem prerezu poltankega preparata 1 μm , je vhodna intenziteta UV svetlobe I_o zmanjšana na intenziteto $I_{cel \text{ stena}}$, ki prehaja skozi celično steno zaradi absorbance v celični steni prisotnega lignina. Z nespremenjenim prehajanjem vpadnih žarkov skozi vklopni medij v celičnem lumnu, je mogoče I_o zamenjati z I_{lumen} , intenziteto UV svetlobe, ki prehaja skozi celični lumen (Scott in sod., 1969, Koch in Grünwald, 2004). Enačbo (12) lahko torej zapišemo tudi kot:

$$UV \text{ absorbanca} = \log \frac{I_{lumen}}{I_{cel. stena}} \quad (13)$$

Z merjenjem UV absorpcije svetlobe v določenem območju valovnih dolžin smo pridobili UV spektre določenega področja ksilemskega tkiva. Spektralne analize smo opravili s programom LAMBDA SCAN[®] za Zeissov sistem UMPS 80. Intenzitete absorpcije UV-svetlobe v določenih območjih valovnih dolžin so bile za vsako točko merjene avtomatsko na 2 nm, ponovljene 50 krat in prikazane v obliki spektrov. Spektre smo merili v območju valovnih dolžin 200-400 nm. Grafi prikazujejo območje valovnih dolžin 240-340 nm.

Za bolj podrobne raziskave porazdelitve lignina ter fenolnih komponent v ksilemskem tkivu je bila pri Zeissu razvita UV spektrofotometrična skenirna naprava (UV spectrophotometric-scanning-device). Metoda omogoča neposreden vpogled v porazdelitev lignina pri določeni valovni dolžini 280 nm v posameznih slojih celične stene, kakor tudi različne grafične in statistične analize z lokalno geometrično resolucijo 0,25µm² ter fotometrično resolucijo 4096 stopenj na sivi lestvici, ki so nato pretvorjene v 14 osnovnih barv za boljšo predstavo intenzitet absorbance. V primerjavi z UV mikroskopskim točkovnim merjenjem je v tem primeru topografija lignina v celičnih stenah lahko prikazana v dvodimenzijskem ali tridimenzijskem prerezu (Kleist in sod., 1999, Koch in Kleist, 2001, Koch in Grünwald, 2004). Posneli smo tudi UV fotografije poltankih rezin v monokromatski svetlobi z UMSP I (Zeiss) mikroskopom.

4 REZULTATI

4.1 PRIMERJAVA METODE PINING IN METODE ODVZEMA INTAKTNIH VZORCEV ZA RAZISKAVE SEZONSKE DINAMIKE KSILOGENEZE

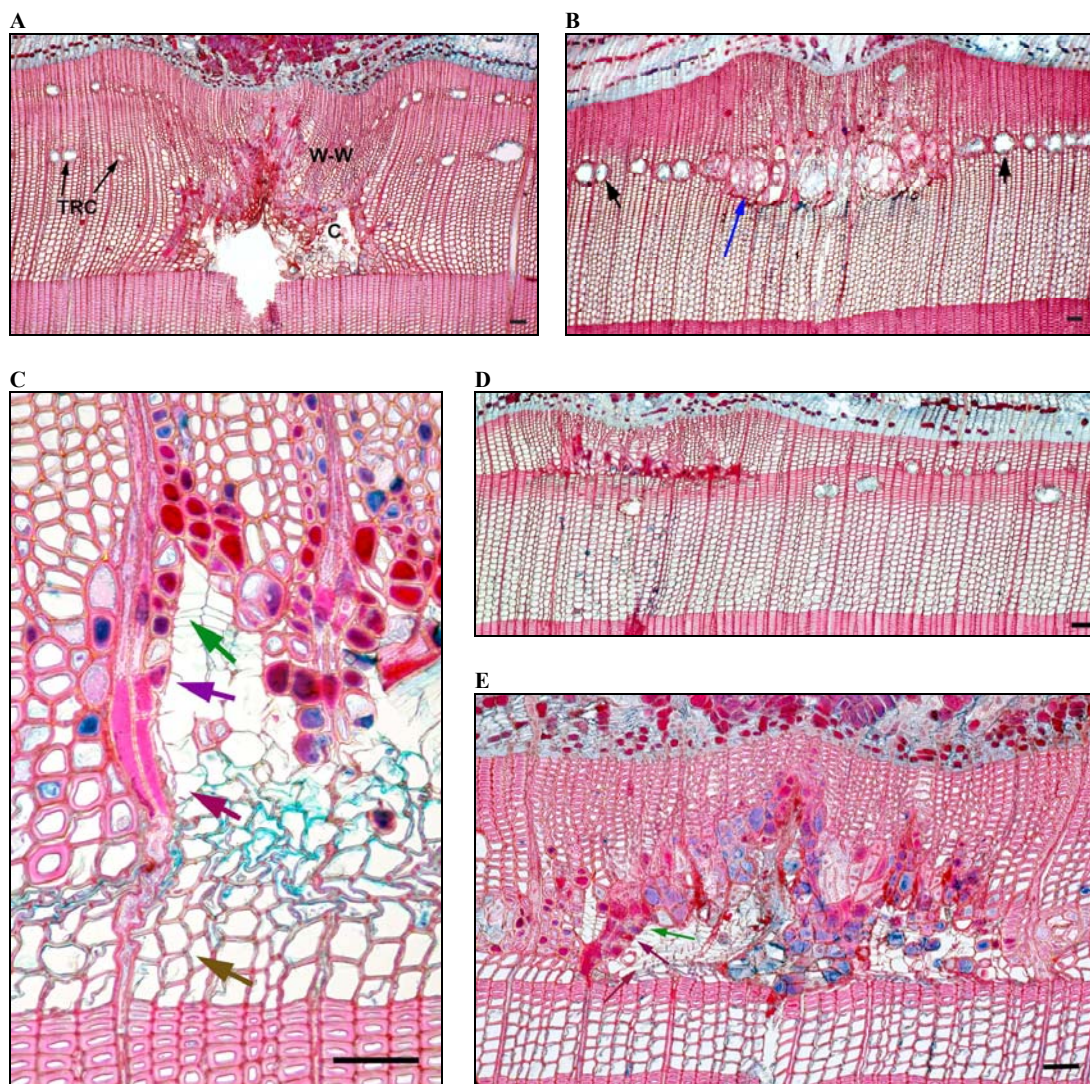
Za študijo sezonske dinamike kambijeve aktivnosti in nastanka ksilemske branike pri jelkah in smrekah v letu 2003 smo uporabili metodo pinning in metodo odvzema intaktnih tkiv. Najprej smo proučili ustreznost obeh metod za tovrstne študije. Pri metodi pinning smo raziskali še anatomske odzive navadne smreke na vbod z iglo.

4.1.1 Metoda pinning

Vbod z iglo je pri navadni smreki neodvisno od časa poškodovanja v letu 2003 povzročil izsušitev ksilemskih tkiv, nastanek kalusa, nekrozo kambijevih celic in nediferenciranih ksilemskih celic, razvoj travmatskih smolnih kanalov in nastanek poranitvenega lesa (slika 43A). Vbod z iglo je porušil nediferencirane ksilemske celice v fazi odlaganja sekundarne celične stene ter lignifikacije, kakor tudi odrasle traheide, kar je bilo vidno v obliki tangencialnih razpok ksilemskega tkiva. Kalus se je oblikoval iz kambijevih fuziformnih in trakovnih celic ter celic v zgodnjih fazah procesa diferenciacije (v postkambijski rasti). Oblika ksilemske branike je bila nad kalusom valovita, najverjetneje zaradi lokalno povečane produkcije celic po poškodovanju kambija z iglo. Položaj kalusa v ksilemski braniki je bil odvisen od časa ranitve. Relevanten anatomske znak za določitev ksilemskega prirastka nastalega do trenutka vboda ter lokacije kambija v trenutku ranitve so bili odmrli ostanki kambijevih celic in ksilemskih derivatov v fazi postkambijske rasti, ki so se v kalusu nahajali med nabrekli kalusnimi celicami z odebeljenimi in lignificiranimi celičnimi stenami (slika 43C, E). Travmatski smolni kanali niso bili zanesljiv pokazatelj ksilemskega prirastka in so tako kot kalus služili le za grobo oceno položaja kambija v času ranitve. Njihova prisotnost se je tekom rastne sezone spreminjala v prostorskem in časovnem smislu. V ranem lesu so difuzno porazdeljeni travmatski smolni kanali nastali za kalusom. V kasnem lesu je nastajanje kalusa ter travmatskih smolnih kanalov, ki so bili urejeni v tangencialnih nizih, največkrat časovno sovpadalo. Prednost metode pinning je v tem, da se informacija o sezonski dinamiki nastajanja ksilemske branike pri uporabi metode pinning v braniki ohrani tudi več let po eksperimentu. Radialni nizi, ki so se nahajali med braniko, nastalo v rastni sezoni 2002 in kalusom nastalem zaradi ranitve z iglo v rastni sezoni 2003, so predstavljali realiziran ksilemski prirastek do trenutka ranitve (slika 43C, 44A). Modro obarvane kambijeve celice ter njihove najmlajše derivate v fazi postkambijske rasti, ki so se ravno tako nahajali v kalusu, smo prepoznali na osnovi večjih radialnih dimenzij slednjih (slika 43C, E). V nekaterih primerih je bilo tkivo pod kalusom zmečkano ali raztrgano oziroma kambijeve celice in celice v fazi postkambijske rasti niso bile ohranjene v kalusu (slika 44D). Včasih so analize oteževali nastajajoči travmatski smolni kanali, ki so se nahajali v kalusu (slika 43B). Takrat meritev ni bilo mogoče izvesti in je bilo zaradi nejasnosti anatomske strukture preiskovanih vzorcev potrebno pripraviti nove preparate iz drugih nivojev narejenih na isti dan. Celice z modro in rdečo obarvano celično steno ter citoplazmo v celičnih lumnih so predstavljale aksialne traheide v fazi odlaganja sekundarne celične stene in lignifikacije (slika 43C, E). Rdeče obarvane celične stene traheid s praznimi lumni so bile značilne za popolnoma diferencirane traheide.

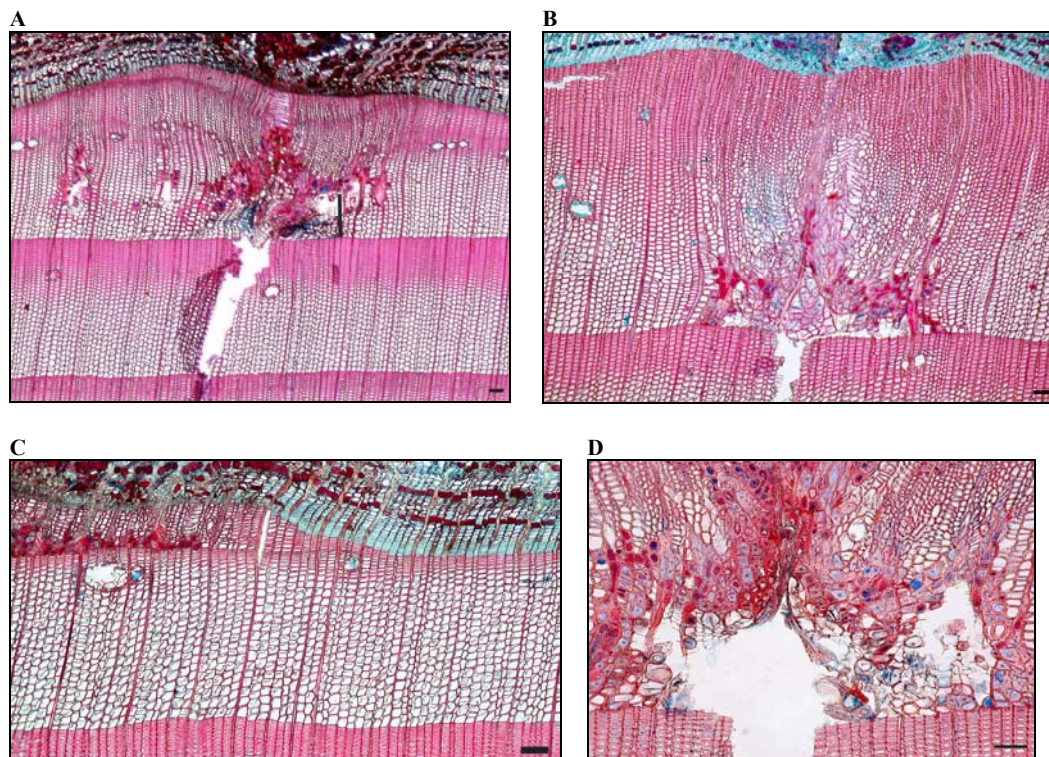
Anatomski odziv kambija na vbod z iglo se je pri smreki skozi rastno sezono razlikoval in je bil odvisen od dinamike kambijeve aktivnosti ter števila celic v fazi postkambijske rasti. Začetek in konec kambijeve delitvene aktivnosti ter nastanek kasnega lesa smo določili s primerjavami stanj tkiv pri zaporednih vbodih (slika 44B). Začetek kambijeve aktivnosti smo določili na osnovi vidnih ostankov celic v fazi postkambijske rasti, ki so se nahajale neposredno ob braniki 2002. Te celice so imele v primerjavi s kambijevimi večje radialne dimenzije (slika 43D, E, 44B). Celične stene so bile tanke in modro obarvane, kar je nakazovalo, da se procesa odlaganja sekundarne celične stene in lignifikacije še nista začela. Na višku rastne sezone so začele nastajati traheide prehodnega in kasnega lesa (slika 46B, C). Radialne dimenzije traheid so se zmanjšale, medtem ko se je debelina celične stene povečala. Konec redne kambijeve aktivnosti smo določili takrat, ko je število celic tekočega prirastka 2003 pod kalusnim tkivom sovpadalo s številom celic branike 2003 le nekoliko vstran od mesta špikljaja (slika 44C). V kalusu ni bilo zaslediti celic v postkambijski rasti, traheide kasnega lesa neposredno pod kalusom pa so bile v zaključnih fazah procesa diferenciacije. Vbod z iglo je sicer povzročil reaktivacijo kambija in s tem nastanek kalusnega tkiva na mestu ranitve, vendar je bilo očitno, da je bila branika 2003 pod kalusom zaključena (slika 44C). Pojav je bil pogost zlasti pri drevesih rastočih na nižji nadmorski višini na Sorškem polju. Terminalne traheide kasnega lesa pod kalusom so bile v zaključnih fazah procesa diferenciacije. V lumnih so bili dobro vidni ostanki citoplazme. Proces diferenciacije terminalnih traheid kasnega lesa branike 2003 smo določili po praznih lumnih in popolnoma rdeče obarvanih celičnih stenah nekaj tednov po zaključku kambijeve delitvene aktivnosti.

Prednost metode pining je bila v tem, da je vsak odvzeti vzorec vseboval tudi zaključeno braniko tekočega leta v neposredni bližini vboda, kar je bilo zelo ugodno za preračunavanje absolutnih prirastkov v relativne. Takšni podatki dajejo realnejšo sliko o dinamiki nastajanja ksilema znotraj posameznega drevesa. Poškodbe tkiv so bile pri tej metodi relativno majhne, pri čemer je bil odziv okoliškega tkiva na poškodbo z iglo manj obsežen. Zato bi bilo mogoče na istem drevesu opravljati eksperiment tudi po več let. Vendar pa poškodba z iglo ni smela biti premajhna, saj je bil v takšnem primeru odziv kambija neizrazit, nastali kalus je bil majhen in v njem največkrat ostanki kambijevih celic in celic v fazi postkambijske rasti niso bili ohranjeni. Z metodo pining ni bilo mogoče slediti sezonske dinamike nastajanja floemske branike, saj se sitaste celice niso ohranile v kalusu. Ravno tako v kalusu niso bile ohranjene vse kambijeve celice, tako da ni bilo mogoče slediti variabilnosti števila kambijevih celic skozi rastno sezono. Ker je bilo ksilemsko tkivo pod kalusom dostikrat zmečkano, smo ocenili, da meritve ksilemskega prirastka nastalega do trenutka vboda niso realne.



Slika 43: Prečni prerezi poškodovanega tkiva pri navadni smreki pri vbodu z iglo. A – Nastanek kalusa (C), travmatskih smolnih kanalov (TRC) in poranitvenega lesa (W-W) kot odziv na poškodbo, B – Tangencialna ureditev TRC (črni puščici) ter njihov nastanek v kalusu (modra puščica); C, E – Ostanki kambijevih celic (zelena puščica) in celic v postkambijski rasti (vijolična puščica) v kalusu. Pod kalusom so dobro vidne celice v fazi odlaganja sekundarne celične stene in lignifikacije (roza puščica) in zrele traheide (rjava puščica). D – Reaktivacija kambija po prenehanju redne meristemske aktivnosti kot odziv na vbod. Daljica = 100 μm

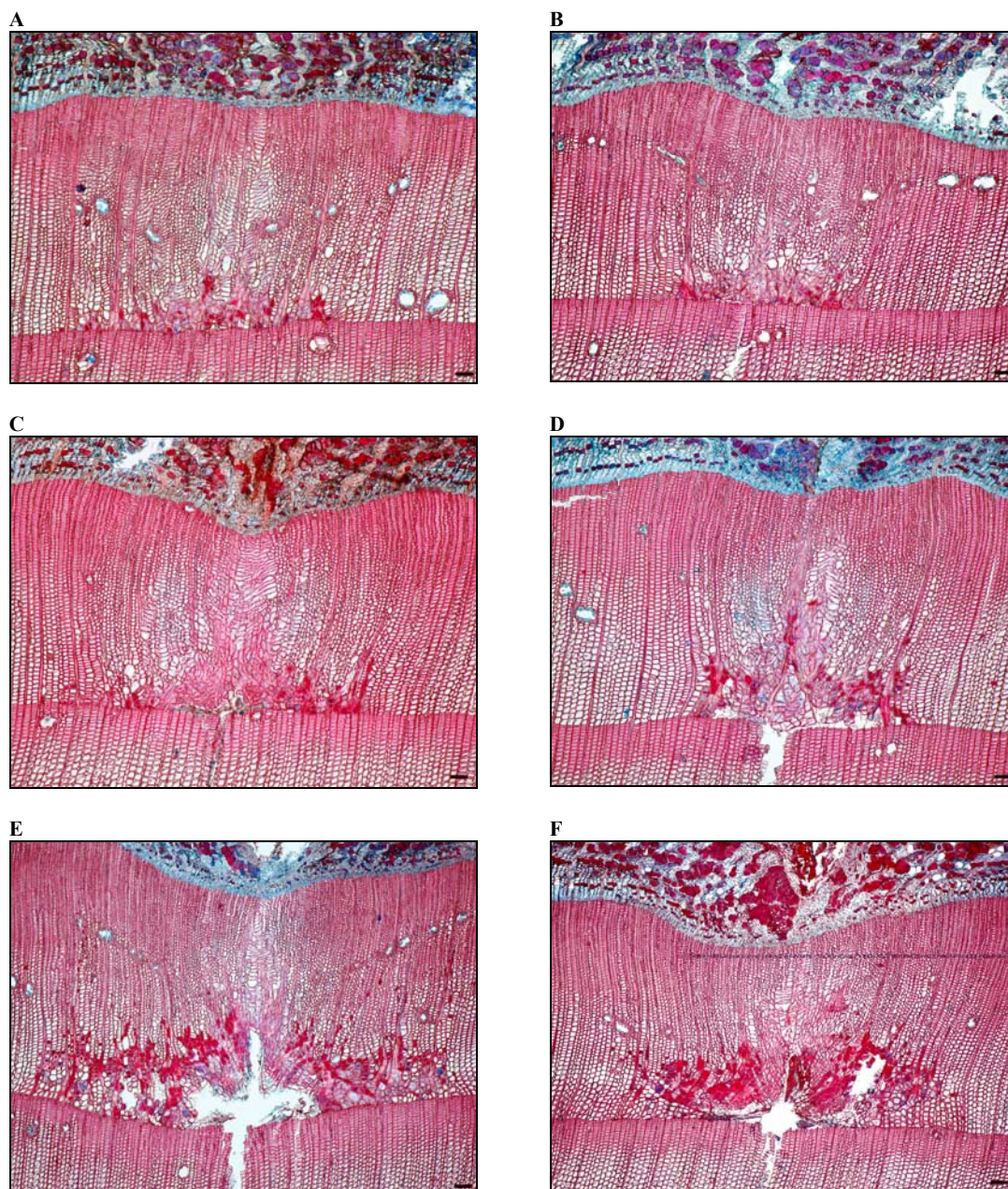
Figure 43: Light micrographs of transverse sections of pinning samples of Norway spruce. A – Formation of callus (C) traumatic resin canals (TRC) and wound-wood (W-W) as a response to wounding; B – Tangential arrangement of TRC (black arrows) and formation of the TRC in the callus (blue arrow); C, E – Residuals of cambial cells (green arrow) and radially expanding (violet arrow) in the callus. Well visible cells in the phase of secondary wall formation and lignification (red arrow) and mature tracheids (brown arrow) below the callus; D – reactivation of the cambium after cessation of the regular cambial activity as a response to pinning. Scale bars = 100 μm



Slika 44: A – Ksilski prirastek 2003 nastal do trenutka ranitve. B – Začetek kambijeve delitvene aktivnosti. V kalusu so vidne prve celice v postkambijski rasti neposredno ob raniki 2002. C – Konec kambijeve aktivnosti. D – Raztrgano tkivo v kalusu. Daljica = 100 μ m

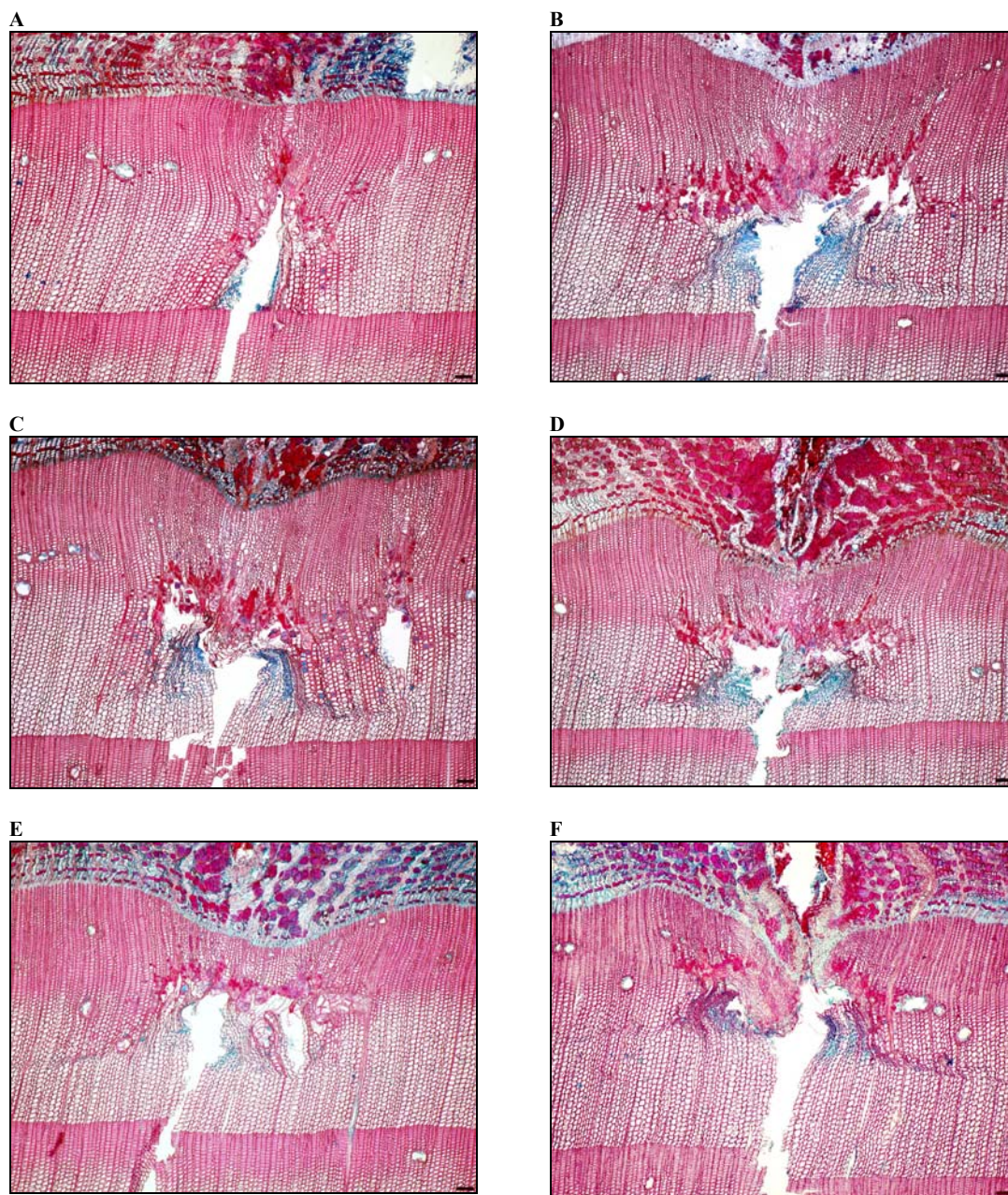
Figure 44: A - Xylem increment 2003 realized by the time of wounding with a pin; B – Onset of cambial activity. First xylem cells in the postcambial growth located in the callus adjacent to xylem growth ring 2002 are observed; C – Cessation of the cambial activity; D – Crushed tissue in the callus. Scale bars = 100 μ m

Zaporedje slik 45A, B, C, D, E, F, 46A, B, C, D, E, F in 47 prikazuje sezonsko dinamiko kambijeve aktivnosti med rastno sezono 2003 v tedenskih intervalih na primeru smreke št. 1 iz Pokljuke. Kambijeva aktivnost se je pri tem drevesu začela v obdobju med 16.5. – 23.5.2003 in zaključila v obdobju med 1.8. – 8.8.2003. Kasni les je pričel nastajati med 27.6. in 4.7.2003.



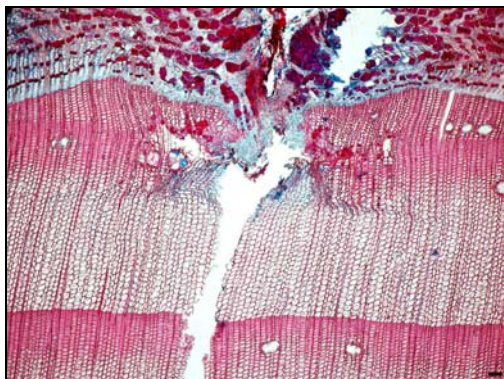
Slika 45: Nastanek ksilemske branike 2003 pri navadni smreki. A – Datum ranitve 9.5.2003. Kambijeve aktivnost se še ni pričela; B – Datum ranitve 16.5.2003. Kambijeve aktivnost se še ni pričela; C – Datum ranitve 23.5.2003. Začetek kambijeve aktivnosti; D – Datum ranitve 30.5.2003. Celice ranega lesa v fazi postkambijske rasti; E – Datum ranitve 6.6.2003. Sinteza sekundarne celične stene in lignifikacija traheid ranega lesa; F – Datum ranitve 13.6.2003. Traheide ranega lesa v procesu diferenciacije. Daljica = 100 μ m

Figure 45: Formation of xylem growth ring 2003 in Norway spruce. A – Date of wounding 9 May 2003. Cambial activity has not started yet; B – Date of wounding 16 May 2003. Cambial activity has not started yet; C – Date of wounding 23 May 2003. Onset of cambial activity; D – Date of wounding 30 May 2003. Early wood cells in postcambial growth; E – Date of wounding 6 June 2003. Synthesis of secondary cell wall and lignification of early wood tracheids; F – Date of wounding 13 June 2003. Early wood tracheids in the process of differentiation. Scale bars = 100 μ m



Slika 46: Nastanek ksilemske branike 2003 pri navadni smreki. A - Datum ranitve 20.6.2003. Prve odrasle traheide ranega lesa; B - Datum ranitve 27.6.2003. Začetek nastajanja prehodnega lesa; C - Datum ranitve 4.7.2003. Pričetek nastajanja kasnega lesa; D - Datum ranitve 11.7.2003. Nastajanje traheid kasnega lesa; E - Datum ranitve 18.7.2003. Traheide kasnega lesa v procesu diferenciacije; F - Datum ranitve 25.7.2003. Nastanek zadnjih traheid kasnega lesa branike 2003. Daljica = 100 μ m.

Figure 46: Formation of xylem growth ring 2003 in Norway spruce. A - Date of wounding 20 June 2003. First fully developed tracheids of early wood; B - Date of wounding 27 June 2003. Onset of transition from early to late wood; C - Date of wounding 4 July 2003. Onset of late wood formation; D - Date of wounding 11 July 2003. Formation of late wood tracheids; E - Date of wounding 18 July 2003. Late wood tracheids in the process of differentiation; F - Date of wounding 25 July 2003. Formation of the terminal late wood tracheids of xylem growth increment 2003. Scale bars = 100 μ m



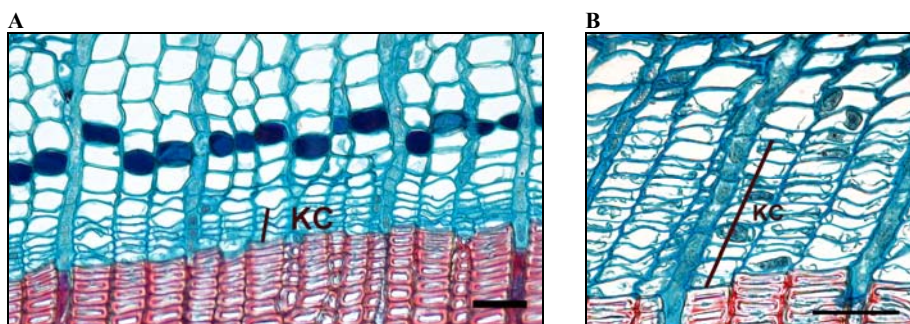
Slika 47: Nastanek ksilemske branike 2003 pri navadni smreki. Datum ranitve 1.8.2003. Konec kambijeve aktivnosti. Terminalne traheide kasnega lesa pod kalusom so v zaključnih fazah diferenciacije. Daljica = 100 μ m.

Figure 47: Formation of xylem growth ring 2003 in Norway spruce. Date of wounding 1 August 2003. Cessation of the cambial activity. Terminal late wood tracheids below the callus in the final stages of differentiation. Scale bars = 100 μ m

4.1.2 Rezultati odvzema intaktnih vzorcev

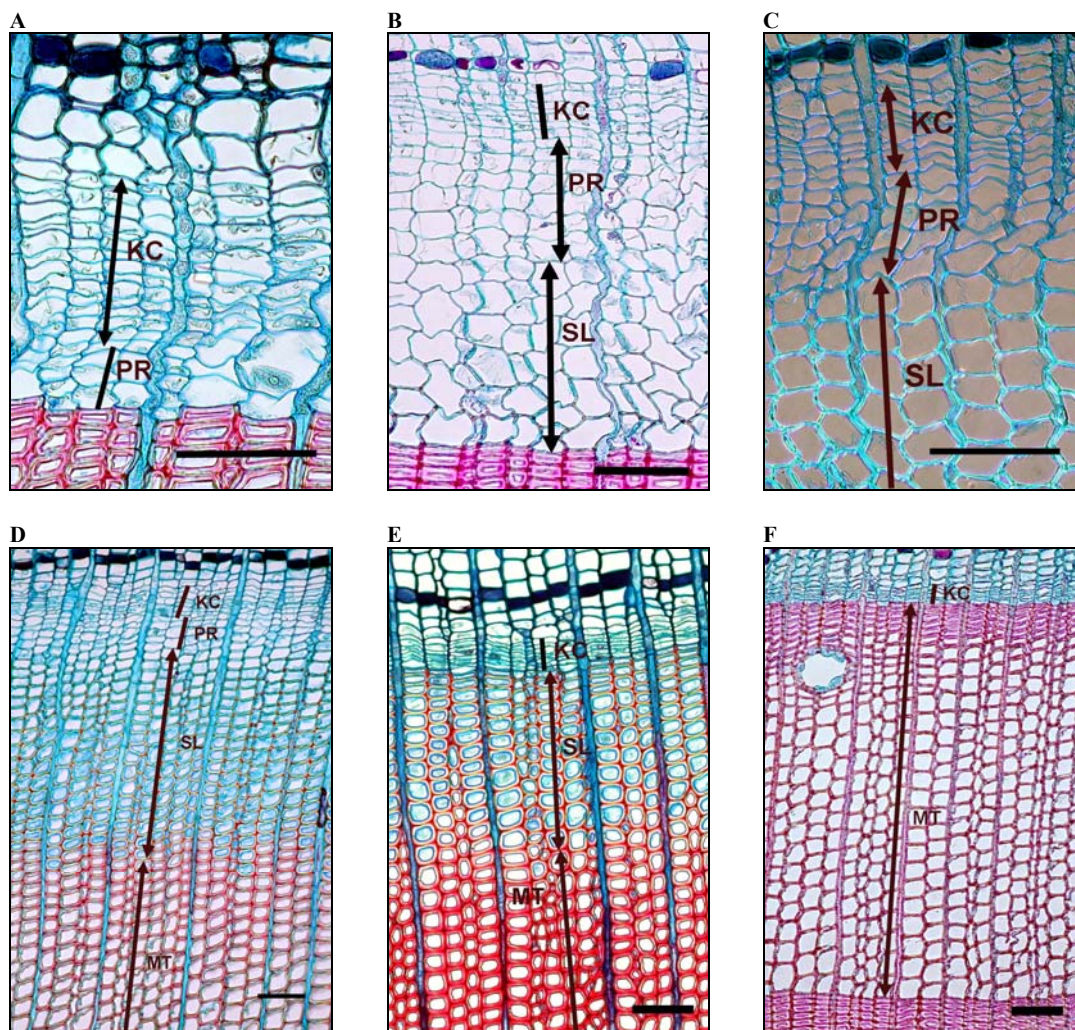
Druga metoda za proučevanje sezonske dinamike nastanka ksilemske branike 2003 je bila odvzemanje intaktnih vzorcev floema, kambija in ksilema. Metodo smo uporabili pri smreki in jelki. Preparate smo pregledali s presevnim mikroskopom in polarizirani svetlobi. Pri vzorčenju je bilo najbolj kritično obdobje v maju in juniju; v obdobju nastajanja ranega lesa. Kambij je bil takrat zelo širok, sestavljen iz več kot 10 slojev celic (slika 48B, 49A). V tem obdobju je bilo tudi največje število celic ranega lesa v postkambijski rasti, ki so imele velike radialne dimenzije in tanke celične stene (slika 49A, B, C), zato so se pri odvzemu vzorci zlahka porušili. S to metodo smo brez težav določili začetek in konec kambijeve aktivnosti in nastajanja ksilemske branike 2003. Število celic v kambiju je tedaj naraslo (podvojilo), pojavile so se prve traheide ranega lesa v postkambijski rasti (slika 49A). Ko se je kambijeva aktivnost zaključila, se je število kambijevih celic zmanjšalo, celic v zgodnjih fazah diferenciacije nismo zasledili, zadnje nastale traheide kasnega lesa neposredno pod kambijem pa so bile v procesu sinteze sekundarne celične stene in lignifikacije (slika 49E). Za raziskave sezonske dinamike posameznih procesov ksilogeneze se je izkazal odzem intaktnih vzorcev kambijevega tkiva ustrežnejši kot metoda pining. Celice v različnih fazah diferenciacije so bile dobro ohranjene, vključno s kambijevimi celicami (slika 49D). Kambijeve celice smo prepoznali po ozkih radialnih dimenzijah ter modro obarvanih (nelignificiranih) tankih primarnih celičnih stenah. Celice dormantnega kambija so imele debelejšje, celice aktivnega kambija pa tanjše celične stene (slika 48A, B). Ksilemske celice v fazi postkambijske rasti so bile obdane le s tanko, modro obarvano, nelignificirano primarno celično steno. Vendar pa so bile njihove radialne dimenzije večje v primerjavi z radialnimi dimenzijami kambijevih celic, zlasti pri traheidah ranega lesa (slika 49A). Začetek sinteze sekundarne celične stene smo določili v polarizirani svetlobi (slika 49C). Tanko celična stena se je z odlaganjem slojevite sekundarne celične stene vidno debelila. Iz celičnih vogalov je v centripetalni

smeri celične stene rdeča barva nadomestila modro, kar je nakazovalo začetek lignifikacije celičnih sten traheid (slika 49B, D). Modro obarvane notranje plasti celičnih sten ob lumnu ter prisotni ostanki citoplazme v lumnih so bili značilni za še ne popolnoma formirane ksilemske celice (slika 49E). Ko se je proces diferenciacije zaključil, so bile celične stene rdeče obarvane, lumni pa prazni (slika 49F). Pri metodi odvzemanja intaktnih vzorcev, so se ohranile tudi floemske celice (slika 48A, 49A). Ta metoda omogoča proučevanje sezonske dinamike kambijeve aktivnosti in celične diferenciacije tudi na floemski strani. Ker so bile ohranjene vse kambijeve celice, smo lahko sledili variabilnost v številu kambijevih celic tekom rastne sezone. Dreves nam ob koncu eksperimenta ni bilo potrebno posekati, vendar pa lahko večletno vzorčenje istega drevesa vpliva na njegovo dolgoročno rast in razvoj. Ker so bili odvzeti vzorci relativno veliki ($1 \times 1 \times 3 \text{ cm}^3$), so bile potrebne večje razdalje med dvema sosednjima vzorcema kot pri piningu zaradi obsežnejšega odziva tkiva na poškodovanje. Pri intaktnih vzorcih celotna branika 2003 ni ohranjena na preparatih, zato je potrebno pri preračunavanju absolutnih prirastkov v relativne uporabiti podatke o širinah starejših branik (Rossi in sod., 2003, Čuden, 2005).



Slika 48: A – Dormanten kambij pri jelki sestavljen iz 7 do 8 slojev celic z majhnimi radialnimi dimenzijami in debelejšimi celičnimi stenami. B – Ob kambijeви aktivnosti se je število celic v kambiju podvojilo. KC – kambijeve celice; daljica = 50 μm

Figure 48: A – Dormant cambium in silver fir composed of 7 to 8 layers of cells with narrow radial dimensions and thick cell walls. B – Number of cambial cells redoubled when the cambium activated. KC – cambial cells; scale bars = 50 μm



Slika 49: Faze nastajanje ksilemske branike pri smreki in jelki. A – Širok kambij in prve oblikovane ksilemske celice v postkambijski rasti. B – Lignifikacija celičnih sten traheid se je pričela v celičnih vogalih in in smo jo prepoznali po rdečem obarvanju. C – Meja med fazo postkambijske rasti in sinteze sekundarne stene je bila najbolj jasna pod polarizirano svetlobo. D – Število celic v kambiju se je med nastajanjem kasnega lesa začelo zmanjševati. Zrele traheide z rdeče obarvanimi celičnimi stenami in praznimi lumni. E – Po zaključku kambijeve aktivnosti je razvoj zadnjih nastalih traheid kasnega lesa še nekaj časa potekal. F – Popolnoma oblikovana ksilemska branika 2003. KC – kambijeve celice, PR – ksilemske celice v postkambijski rasti, SL – ksilemske celice v fazi odlaganja sekundarne celične stene in lignifikacije, MT – zrele traheide; daljica = 100 μm

Figure 49: Phases of the xylem growth ring formation in spruce and fir. A – Wide cambium and first formed xylem cells in postcambial growth. B – Lignification of cell walls of tracheids started at cell corners and was visible by red staining. C – The boundary between the phase of postcambial growth and secondary cell wall synthesis was most distinctive under polarized light. D – Number of cells in the cambium started to decrease during late wood formation. Mature tracheids with red stained cell walls and empty cell lumina. E – After the cessation of the cambial activity, the development of the latest formed tracheids continued for same time. F – Completely formed xylem growth ring 2003. KC – cambial cells, PR – xylem cells in postcambial growth, SL – xylem cells undergoing secondary cell wall deposition and lignification, MT – mature tracheids; scale bars = 100 μm

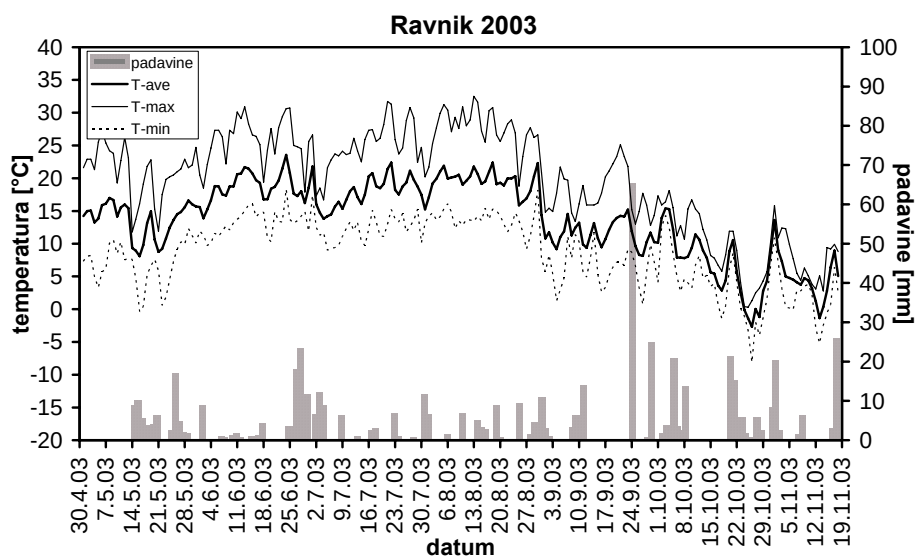
4.2 KSILOGENEZA PRI JELKI IN SMREKI NA RAZLIČNIH RASTIŠČIH

Za vsako drevo smo opravili analize tedensko odvzetih vzorcev, nato smo za vsako rastišče narisali krivuljo povprečne dinamike nastajanja ksilemske branike 2003. Izdelali smo modelno krivuljo debelinske rasti vzorčnih dreves za posamezno rastišče z uporabo Gompertzove funkcije.

4.2.1 Ksilogeneza pri jelkah na Ravniku

4.2.1.1 Klimatske razmere na Ravniku v rastni sezoni 2003

Povprečne, maksimalne in minimalne dnevne temperature zraka in količino padavin smo s pomočjo vremenske postaje na Ravniku beležili od 16. aprila do 19. novembra 2003, t.j. v obdobju vzorčenja tkiv iz dreves (slika 50). Na začetku vegetacije so bile temperature nadpovprečno visoke, nad 25°C preko dneva, vendar je v sredini maja sledila kratkotrajna ohladitev s snegom, ko so se temperature ponoči spustile pod ledišče. V letu 2003 je bilo za celo Evropo značilno izjemno vroče in suho poletje. Najvišje temperature na Ravniku so se poleti kar nekajkrat dvignile nad 30°C. Nočne temperature so se gibale okoli 10°C. Količina padavin je bila v poletnih mesecih majhna, v povprečju 60 mm/mesec. Konec avgusta pa so temperature na hitro padle pod 10°C, količina padavin pa se je podvojila. Temperature so se septembra in oktobra postopoma zniževale. Konec oktobra je zapadel prvi sneg, temperature pa so se spustile pod ledišče.



Slika 50: Povprečne, maksimalne in minimalne dnevne temperature zraka ter količina padavin na Ravniku (600 m n.m.) v rastni sezoni 2003.

Figure 50: Average, maximum and minimum daily air temperatures and amount of precipitation at Ravnik (600 m a.s.l.) in the vegetation period of 2003. Datum = date, temperatura = temperature, padavine = precipitation

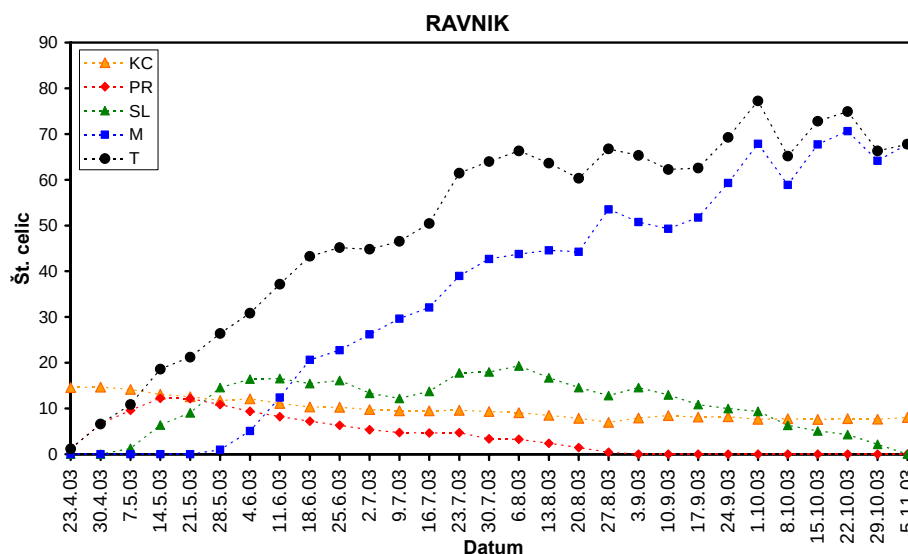
4.2.1.2 Dinamika nastajanja ksilemske branike pri jelkah na Ravniku

Dinamiko nastajanja ksilemske branike pri testnih jelkah na Ravniku smo proučevali na 4 drevesih, iz katerih smo v tedenskih intervalih odvezemali intaktne vzorce tkiv. Glede na čas odvzema vzorcev so se sestava in število celic v posameznih fazah diferenciacije spreminjali, kar smo kvantificirali s štetjem celic v radialnih nizih v vsaki razvojni fazi. Ksilemska branika 2003 je pri vseh drevesih začela nastajati konec aprila, med 23.4. in 30.4.2003 (slika 51). Število celic v kambiju je bilo tedaj povečano na 15 slojev. Med prvimi nastalimi traheidami ranega lesa, ki so bile v fazi postkambijske rasti, smo mestoma ob braniki 2002 zasledili celice aksialnega parenhima. To potrjuje, da je aksialni parenhim pri navadni jelki marginalen (Wagenführ, 1969), in sicer inicialen. Sinteza sekundarne celične stene in lignifikacija se je v najstarejših lesnih celicah pričela približno 2 tedna po začetku kambijeve aktivnosti, med 7.5. in 14.5.2003. Inicialne traheide ranega lesa z velikimi radialnimi dimenzijami in tankimi celičnimi stenami pa so za popoln razvoj potrebovale približno 4 tedne (30.4.-28.5.2003). Prehod iz ranega v kasni les smo zasledili v začetku julija, ko je že nastalo približno 70% celotne ksilemske branike 2003 (preglednica 12). Iz slike 51 je razvidno, da je bila dinamika nastajanja ksilemske branike 2003 največja v prvi polovici rastne sezone. V drugi polovici junija se je število celic v kambiju že nekoliko zmanjšalo. V začetku julija je število upadlo pod 10 slojev. V obdobju nastajanja kasnega lesa se je število kambijevih celic postopoma še zmanjševalo. Ko so se celične delitve konec avgusta (20.8.-27.8.2003) zaključile, je kambij štel med 7 in 8 slojev celic. Število celic v fazi postkambijske rasti je doseglo vrhunec v drugi polovici maja (13 slojev celic), nato je počasi začelo upadati. V obdobju nastajanja kasnega lesa je bilo v postkambijski rasti maksimalno 5 slojev celic (slika 51). Dinamika odlaganja sekundarne celične stene in lignifikacije je bila od konca maja do sredine septembra bolj ali manj konstantna (10-16 slojev celic). Zatem je število celic v zaključnih fazah procesa diferenciacije pričelo upadati. Razvoj terminalnih traheid kasnega lesa z majhnimi radialnimi dimenzijami in debelimi celičnimi stenami je potekal skorajda 2 meseca (do konca oktobra) po zaključku delitev v kambiju. V predhodni študiji smo ugotovili, da je bil zaključek diferenciacije terminalnih traheid kasnega lesa odvisen od trajanja kambijeve aktivnosti (Schmitt in sod., 2003, Gričar in sod., 2003a, b, 2005a). Pri navadni jelki z ozkimi branikami oziroma manj produktivnim kambijem se je razvoj zadnjih nastalih celic končal prej kot pri drevesih s širokimi branikami, kjer se je zaključil v pozni jeseni (Gričar in sod., 2003a, b, 2005a).

Preglednica 12: Podatki o začetku in koncu kambijeve aktivnosti ter prehodu iz ranega v kasni les pri posameznih jelkah na Ravniku v letu 2003. KA – kambijeva aktivnost, RL – rani les, KL – kasni les

Table 12: Data on beginning and cessation of cambial activity and transition from early to late wood in individual silver fir trees at Ravnik in the year 2003. KA – cambial activity, RL – early wood, KL – late wood

št. drevesa no. of tree	začetek KA onset of KA	prehod RL/KL transition RL/KL	konec KA end of KA
191	23.4.-30.4.03	2.7.-9.7.03	20.8.-27.8.03
193	23.4.-30.4.03	2.7.-9.7.03	27.8.-3.9.03
199	23.4.-30.4.03	9.7.-16.7.03	27.8.-3.9.03
208	23.4.-30.4.03	9.7.-16.7.03	27.8.-3.9.03

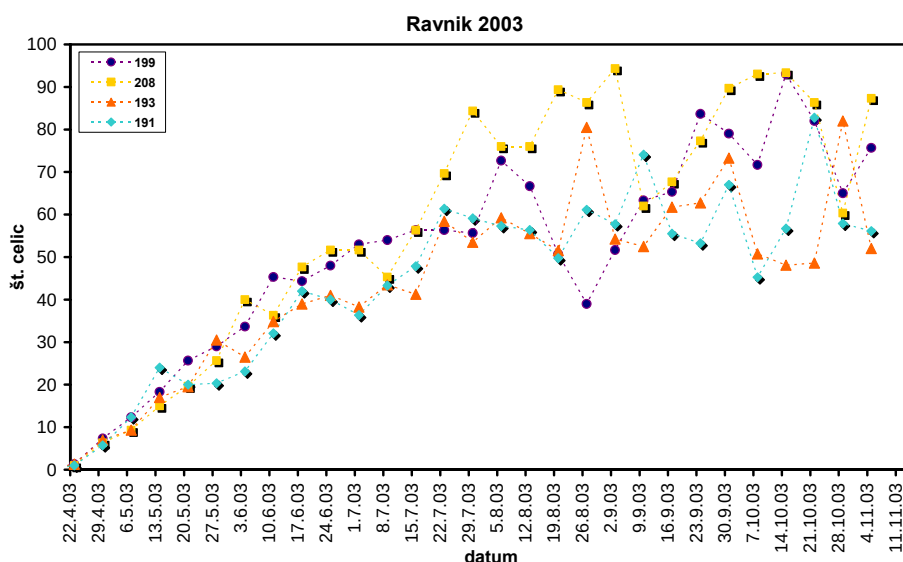


Slika 51: Povprečna dinamika nastajanja ksilemske branike in posameznih faz ksilogeneze pri vseh proučevanih jelkah na Ravniku v rasti sezoni 2003 raziskovana z metodo odvzema intaktnih vzorcev. KC – kambijeve celice, PR – celice v postkambijski rasti, SL – celice v fazi sinteze sekundarne celične stene in lignifikacije, M – zrele traheide, T – skupno število nastalih ksilemskih celic

Figure 51: Average dynamics of xylem growth ring formation and individual phases of xylogenesis in all investigated Silver fir trees at Ravnik in growth period 2003 examined with intact tissue sampling method. KC – cambial cells, PR – cells in postcambial growth, SL – cells in phase of secondary cell wall synthesis and lignification, M – mature tracheids, T – total number of formed xylem cells, datum = date, št. celic = no. of cells

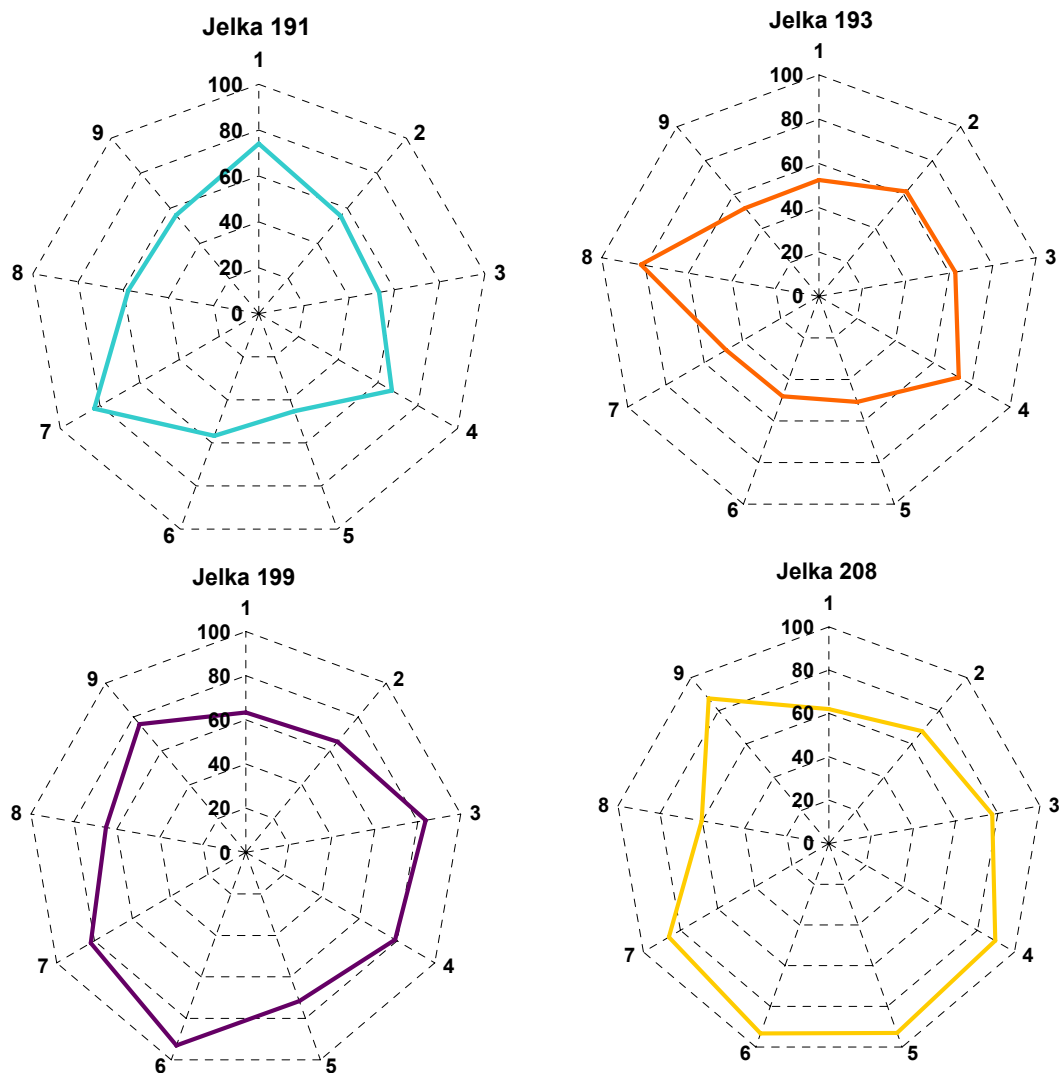
Za proučevane jelke na Ravniku smo izdelali model razvoja ksilemske branike 2003 z uporabo Gompertzove funkcije. Variabilnost v končni širini ksilemskih branik 2003 je bila med posameznimi drevesi na Ravniku med 45 in 93 celicami (slika 52). Velika je bila tudi variabilnost v številu celic oziroma širini branike po obodu debla v posameznem drevesu (slika 53). Te razlike so rezultat različne kambijeve aktivnosti na različnih mestih v drevesu in se lahko kažejo tudi kot »negativni prirastek« (ksilemski prirastek v določenem tednu je manjši kot v predhodnem). Takšna variabilnost popači poskus dejanskega ovrednotenja rasti dreves na posameznem rastišču. »Negativni prirastki« v ksilemskih branikah v posameznem drevesu so bili opazni predvsem v drugi polovici rastne sezone (v obdobju nastajanja kasnega lesa), ko je stopnja delitev v kambiju upadla in je nastalo manj celic v daljšem časovnem obdobju (slika 52). Po zaključku kambijeve aktivnosti smo sledili razvoj zadnjih nastalih traheid kasnega lesa (slika 53). Vzorce smo odzemasli po obodu drevesa, s čimer smo istočasno dobili podatek o variabilnosti v številu celic v zaključeni ksilemski braniki 2003. Preračunavanje izmerjenih tedenskih prirastkov in uporaba različnih funkcij, ki se prilegajo biološkemu trendu sezone rasti drevesa, skušajo odpraviti variabilnost v številu celic oziroma širini znotraj iste branike ter s tem ustrezno oceniti ksilemski razvoj posameznega drevesa oziroma izbranega rastišča tekom rastne sezone (Rossi in sod., 2003, Deslauriers, 2003, Deslauriers in sod., 2003a, b, Deslauriers in Morin, 2005). Pri združitvi debelinskih rastišnih krivulj več dreves, prirastek v številu celic skozi rastišno sezono sledi krivulji v obliki črke S, ki je reprezentativna za

določeno drevesno populacijo. Četudi na debelinsko rast dreves vplivajo klimatski dejavniki, se oblika krivulje ne spreminja. Rast v obliki črke S kaže na 2 različni razvojni fazi: pozitivna eksponentna faza, ki ji sledi upadajoča stopnja rasti. Številni sigmoidni modeli opisujejo te procese, vendar pa se je Gompertzova funkcija izkazala za najustreznejšo zaradi asimetrične oblike. Pri logistični funkciji, na primer, je točka prevoja simetrična, pri Gompertzovi funkciji pa je dosežena pri nižji stopnji, kar se kaže v krajši pozitivni eksponentni fazi in se bolje prilagaja debelinski rasti dreves (Zeide, 1993, 2004, Deslauriers in sod., 2003a, b, Rossi in sod., 2003).



Slika 52: Dinamika nastanka ksilemske branike pri posameznih proučevanih jelkah na Ravniku v rastni sezoni 2003.

Figure 52: Dynamics of xylem growth ring formation in individual investigated silver firs at Ravnik in growth period 2003. *Datum* = date, *št. celic* = no. of cells



Slika 53: Prikaz variabilnosti v številu celic v ksilemski braniki 2003 po obodu drevesa pri posamezni jelki na Ravniku. Vzorci so bili odvzeti po zaključku kambijeve aktivnosti, ko diferenciacija zadnjih nastalih traheid še ni bila zaključena.

Figure 53: Illustration of variability in the number of cells in xylem growth ring 2003 around the stem in individual silver firs at Ravnik. Samples were taken after the cessation of the cambial activity when differentiation of the latest formed tracheids still continued. *Jelka 191 = fir 191, jelka 193 = fir 193, jelka 193 = fir 193, jelka 193 = fir 193*

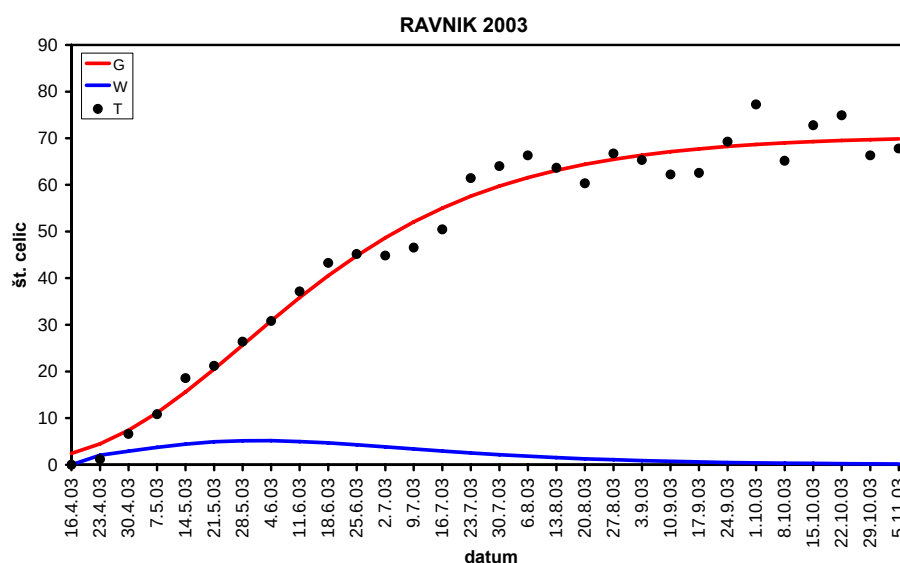
V programu Statgraphics smo izračunali modelno krivljo nastanka ksilemske branike 2003 za Ravnik z uporabo Gompertzove funkcije:

$$y = A \exp(-\exp(B - k * t))$$

kjer je y tedenska kumulativna vsota celic, t so Julijanski dnevi, A zgornja asimptota in predstavlja maksimalno število celic, B mesto na osi x in predstavlja začetek kambijeve aktivnosti ter k mesto prevoja krivulje. Za Ravnik smo dobili naslednje vrednosti:

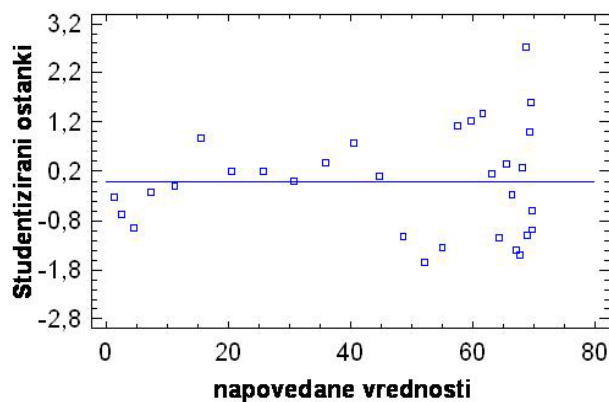
$$y = 70,564 \exp(-\exp(4,2464 - 0,0286 * t))$$

Z Gompertzovo funkcijo je bilo ocenjeno skupno število celic v braniki 2003 pri testnih jelkah na 70 slojev (slika 54). Največja produkcija celic naj bi bila od sredine maja do sredine junija. Po modelu se je produkcija novih celic zaključila konec avgusta. Povprečno dejansko število celic je na sliki prikazano s črnimi pikami (slika 54) in se prilegajo izračunani krivulji 97%. Večja odstopanja podatkov od izračunane krivulje se kažejo ob koncu vegetacije, ko se je kambijeva rast zelo upočasnila in kasneje tudi zaključila. Takrat je prišla variabilnost v številu celic po obodu drevesa zelo do izraza (slika 55). Porazdelitev studentiziranih ostankov kaže, da je bila le ena vrednost večja kot 2, vendar manjša od 3, kar pomeni, da se model v tej točki (t.i. regresijski osamelec) ni dobro prilegal dejanskim podatkom.



Slika 54: Model (rdeča črta) dinamike nastajanja ksilemske branike pri jelkah na Ravniku v rastni sezoni 2003. Črne pike označujejo dejanske povprečne vrednosti, modra črta pa izračunan tedenski prirastek celic. G – Gompertzova funkcija, W – tedenski prirastki, T – dejanski prirastki

Figure 54: Model e (red line) of the dynamics of xylem growth ring formation in silver firs at Ravnik in growth period 2003. Black points mark actual average values. Blue line shows calculated weekly increment of cells. G – Gompertz function, W – weekly increment, T – actual increments, *datum* = date, *št. celic* = no. of cells



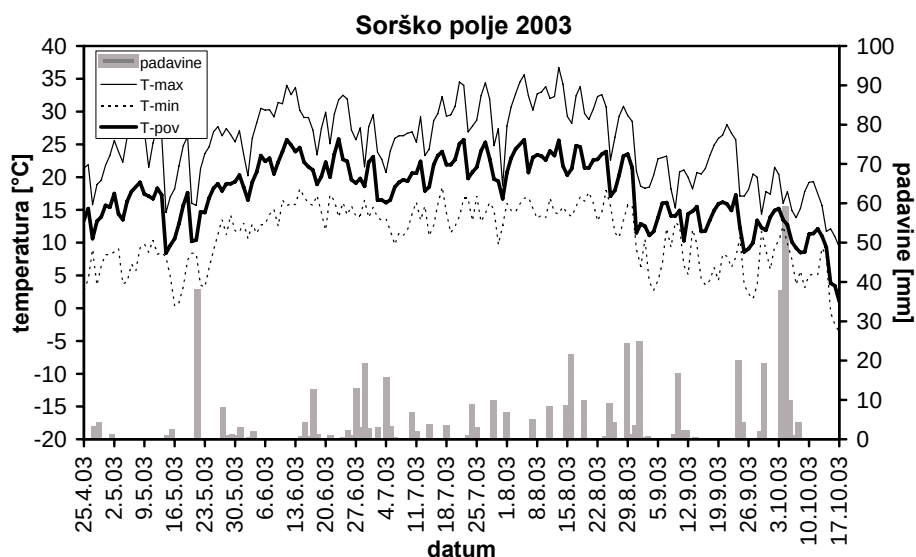
Slika 55: Prikaz razporejenosti ostankov v pasu -3 do +3 za modelno funkcijo. V tem primeru je le ena vrednost večja kot 2, vendar manjša od 3.

Figure 55: Distribution of the residuals in the zone between -3 and +3 for a model curve. In this case, there is only one residual greater than 2, but none greater than 3.

4.2.2 Ksilogeneza pri smrekah na Sorškem polju

4.2.2.1 Klimatske razmere na Sorškem polju v rastni sezoni 2003

Povprečne, maksimalne in minimalne dnevne temperature zraka in količino padavin smo za rastišče Sorško polje dobili z meteorološke postaje z Brnika. Na sliki 55 so prikazane klimatske razmere od 25. aprila do 19. oktobra 2003, v obdobju vegetacije. Podobno kot na Ravniku so bile tudi tukaj temperature na začetku vegetacije nadpovprečno visoke, nad 25°C, količina padavin pa majhna. Sredi maja so se ob prehodnem hladnem obdobju nočne temperature zelo približale ledišču. Junij, julij in avgust so bili zelo vroči in suhi meseci. Povprečna količina padavin v tem obdobju je bila okoli 55 mm/mesec. Minimalne temperature so redko padle pod 10°C, maksimalne temperature pa so se dostikrat približale ali celo presegle 35°C. Konec avgusta je sledil nenaden prehod v hladnejše obdobje, ko se je količina padavin podvojila, minimalne temperature so se nekajkrat spustile pod 5°C. Temperature so se nato postopno spuščale, do prvega snega konec oktobra, ko je bila povprečna temperatura zraka malo nad lediščem.



Slika 56: Povprečne, maksimalne in minimalne dnevne temperature zraka ter količina padavin na Sorškem polju (350 m n.v.) v rastni sezoni 2003.

Figure 56: Average, maximum and minimum daily air temperatures and amount of precipitation at Sorško polje (350 m a.s.l.) in the vegetation period of 2003. *Datum* = date, *temperatura* = temperature, *padavine* = precipitation

4.2.2.2 Dinamika nastajanja ksilemske branike pri smrekah na Sorškem polju

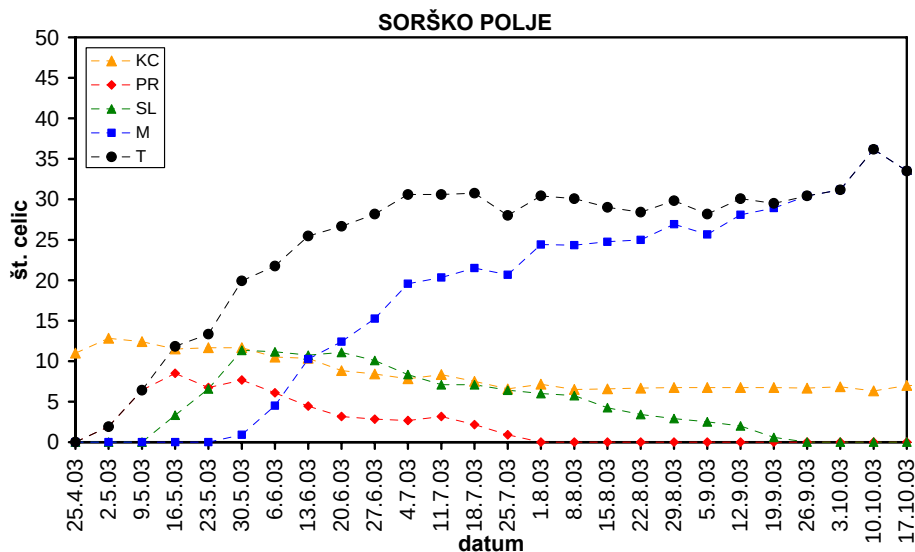
Za raziskave dinamike nastanka ksilemskih branik sta se pri vzorčnih smrekah na Sorškem polju in na Pokljuki obe metodi (ITSM in PM) izkazali kot ustrezni. Rezultati obeh metod so bili med seboj primerljivi (slika 57, 58). Analize dinamike posameznih faz ksilogeneze (postkambijske rasti, odlaganja sekundarne stene in lignifikacije ter zrelih traheid) pa smo opravili le na intaktnih vzorcih tkiv, ki so se izkazali primernejši za tovrstne študije (slika 57). Prve celice ksilemske branike so se pri smrekah na Sorškem polju oblikovale konec aprila, med 25. 4. in 2. 5. 2003. Kambijeva delitvena aktivnost se je pričela že prej. Število celic v kambiju se je najprej povečalo na 14 slojev (slika 57). Inicialne traheide ranega lesa v fazi postkambijske rasti so imele velike radialne dimenzije. Sinteza sekundarne celične stene se je pri prvih celicah začela 2 tedna kasneje (med 9.5 in 16.5.2003). Prve celice ranega lesa so za popoln razvoj potrebovale 4 tedne (23.5.-30.5.2003). Prehod iz ranega v kasni les je bil viden v prvi polovici junija, ko je bilo oblikavano 74% celotne ksilemske branike 2003 (preglednica 13). V drugi polovici rastne sezone se je število kambijevih celic zmanjšalo na manj kot 10 slojev. Kambijeva delitvena aktivnost se je na tem rastišču v letu 2003 zaključila konec julija, med 25.7 in 1.8.2003. Število celic v dormantnem kambiju se je zmanjšalo na 6 do 7 slojev. Stopnja postkambijske rasti je bila največja (do 8 slojev celic) v obdobju nastajanja ranega lesa (od 2.5 do 13.6.2003) (slika 57). Zatem je začela upadati do popolnega zaključka konec julija. Dinamika odlaganja sekundarne celične stene in lignifikacije je bila nekoliko večja v prvi polovici rastne sezone (23.5. in 27.6.2003), ko je bilo v tej fazi nad 10 slojev celic. Med nastajanjem kasnega lesa je bila dinamika odlaganja sekundarne celične stene in lignifikacije bolj ali manj konstantna do

sredine avgusta (med 5-10 slojev celic). Razvoj terminalnih traheid kasnega lesa se je po zaključku delitev v kambiju nadaljeval še približno 7 tednov, do sredine septembra.

Preglednica 13: Podatki o začetku in koncu kambijeve aktivnosti ter prehodu iz ranega v kasni les pri smrekah na Sorškem polju v letu 2003. Smreke vzorčene z ITSM so označene s št. 1, 3, 4 in 5, smreke vzorčene s PM pa s št. 11, 12, 13, 14 in 15. KA – kambijeve aktivnost, RL – rani les, KL – kasni les, ITSM – vzorčenje intaktnih tkiv, PM – pining

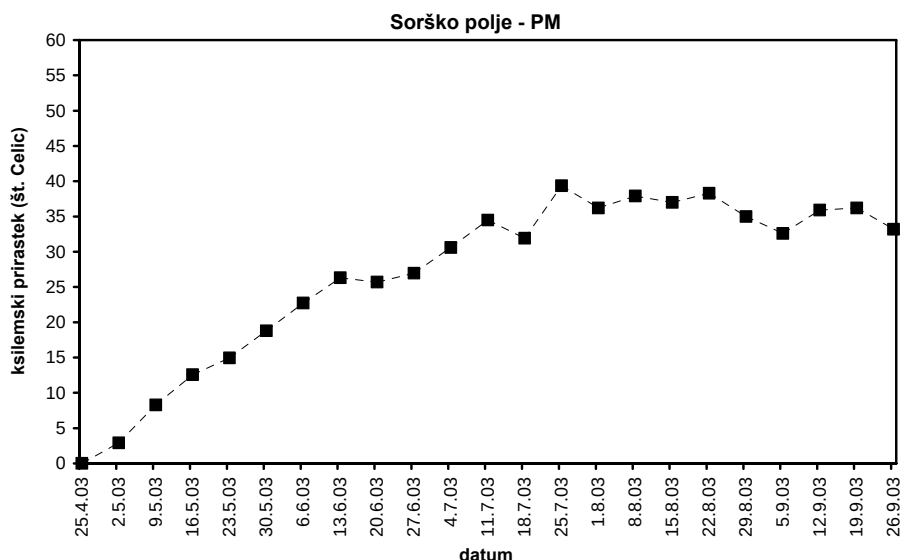
Table 13: Data on beginning and cessation of cambial activity and transition from early to late wood in individual Norway spruce trees at Sorško polje in the year 2003. Spruce sampled by ITSM are marked with nos. 1, 3, 4 and 5, and trees sampled by PM are marked with nos. 11, 12, 13, 14 and 15. KA – cambial activity, RL – early wood, KL – late wood, ITSM – sampling of intact tissue, PM – pinning

št. drevesa no. of tree	začetek KA onset of KA	prehod RL/KL transition RL/KL	konec KA end of KA
1	24.4.-2.5.03	13.6.-20.6.03	18.7.-25.7.03
3	24.4.-2.5.03	13.6.-20.6.03	25.7.-1.8.03
4	24.4.-2.5.03	13.6.-20.6.03	25.7.-1.8.03
5	24.4.-2.5.03	6.6.-13.6.03	18.7.-25.7.03
11	2.5.-9.5.03	6.6.-13.6.03	18.7.-25.7.03
12	24.4.-2.5.03	6.6.-13.6.03	11.7.-18.7.03
13	24.4.-2.5.03	6.6.-13.6.03	18.7.-25.7.03
14	24.4.-2.5.03	6.6.-13.6.03	11.7.-18.7.03
15	24.4.-2.5.03	6.6.-13.6.03	11.7.-18.7.03



Slika 57: Povprečna dinamika nastajanja ksilemske branike in posameznih faz ksilogeneze pri vseh proučevanih smrekah na Sorškem polju v rastni sezoni 2003 z metodo odvzema intaktnih vzorcev. KC – kambijeve celice, PR – celice v postkambijski rasti, SL – celice v fazi sinteze sekundarne celične stene in lignifikacije, M – zrele traheide, T – skupno število nastalih ksilemskih celic, ITSM – vzorčenje intaktnih tkiv, PM – pining

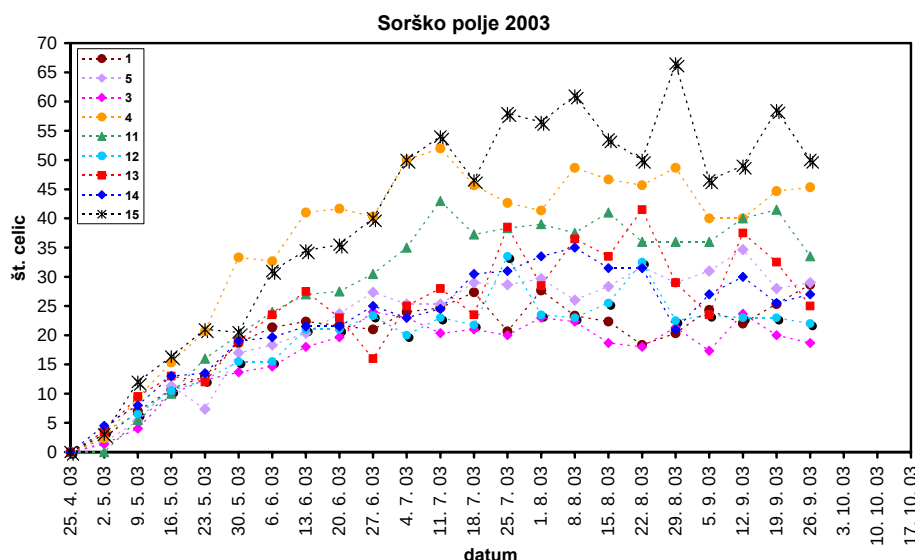
Figure 57: Average dynamics of xylem growth ring formation and individual phases of xylogenesis in all investigated Norway spruce trees at Sorško polje in growth period 2003 with intact tissue sampling method. KC – cambial cells, PR – cells in postcambial growth, SL – cells in phase of secondary cell wall synthesis and lignification, M – mature tracheids, T – total number of formed xylem cells, ITSM – sampling of intact tissue, PM – pinning, datum = date, št. celic = no. of cells



Slika 58: Povprečna dinamika nastajanja ksilemske branike pri vseh proučevanih smrekah na Sorškem polju v rasti sezoni 2003 ugotovljena z metodo pinning.

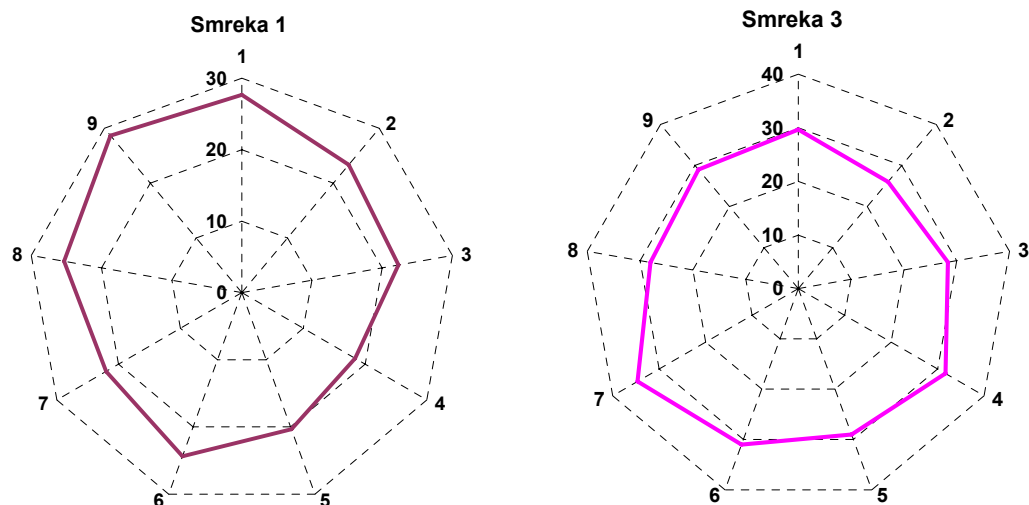
Figure 58: Average dynamics of xylem growth ring formation in all investigated Norway spruce trees at Sorško polje in growth period 2003 obtained with pinning method. *Datum* = date, *št. celic* = no. of cells

Tudi na Sorškem polju smo iz vzorčnih smrek izdelali model nastanka ksilemske branike 2003 z uporabo Gompertzove funkcije. Iz modela smo izločili drevesa št. 4, 11 in 15, ki so po končni širini branik 2003 in po dinamiki debelinske rasti razlikovala od preostalih proučevanih smrek (slika 59). Gompertzovo krivuljo smo tako za to rastišče izračunali za 6 dreves. Variabilnost v končni širini ksilemskih branik 2003 je bila med posameznimi drevesi na Sorškem polju med 18 in 34 slojev celic (slika 59). Velika je bila tudi variabilnost v številu celic oziroma širini branike po obodu debla v posameznem drevesu (slika 60).

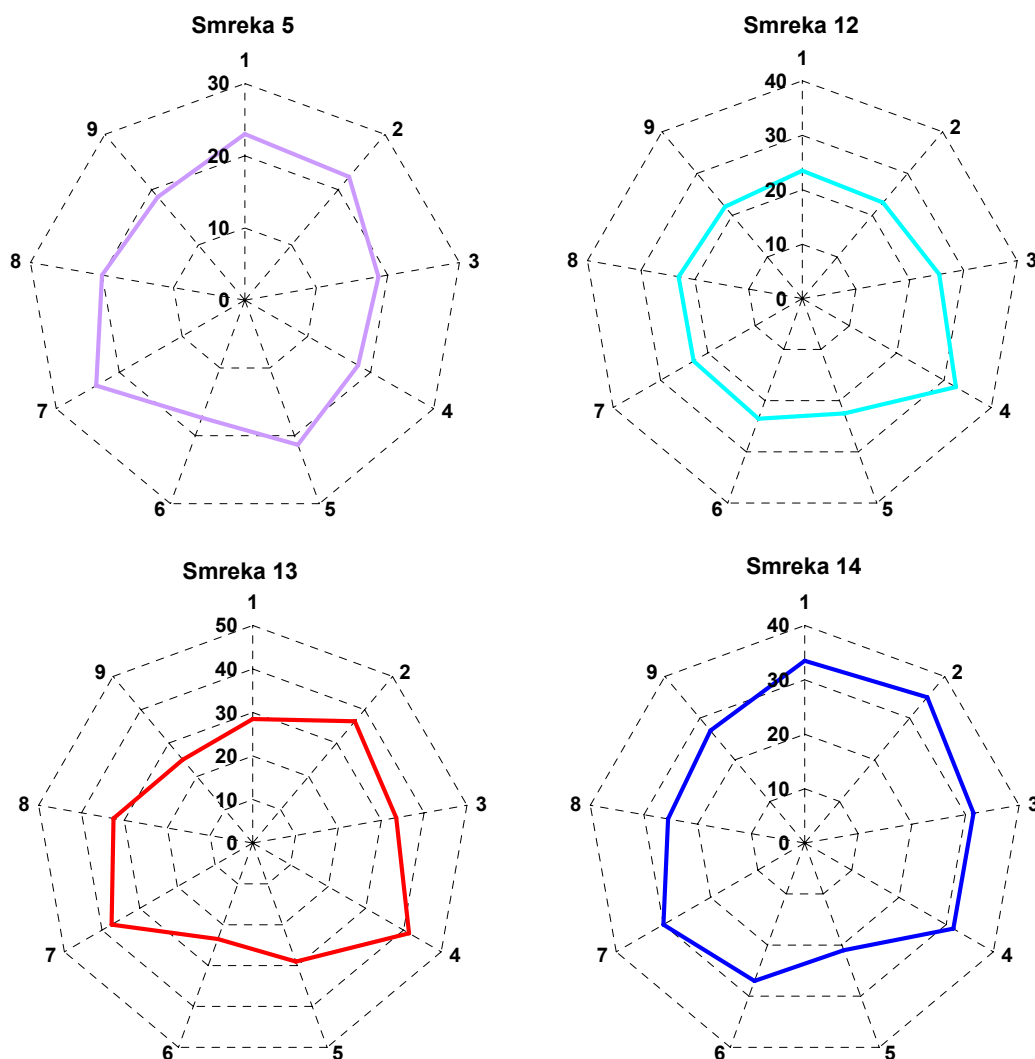


Slika 59: Dinamika nastanka ksilemskih celic pri vseh proučevanih smrekah na Sorškem polju v rastni sezoni 2003 ugotovljena z dvema metodama. Smreke vzorčene z ITSM so označene s št. 1, 3, 4 in 5, smreke vzorčene s PM pa s št. 11, 12, 13, 14 in 15. ITSM – vzorčenje intaktnih tkiv, PM - pinig

Figure 59: Dynamics of xylem cell formation in all investigated Norway spruce trees at Sorško polje in growth period 2003 obtained with two methods. Spruce sampled by ITSM are marked with nos. 1, 3, 4 and 5, and trees sampled by PM are marked with nos. 11, 12, 13, 14 and 15. ITSM – sampling of intact tissue, PM – pinig, datum = date, št. celic = no. of cells



Nadaljevanje na strani 89



Slika 60: Prikaz variabilnost v številu celic v ksilemski braniki 2003 po obodu drevesa pri posamezni smreki na Sorškem polju. Vzorci so bili odvzeti po zaključku kambijeve aktivnosti, ko se je diferenciacija zadnjih nastalih traheid še nadaljevala.

Figure 60: Illustration of variability in the number of cells in xylem growth ring 2003 around the stem in individual Norway spruce at Sorško polje. Samples were taken after the cessation of the cambial activity when differentiation of the latest formed tracheids still continued. *Smreka 1 = spruce 1, smreka 3 = spruce 3, smreka 5 = spruce 5, smreka 12 = spruce 12, smreka 13 = spruce 13, smreka 14 = spruce 14*

V programu Statgraphics smo izračunali model nastanka ksilemske branike 2003 za Sorško polje z uporabo Gompertzove funkcije:

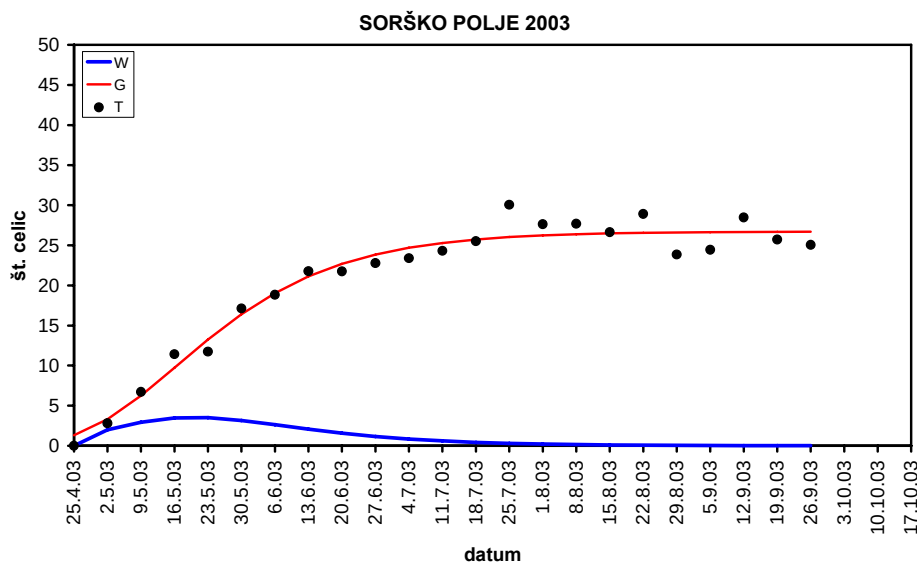
$$y = A \exp(-\exp(B - k * t))$$

kjer je y tedenska kumulativna vsota celic, t Julijanski dnevi, A zgornja asimptota in predstavlja maksimalno število celic, B mesto na osi x in predstavlja začetek kambijeve aktivnosti ter k mesto prevoja krivulje.

Za Sorško polje so bile vrednosti Gompertzove funkcije naslednje:

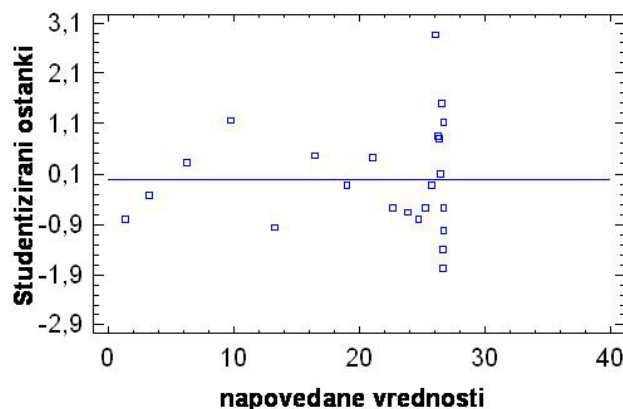
$$y = 26,723 \exp(-\exp(7,076 - 0,0520 * t))$$

Gompertzova funkcija je ocenila maksimalno število celic v braniki 2003 pri smrekah na Sorškem polju na 27 (slika 61). Največja dinamika rasti naj bi bila med 9.5. in 30.5.2003. Kambijeva delitvena aktivnost naj bi se zaključila konec julija. Povprečno dejansko število celic je na sliki 61 prikazano s črnimi pikami in se prilegajo izračunani krivulji 96%. Večja odstopanja podatkov od izračunane krivulje se kažejo ob koncu vegetacije, v procesu odlaganja sekundarne stene in lignifikacije, ko se je kambijeva rast zelo upočasnila in kasneje tudi popolnoma zaustavila in je prišla variabilnost v številu celic po obodu drevesa zelo do izraza (slika 62). Porazdelitev studentiziranih ostankov kaže, da je le ena vrednost večja kot 2, vendar manjša od 3, kar pomeni, da se model v tej točki (t.i. regresijski osamelec) ni dobro prilegal dejanskim podatkom.



Slika 61: Model (rdeča črta) dinamike nastajanja ksilemske branike pri smrekah na Sorškem polju v rastni sezoni 2003. Črne pike označujejo dejanske povprečne vrednosti, modra črta pa izračunan tedenski prirastek celic. G – Gompertzova funkcija, W – tedenski prirastki, T – dejanski prirastki

Figure 61: Model (red line) of dynamics of xylem growth ring formation in Norway spruce at Sorško polje in growth period 2003. Black points mark actual average values. Blue line shows calculated weekly increment of cells. G – Gompertz function, W – weekly increment, T – actual increments, *datum* = date, *št. celic* = no. of cells



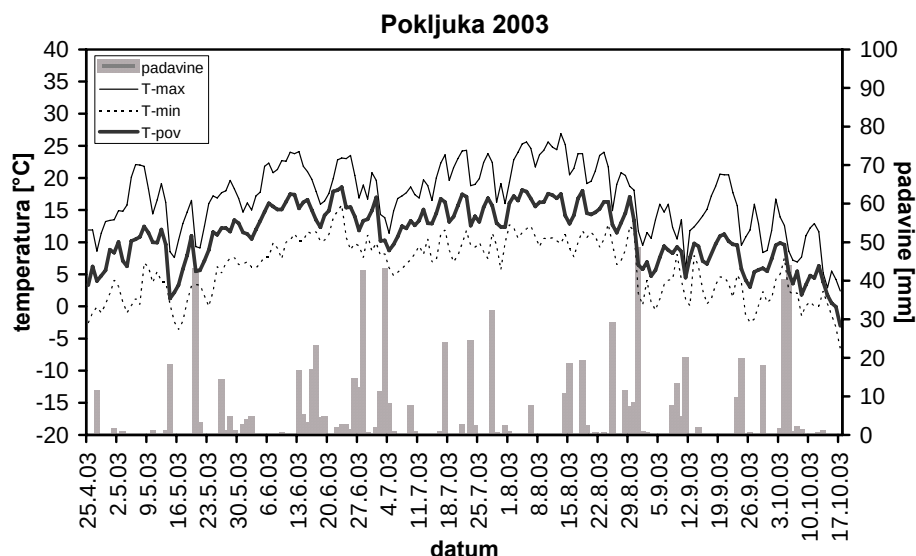
Slika 62: Prikaz razporejenosti ostankov v pasu -3 do +3 za modelno funkcijo. V tem primeru je le ena vrednost večja kot 2, vendar manjša od 3.

Figure 62: Distribution of the residuals in the zone between -3 and +3 for a model curve. In this case, there is only one residual greater than 2, but none greater than 3.

4.2.3 Ksilogeneza pri smrekah na Pokljuki

4.2.3.1 Klimatske razmere na Pokljuki v rastni sezoni 2003

Povprečne, maksimalne in minimalne dnevne temperature zraka in količina padavin zabeležene na Pokljuki v obdobju od 25. aprila do 19. oktobra 2003 so prikazane na sliki 63. Podatki so iz meteorološke postaje z Rudnega polja. Klimatske razmere so se na Pokljuki v letu 2003 bistveno razlikovali od podnebnih razmer na preostalih dveh rastiščih. Nočne temperature so bile do konca maja le redko nad 5°C. Temperature so nato počasi naraščale, vendar so se povprečne temperature tudi v najtoplejših mesecih gibale okrog 15°C ali manj. Maksimalne temperature so se v prvi polovici avgusta le redko približale 25°C, minimalne pa redko nad 10°C. Količina padavin je bila najnižja v mesecu maju, okrog 90 mm, v juniju, juliju in avgustu pa preko 150 mm/ mesec. Septembra so se povprečne temperature spustile pod 10°C, minimalne pa pod 5°C in se nato počasi spuščale. Konec oktobra so temperature dosegle tudi do -12°C.



Slika 63: Povprečne, maksimalne in minimalne dnevne temperature ter količina padavin na Pokljuki (1200 m n.v.) v rastni sezoni 2003.

Figure 63: Average, maximum and minimum daily air temperatures and amount of precipitation at Pokljuka (1200 m a.s.l.) in the vegetation period of 2003. Datum = date, temperatura = temperature, padavine = precipitation

4.2.3.2 Dinamika nastajanja ksilemske branike pri smrekah na Pokljuki

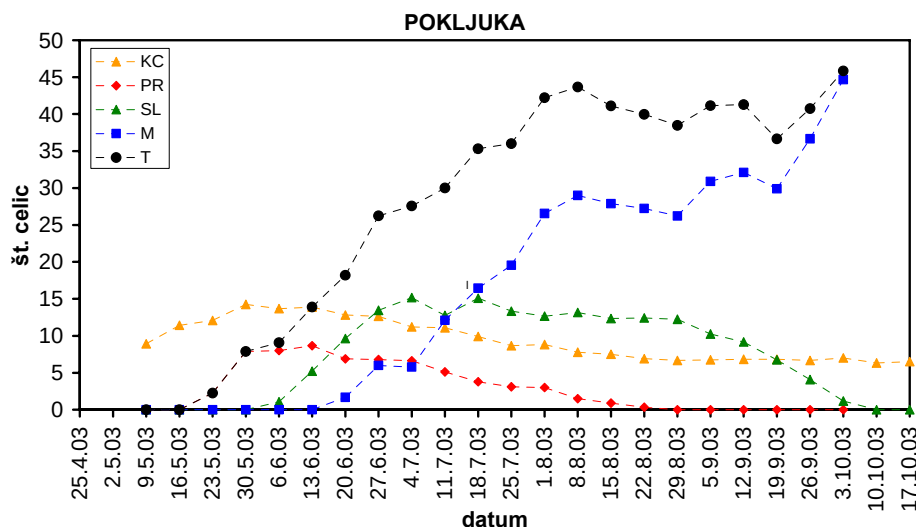
Podobno kot na Sorškem polju smo tudi pri vzorčnih smrekah na Pokljuki za študije nastanka lesa uporabili dve metodi, ITSM in PM. Dinamiko posameznih faz ksilogeneze smo proučili le na intaktnih vzorcih, za raziskave dinamike nastajanja ksilemske branike 2003 in za izdelavo modelne krivulje pa smo uporabili vzorce pripravljene po obeh metodah (slika 64, 65). Nastajanje lesa se pri smrekah na Pokljuki ni začelo pred prvim vzorčenju 9.5.2003. V sredini maja je število kambijevih celic naraslo do 14 slojev, kar kaže na začetek delitev (slika 64). Rastna sezona se je tako na tem rastišču pričela 2 tedna kasneje kot na Sorškem polju in Ravniku. Odlaganje večslojne sekundarne celične stene in lignifikacija prvih traheid ranega lesa se je pričela v začetku junija (30.5.-6.6.2003). Popolnoma oblikovane traheide ranega lesa smo zasledili približno 4 tedne po začetku delitev v kambiju, med 13.6. in 20.6.2003. Intenziteta ksilemskega prirastka je bila največja med tretjim tednom v maju in zadnjim tednom v juniju, v obdobju nastajanja ranega lesa. Kasni les je začel nastajati v začetku julija, ko je bilo oblikovane 70% ksilemske branike (preglednica 14). Kambij je vseboval največje število celic (do 14) v obdobju nastajanja ranega lesa, med 9.5. in 20.6.2003. Na začetku junija je število slojev kambijevih celic padlo pod 10. V sredini avgusta, med 15.8. in 20.8. 2003 pa se je kambijeva delitvena aktivnost pri smrekah na Pokljuki zaključila (slika 64). Dormanten kambij je bil sestavljen iz 6 do 7 slojev celic. Dinamika nastajanja lesa je bila na začetku rastne sezone počasna, sledila je hitra kulminacija rasti na višku rastne sezone, na koncu pa je dinamika debelinske rasti ponovno upadla. Sinteza sekundarne celične stene ter

lignifikacija terminalnih traheid kasnega lesa sta se po prenehanju kambijeve delitvene aktivnosti vršila nadaljnjih 5 do 7 tednov do popolnega razvoja konec septembra.

Preglednica 14: Podatki o začetku in koncu kambijeve aktivnosti ter prehodu iz ranega v kasni les pri posamezni smreki na Pokljuki v letu 2003. Smreke vzorčene z ITSM so označene s št. 7, 9, 10 in 12, smreke vzorčene s PM pa s št. 1, 2, 3, 4 in 5. KA – kambijeva aktivnost, RL – rani les, KL – kasni les, ITSM – vzorčenje intaktnih tkiv, PM – pinning

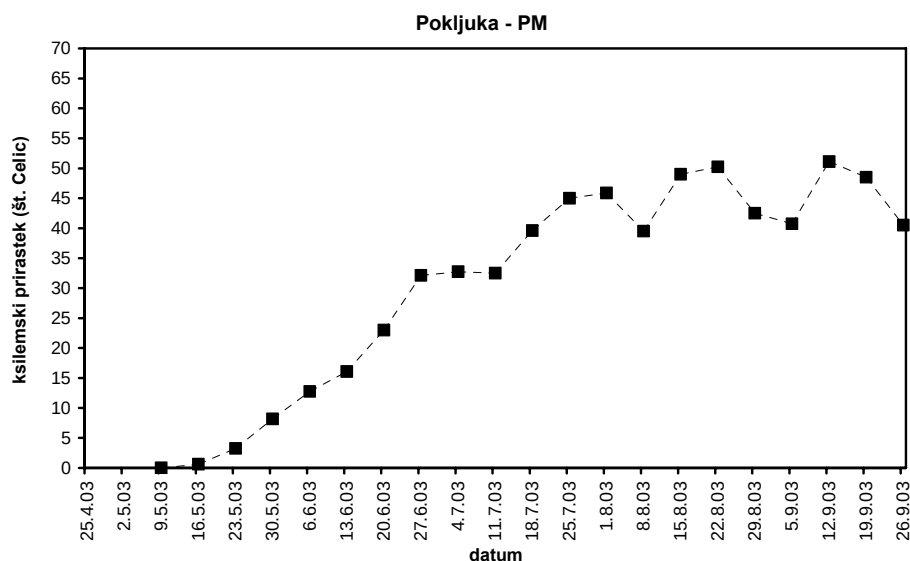
Table 14: Data on beginning and cessation of cambial activity and transition from early to late wood in individual Norway spruce at Pokljuka in the year 2003. Spruce sampled by ITSM are marked with nos. 7, 9, 10 and 12, and trees sampled by PM are marked with nos. 1, 2, 3, 4 and 5. KA – cambial activity, RL – early wood, KL – late wood, ITSM – sampling of intact tissue, PM – pinning

št. drevesa no. of tree	začetek KA onset of KA	prehod RL/KL transition RL/KL	konec KA end of KA
1	16.5.-23.5.03	4.7.-11.7.03	1.8.-8.8.03
2	16.5.-23.5.03	11.7.-18.7.03	8.8.-15.8.03
3	9.5.-16.5.03	20.6.-27.6.03	18.7.-25.7.03
4	9.5.-16.5.03	11.7.-18.7.03	1.8.-8.8.03
5	16.5.-23.5.03	18.7.-25.7.03	1.8.-8.8.03
7	16.5.-23.5.03	18.7.-25.7.03	8.8.-15.8.03
9	16.5.-23.5.03	11.7.-18.7.03	8.8.-15.8.03
10	16.5.-23.5.03	11.7.-18.7.03	8.8.-15.8.03
12	16.5.-23.5.03	18.7.-25.7.03	15.8.-22.8.03



Slika 64: Povprečna dinamika nastajanja ksilemske branike in posameznih faz ksilogeneze pri vseh proučevanih smrekah na Pokljuki v rasti sezoni 2003 z metodo odvzema intaktnih vzorcev. KC – kambijeve celice, PR – celice v postkambijski rasti, SL – celice v fazi sinteze sekundarne celične stene in lignifikacije, M – zrele traheide, T – skupno število nastalih ksilemskih celic, ITSM – vzorčenje intaktnih tkiv, PM – pinning

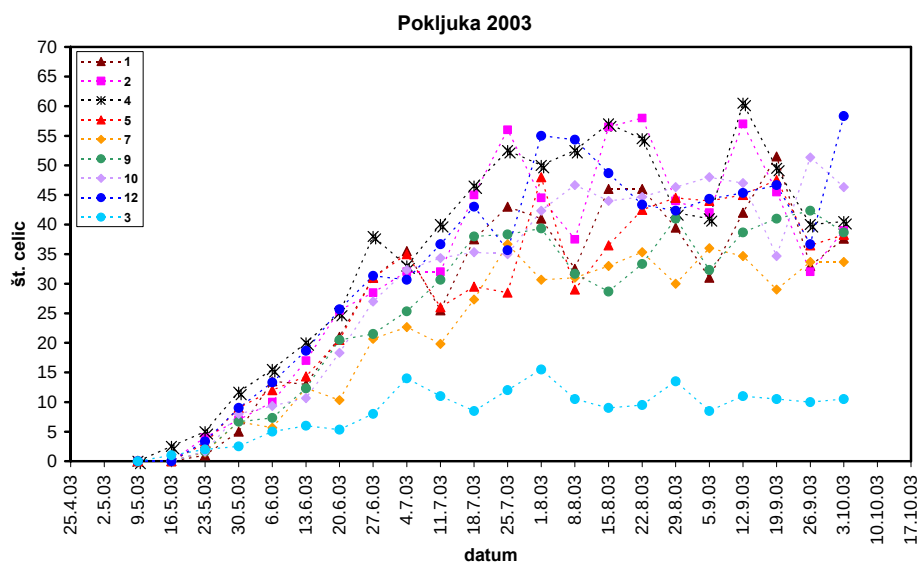
Figure 64: Average dynamics of xylem growth ring formation and individual phases of xylogenesis in all investigated Norway spruce trees at Pokljuka in growing period 2003 with intact tissue sampling method. KC – cambial cells, PR – cells in postcambial growth, SL – cells in phase of secondary cell wall synthesis and lignification, M – mature tracheids, T – total number of formed xylem cells, ITSM – sampling of intact tissue, PM – pinning, datum = date, št. celic = no. of cells



Slika 65: Povprečna dinamika nastajanja ksilemske branike pri vseh proučevanih smrekah na Pokljuki v rastni sezoni 2003 ugotovljena z metodo pining.

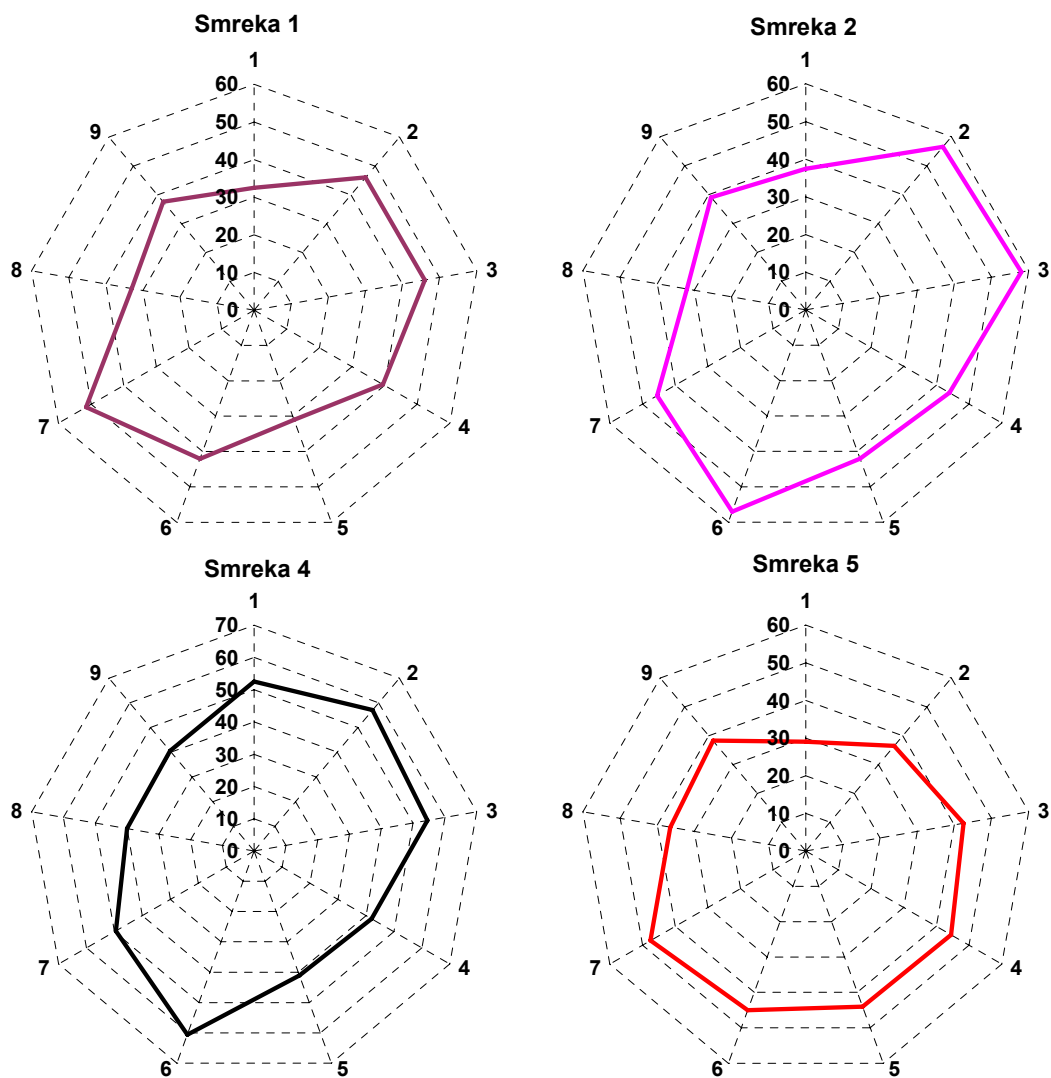
Figure 65: Average dynamics of xylem growth ring formation in all investigated Norway spruce trees at Pokljuka in growth period 2003 obtained with pinning method. *Datum* = date, *št. celic* = no. of cells

Za izdelavo modelne Gompertzove krivulje nastanka ksilemske branike 2003 za drevesa na Pokljuki smo izločili le drevo št. 3, ki je imelo v letu 2003 zelo majhen ksilemski prirastek (10 slojev celic) v primerjavi z ostalimi drevesi. Ostalih 8 dreves smo uporabili za izračun parametrov Gompertzove krivulje. Variabilnost v končni širini ksilemskih branikah 2003 je bila med posameznimi smrekami na Pokljuki med 29 in 58 slojev celic (slika 66). Velika je bila tudi variabilnost v številu celic oziroma širini branike po obodu debla v posameznem drevesu (slika 67).

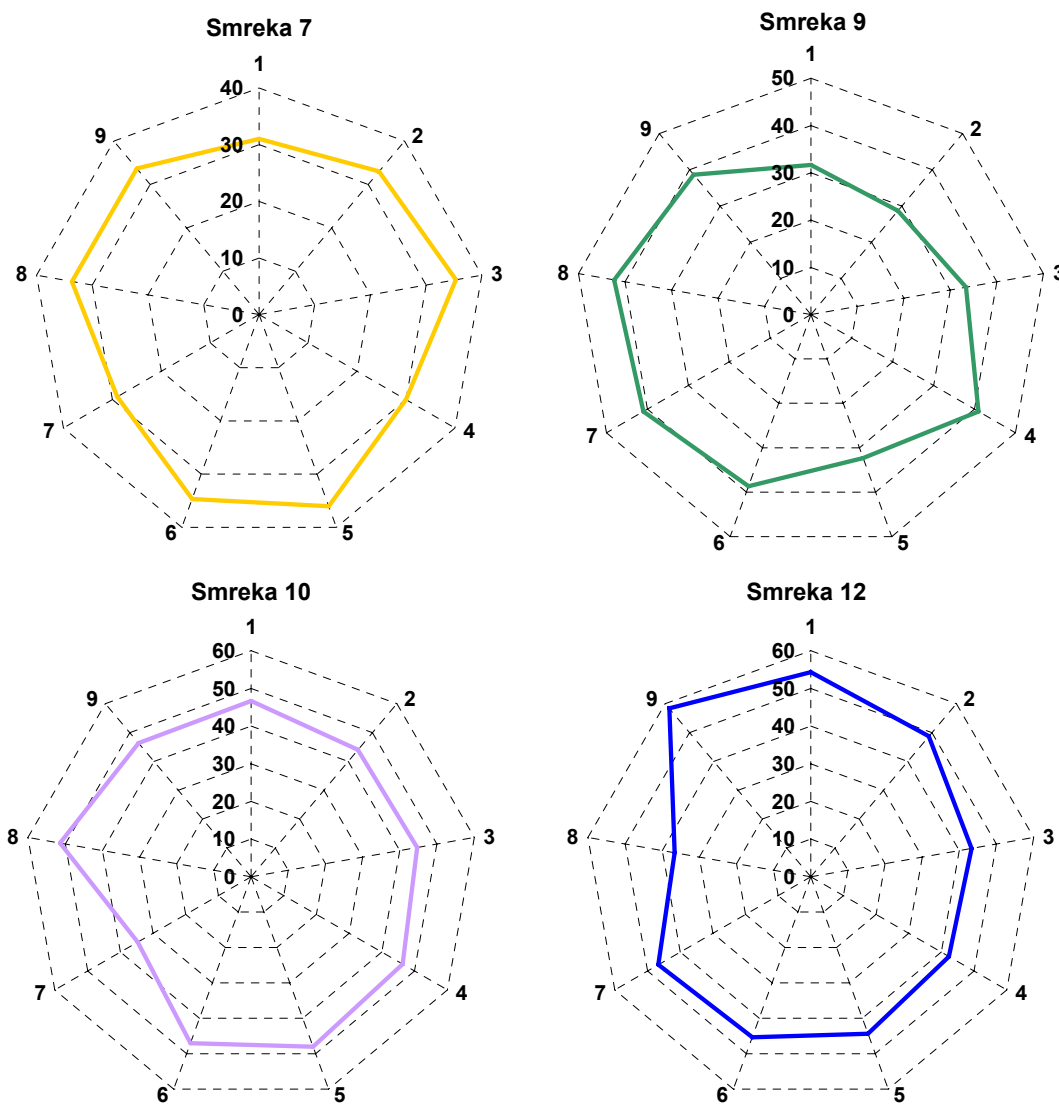


Slika 66: Dinamika nastanka ksilemskih celic pri vseh proučevanih smrekah na Pokljuki v rastni sezoni 2003 ugotovljena z dvema metodama. Smreke vzorčene z ITSM so označene s št. 7, 9, 10 in 12, smreke vzorčene s PM pa s št. 1, 2, 3, 4 in 5. ITSM – vzorčenje intaktnih tkiv, PM - pining

Figure 66: Dynamics of xylem cell formation in all investigated Norway spruce trees at Pokljuka in growth period 2003 obtained with two methods. Spruce sampled by ITSM are marked with nos. 7, 9, 10 and 12, and trees sampled by PM are marked with nos. 1, 2, 3, 4 and 5. ITSM – sampling of intact tissue, PM – pinning, datum = date, št. celic = no. of cells



Nadaljevanje na strani 97



Slika 67: Prikaz variabilnost v številu celic v ksilemski braniki 2003 po obodu drevesa pri posamezni smreki na Pokljuki. Vzorci so bili odvzeti po zaključku kambijeve aktivnosti, ko se je diferenciacija zadnjih nastalih traheid še nadaljevala.

Figure 67: Illustration of variability in the number of cells in xylem growth ring 2003 around the stem in individual Norway spruce at Pokljuka. Samples were taken after the cessation of the cambial activity when differentiation of the latest formed tracheids still continued. *Smreka 1* = spruce 1, *smreka 2* = spruce 2, *smreka 4* = spruce 4, *smreka 5* = spruce 5, *smreka 7* = spruce 7, *smreka 9* = spruce 9, *smreka 10* = spruce 10, *smreka 12* = spruce 12

V programu Statgraphics smo izračunali model nastanka ksilemske branike 2003 za vzročne smreke s Pokljuke z uporabo Gompertzove funkcije:

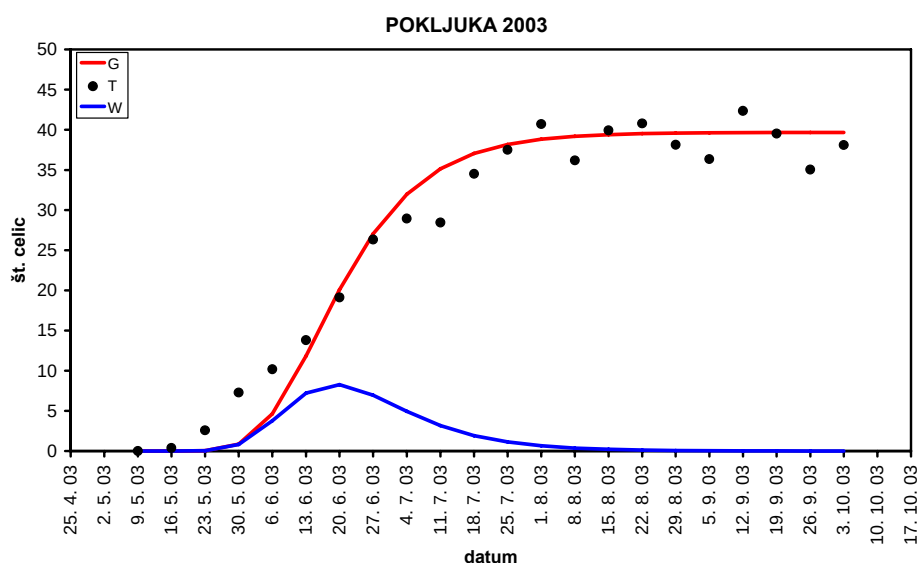
$$y = A \exp (-\exp (B - k * t))$$

kjer je y tedenska kumulativna vsota celic, t so Julijanski dnevi, A zgornja asimptota in predstavlja maksimalno število celic, B mesto na osi x in predstavlja začetek kambijeve aktivnosti ter k mesto prevoja krivulje.

Za Pokljuko so bili parametri Gompertzove funkcije naslednji:

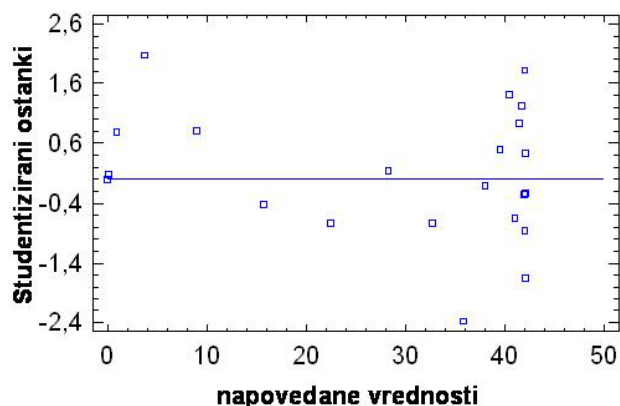
$$y = 42,145 \exp(-\exp(10,568 - 0,0645 * t))$$

Na Pokljuki smo s pomočjo Gompertzove funkcije narisali model debelinske rasti smrek v rastni sezoni 2003. Model predvideva maksimalno število slojev celic v ksilemski braniki 42. Kambijeva aktivnost naj bi se začela konec maja, med 23.5. in 30.5.2003. Model ocenjuje največjo dinamiko celičnih delitev med 13.6. in 27.6.2003. Kambijeva delitvena aktivnost naj bi se zaključila do sredine avgusta, kar se skada z dejanskimi podatki. Povprečno dejansko število celic je na sliki prikazano s črnimi pikami (slika 68) in se prilagajajo izračunani krivulji 97%. Večja odstopanja podatkov od izračunane krivulje se kažejo na začetku in na koncu vegetacije, ko je bila dinamika rasti počasnejša. Variabilnost v številu celic po obodu drevesa je bila najbolj izrazita ob koncu vegetacije (slika 69), podobno kot pri ostalih dveh rastiščih. Porazdelitev studentiziranih ostankov kaže, da sta dve vrednosti večji kot 2, vendar manjša od 3, kar pomeni, da se model v teh točkah ni dobro prilagal dejanskim podatkom.



Slika 68: Model (rdeča črta) dinamike nastajanja ksilemske branike pri smrekah na Pokljuki v rastni sezoni 2003. Črne pike označujejo dejanske povprečne vrednosti, modra črta pa izračunan tedenski prirastek celic. G – Gompertzova funkcija, W – tedenski prirastki, T – dejanski prirastki

Figure 68: Model (red line) of the dynamics of xylem growth ring formation in Norway spruce at Pokljuka in growth period 2003. Black points mark actual average values. Blue line shows calculated weekly increment of cells. G – Gompertz function, W – weekly increment, T – actual increments, datum = date, št. celic = no. of cells

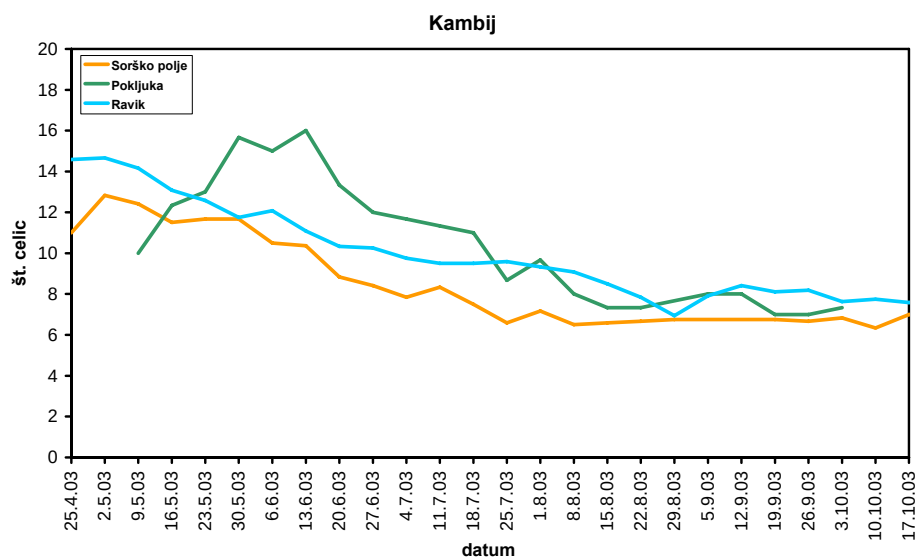


Slika 69: Prikaz razporejenosti ostankov v pasu -3 do +3 za modelno funkcijo. V tem primeru sta 2 vrednosti večje od 2, vendar ni nobene večje od 3.

Figure 69: Distribution of the residuals in the zone between -3 and +3 for a model curve. In this case, there are 2 residuals greater than 2, but none greater than 3.

4.2.4 Število kambijevih celic tekom rastne sezone pri drevesih iz vseh treh rastišč

Variabilnost v številu kambijevih celic tekom aktivnosti in dormance smo lahko proučili le na intaktnih vzorcih. Pri metodi pining kambijeve celice niso bile v celoti ohranjene. Iz njih so po poškodbi z iglo nastale kalusne celice. Dormanten kambij je pri smreki in jelki sestavljalo 6 do 8 slojev celic z debelimi celičnimi stenami. Ko so se začele delitve v kambiju, so se celične stene stanjšale. Število slojev celic v kambiju se je podvojilo, do 16 (slika 70). Delitve v kambiju so se pričele prej, preden smo zasledili prvo ksilemsko celico v postkambijski rasti. Na vseh 3 ploskvah smo zamudili začetek delitev v kambiju. Nastanek ksilemske branike se je pri jelkah na Ravniku in smrekah na Sorškem polju začel približno 2 tedna prej kot na Pokljuki. V prvem mesecu delitev je kambij dosegel maksimalno število celic, nato pa je število celic začelo počasi upadati pri vseh 3 ploskvah. Število celic v kambiju je sovpadalo z dinamiko nastajanja ksilemske branike. Med nastajanjem kasnega lesa je bilo število celic sprva okoli 10, nato pa se je znižalo. Dinamika celične produkcije se je v drugi polovici rastne sezone zmanjšala. Na Sorškem polju je bilo razmerje med celicami aktivnega in dormantnega kambija 2:1, na Pokljuki 2,3:1 in na Ravniku 2,1:1. Primerjava dinamike delitev v kambiju pri smrekah na Pokljuki in na Sorškem polju kaže, da je bilo število kambijevih celic na višku vegetacije na Pokljuki nekoliko večje kot na Sorškem polju, vendar pa se je na Pokljuki število celic hitro zmanjšalo, medtem ko se je to na Sorškem polju zgodilo bolj postopoma (slika 70).



Slika 70: Povprečno št. kambijevih celic tekom rastne sezone pri drevesih z vseh treh ploskev.

Figure 70: Average no. of cambial cells during the growth period in trees from all three plots. *Datum* = date, *št. celic* = no. of cells, *kambij* - cambium

4.2.5 Primerjava modelnih Gompertzovih krivulj debelinske rasti vzorčnih dreves z vseh treh ploskev

Dinamika debelinske rasti vzorčnih dreves se je v letu 2003 na posameznih ploskvah razlikovala. V preglednici 15 so prikazani posamezni parametri Gompertzove funkcije za vsa tri rastišča. Na Ravniku je v primerjavi s Sorškim poljem nastalo 2,7-krat več celic, glede na Pokljuko pa 1,7-krat več. Nastajanje ksilemske branike 2003 naj bi se naprej pričelo na Ravniku, nekoliko kasneje na Sorškem polju in nazadnje na Pokljuki. Največja dinamika rasti je bila na Pokljuki, najmanjša pa na Ravniku. Model je ocenil najhitrejši začetek kambijeve aktivnosti na Ravniku, sledilo je Sorško polje in nazadnje Pokljuka. Izračunani parametri Gompertzove funkcije se skladajo z dejanskimi rezultati.

Preglednica 15: Prikaz posameznih parametrov Gompertzove funkcije za vse tri ploskve v rastni sezoni 2003. *A* – zgornja asimptota predstavlja maksimalno število celic, *B* – mesto na osi x in predstavlja začetek kambijeve aktivnosti, *k* – ocena dinamike rasti, *r* – št. celic/dan

Table 15: Parameters of Gompertz function for all three plots in the growth period 2003. *A* – upper asymptote of maximum number of cells, *B* – x-axis placement parameter, *k* – rate of change parameter, *r* – no. of cells/day

ploskev <i>plot</i>	Ravnik	Sorško polje	Pokljuka
parametri <i>parameters</i>			
A	70,564	26,723	42,145
B	4,2464	7,0768	10,568
k	0,0286	0,0520	0,0645
B/k	148,40	136,09	163,85
r	0,5048	0,3474	0,6800

Za vse tri ploskve smo določili mesto prevoja posameznih modelnih krivulj. Prevoj Gompertzove funkcije se ujema z maksimalno vrednostjo prvega odvoda funkcije y' :

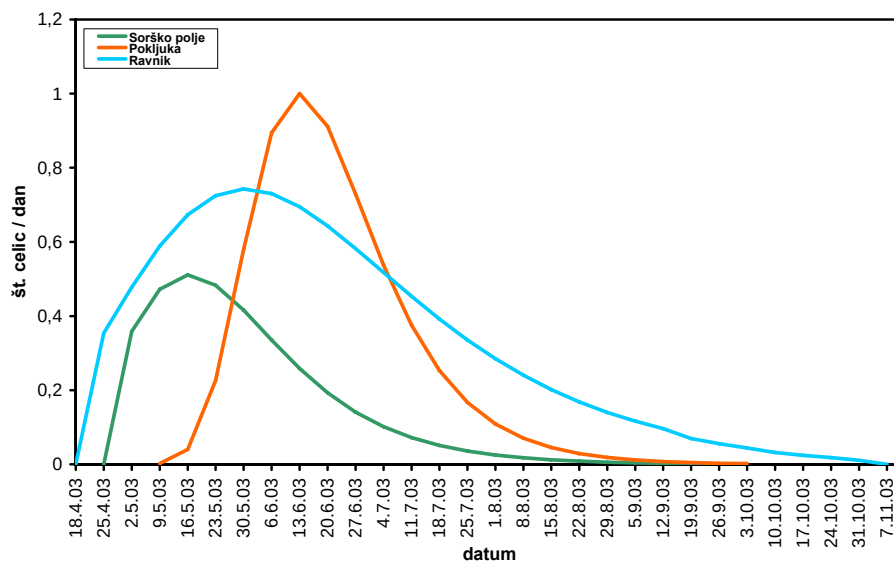
$$y' = A k \exp(-\exp(B - k * t)) \exp(B - k * t)$$

kjer je y tedenska kumulativna vsota celic, t so Julijanski dnevi, A zgornja asimptota in predstavlja maksimalno število celic, B mesto na osi x in predstavlja začetek kambijeve aktivnosti ter k mesto prevoja krivulje. S prvim odvodom Gompertzove funkcije smo izračunali dnevni prirastek celic v vsakem tednu, s čimer smo dobili podatek o stopnji debelinske rasti za vsako rastišče.

Pri maksimalni vrednosti prvega odvoda y' je drugi odvod $y'' = 0$:

$$y'' = y' k (\exp(B - k * t) - 1)$$

Gompertzova funkcija ima prevoj tipa »S«, zato y'' preide iz pozitivnih vrednosti na negativne. Drugi odvod y'' je enak 0 pri $t = B/k$, t.j. pri mestu prevoja na horizontalni osi. Za Sorško polje je $B/k = 136,1$; za Pokljuko $B/k = 163,9$ in za Ravnik 148,4. V območju prevoja je dnevni prirastek celic največji. Obdobje maksimalne debelinske rasti dreves naj ne bi sovpadalo s kulminacijo maksimalnih temperatur, pač pa z najdaljšim obdobjem fotoperiode, ki je konec junija, ob solsticiju in predstavlja 172 dan v Julijanskih dnevih (Rossi in sod., 2006a, b). Izračunana maksimalna dinamika debelinske rasti naj bi bila okoli dneva 164,5 za vzorce tkiv odvzetih v tedenskih intervalih. Pri meritvah z dendrometri naj bi bila ta vrednost 170,8. Oba datuma izračunane maksimalne celične produkcije naj bi veljala za različne drevesne vrste, ki rastejo na različnih rastiščih severne poloble, ne glede na rastno sezono (Rossi in sod., 2006b). Drevesa naj bi izkazovala veliko plastičnost in prilagodljivost na okolje in klimatske razmere, v katerih uspevajo (Gregory in Wilson, 1968, Rossi in sod., 2006a, b). Rast smrek na Pokljuki 2003 je zelo dobro sovpadala s tem datumom, medtem ko je bila maksimalna celična produkcija na Sorškem polju za več kot en mesec zamaknjena proti začetku vegetacije. Največja radialna rast je bila v sredini maja, nato pa je strmo upadla. Konec junija se je razvoj ksilemskih branik 2003 pri smrekah na Sorškem polju počasi zaključeval. Na Ravniku je bilo obdobje maksimalne rasti ravno tako nekoliko izven izračunanega območja, vendar ne tako izrazito. Maksimum je bil zabeležen nekje v začetku junija. Primerjava stopnje dnevne produkcije celic v posameznih tednih tekom vegetacije med različnimi rastišči kaže, da je bila največja stopnja produkcije novih celic na Pokljuki, ko je na višku vegetacije nastala tudi po 1 celica na dan (slika 71). Obdobje hitre produkcije je bilo zelo kratko, po 4 tednih intenzivnih delitev je stopnja produkcije padla pod 0,6 celic/dan. Na Ravniku je bila maksimalna produkcija do 0,75 celic/dan, vendar pa je stopnja delitev nad 0,6 celic/dan vztrajala kar 7 tednov. Na Sorškem polju največja stopnja produkcije ni presegla 0,55 celic/dan, po 4 tednih pa je število nastalih celic na dan padlo pod 0,35 celic/dan (slika 71). Tudi v povprečju je na Pokljuki nastalo največ celic na dan, 0,68, na Ravniku nekoliko manj (0,51 celic/dan) in najmanj na Sorškem polju (0,35 celic/dan) (preglednica 15).



Slika 71: Izračunano število nastalih ksilemskih celic na dan na posamezni ploskvi v letu 2003.

Figure 71: Calculated no. of produced xylem cells per day at individual plot in the year 2003. *Datum* = date, *št. celic* = no. of cells

Iz parametra k Gompertzove funkcije, ki določa dinamiko rasti smo izračunali čas d , ki je bil potreben za nastanek glavnine ksilemske branike 2003 pri drevesih na posameznem rastišču. Čas d se izračuna po formuli:

$$d = 4/k$$

Za Sorško polje je izračunani čas d znašal 76,92 dni, za Pokljuko 62,02 dni in za Ravnik 139,86 dni. Pri smrekah na Sorškem polju naj bi rastna sezona trajala 2 meseca in pol, pri smrekah na Pokljuki 2 meseca in pri jelkah na Ravniku 4 mesece in pol. Očitno je, da je izračunana vrednost d dobra ocena dejanskega trajanja rasti dreves na preizkovanih ploskvah. Poleg trajanja kambijeve aktivnosti vpliva na končno število ksilemskih celic oziroma na širino branike tudi stopnja celičnih delitev. Na Pokljuki je bila stopnja celične produkcije zelo visoka (slika 71), saj je bila širina branike 1,56-krat širša kot na Sorškem polju, četudi je bilo vegetacijsko obdobje pol meseca krajše. Ob predpostavki, da bi na Pokljuki kambijeva aktivnost potekala 4 mesece in pol kot na Ravniku, bi ob nespremenjeni stopnji celične produkcije izračunana branika 2003 štela 95 slojev celic. Izkazalo se je, da kasnejši začetek delitev v kambiju ne pomeni manjše dinamike debelinske rasti in s tem ožjih ksilemskih branik.

4.2.6 Primerjava modelnih Gompertzovih krivulj debelinske rasti dreves na Sorškem polju in na Pokljuki v letih 2002 in 2003

Iz raziskav nastanka ksilemske branike med rastno sezono lahko dobimo pomembne informacije o trajanju in dinamiki posameznih fazah ksilogeneze na določenem rastišču.

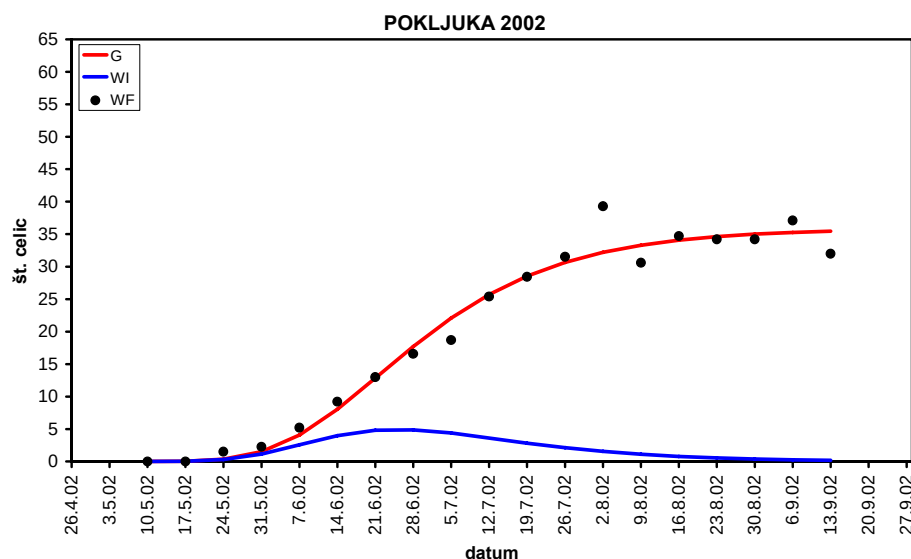
Primerjave med posameznimi rastišči za isto drevesno vrsto potrjujejo, da imajo poleg notranjih dejavnikov zelo pomembno vlogo tudi zunanji, klimatski dejavniki. Za bolj podrobne informacije o rasti dreves na posameznem rastišču in vplivu klimatskih dejavnikov pa je nujno, da se takšne študije opravljajo več let zaporedoma. Na manj ugodnih rastiščih so lahko posamezni klimatski dejavniki zelo omejujoči in bistveno vplivajo na širino ksilemskih branik. Širine zaporednih branik tako zelo variirajo. V okviru evropskega projekta PINE so na Pokljuki in Sorškem polju potekale večletne raziskave o kambijevi aktivnosti in nastanku ksilemske branike pri navadni smreki (Eckstein in sod., 2002, 2004, Oven in sod., 2002, 2004). S primerjavo modelnih Gompertzovih krivulj za debelinsko rast v letu 2003 z letom 2002 si je mogoče bolje predstavljati rast dreves na obeh rastiščih (slika 61, 68, 72, 73). V spodnji preglednici 16 so prikazani posamezni parametri Gompertzove funkcije za Pokljuko in Sorško polje za leto 2002 in 2003. Oblikovanje ksilemske branike naj bi se najprej pričelo na Sorškem polju v letu 2002, zatem na Sorškem polju v letu 2003, sledila je Pokljuka v letu 2002 in nazadnje še Pokljuka v letu 2003. Najbolj izrazite razlike v trajanju kambijeve aktivnosti so bile na Sorškem polju med zaporednima letoma. V letu 2002 je v primerjavi z naslednjim letom nastalo kar 2,4-krat več celic, vendar pa je bilo izračunano povprečno število nastalih celic na dan podobno (preglednica 16). Kambijeva aktivnost se je v letu 2002 zaključila opazno kasneje v primerjavi z letom 2003. Na Pokljuki je bila ksilemska branika 2003 približno 7 celic širša kot v predhodnem letu.

Preglednica 16: Prikaz posameznih parametrov Gompertzove funkcije za Pokljuko in Sorško polje v rastnih sezonah 2002 in 2003. y – tedenska kumulativna vsota celic, t – datum, A – zgornja asimptota predstavlja maksimalno število celic, B – mesto na osi x in oceni začetek kambijeve aktivnosti, k – ocena dinamike rasti, r – št. celic/dan

Table 16: Parameters of Gompertz function for Pokljuka and Sorško polje in the growth periods 2002 and 2003. A – upper asymptote of maximum number of cells, B – x -axis placement parameter, k – rate of change parameter, r – no. of cells/day

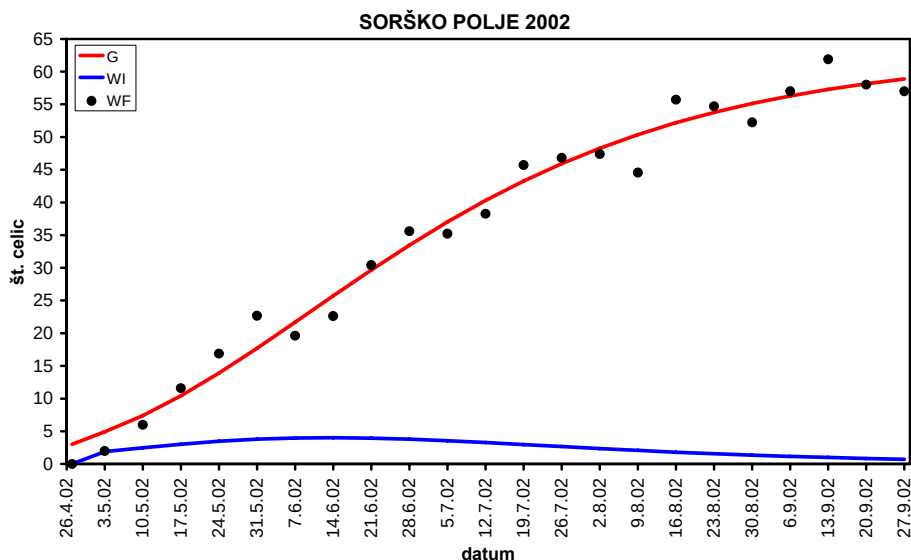
ploskev <i>plot</i>	Sorško polje 2002	Pokljuka 2002	Sorško polje 2003	Pokljuka 2003
parametri <i>parameters</i>				
A	62,807	35,862	26,723	42,145
B	4,0054	9,2505	7,0768	10,568
k	0,0250	0,0536	0,0520	0,0645
B/k	160,22	172,58	136,09	163,85
r	0,3919	0,4808	0,3474	0,6800

Primerjava izračunanih modelnih Gompertzovih krivulj, ki opisujejo dinamiko in trajanje ksilogeneze pri smrekah na Sorškem polju in Pokljuki v letih 2002 in 2003, je pokazala izrazite razlike v trajanju kambijeve aktivnosti na Sorškem polju. Na tem rastišču je rastna sezona trajala 17 tednov v letu 2002 in 11 tednov v letu 2003. V obeh letih so se delitve v kambiju pričele v podobnem obdobju, zaključile pa so se v letu 2002 mesec in pol kasneje kot v letu 2003. Rezultat različnega trajanja kambijeve aktivnosti v obeh letih so bile znatno širše branike v letu 2002, med 52 do 62 celic. Na Pokljuki je bila rastna sezona v letu 2002 približno en teden daljša kot v letu 2003.



Slika 72: Model (rdeča črta) dinamike nastajanja ksilemske branike pri smrekah na Pokljuki v rastni sezoni 2002. Črne pike označujejo dejanske povprečne vrednosti, modra črta pa izračunan tedenski prirastek celic. G – Gompertzova funkcija, W – tedenski prirastki, T – dejanski prirastki

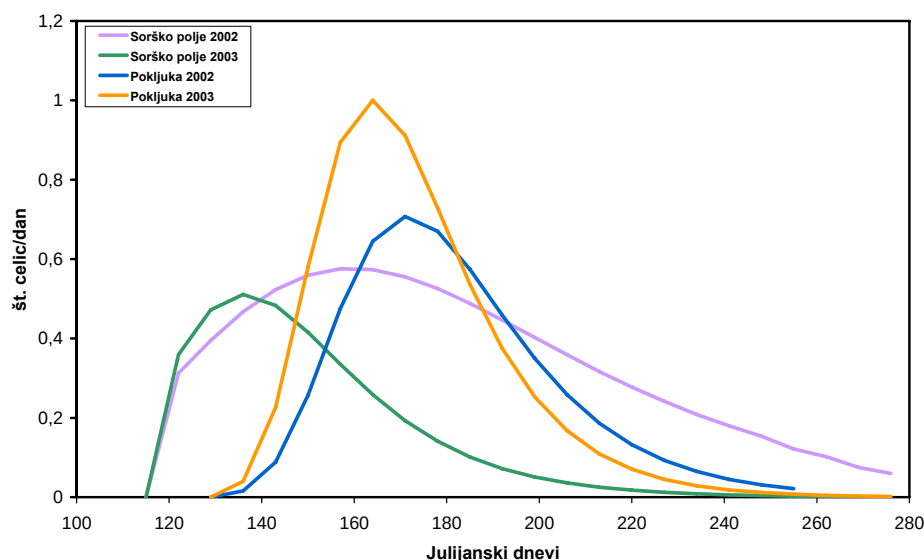
Figure 72: Model (red line) of dynamics of xylem growth ring formation in Norway spruce at Pokljuka in growth period 2002. Black points mark actual average values. Blue line shows calculated weekly increment of cells. G – Gompertz function, W – weekly increment, T – actual increments, *datum* = date, *št. celic* = no. of cells



Slika 73: Modelna krivulja (rdeča črta) dinamike nastajanja ksilemske branike pri smrekah na Sorškem polju v rastni sezoni 2002. Črne pike označujejo dejanske povprečne vrednosti, modra črta pa izračunan tedenski prirastek celic. G – Gompertzova funkcija, W – tedenski prirastki, T – dejanski prirastki

Figure 73: Model curve (red line) of dynamics of xylem growth ring formation in Norway spruce at Sorško polje in growth period 2002. Black points mark actual average values. Blue line shows calculated weekly increment of cells. G – Gompertz function, W – weekly increment, T – actual increments, *datum* = date, *št. celic* = no. of cells

Maksimalna celična produkcija je bila na Pokljuki v letih 2002 in 2003 v obdobju solsticija. Na sliki 74 je razvidno, da je bila največja stopnja produkcije novih celic na Pokljuki v letu 2003, ko je na višku vegetacije nastala tudi po 1 celica na dan (slika 74). Obdobje hitre produkcije je bilo zelo kratko, po 4 tednih intenzivnih delitev je stopnja produkcije padala pod 0,6 celic/dan. V letu 2002 je bila stopnja delitev v kambiju smrek na Pokljuki nekoliko manj intenzivna in tudi na višku vegetacije ni presegla 0,7 celic/dan. Vendar pa je bil upad celične produkcije nekoliko počasnejši kot v letu 2003. Večja stopnja celičnih delitev v letu 2003 je razlog za širšo ksilemsko braniko pri približno 1 teden krajši vegetaciji v primerjavi z letom 2002. Na Sorškem polju je bila v letu 2003 maksimalna celična produkcija za več kot en mesec zamaknjena proti začetku vegetacije. Največja radialna rast je bila v mesecu maju, nato pa je strmo upadla. Konec junija se je razvoj ksilemskih branik 2003 pri smrekah na Sorškem polju počasi zaključeval. V letu 2002 pa je bila na istem rastišču stopnja celičnih delitev najintenzivnejša 160. dan, okoli solsticija (Ross in sod., 2006). Največja stopnja produkcije v letu 2003 ni presegla 0,55 celic/dan, po 4 tednih pa je število nastalih celic padlo pod 0,35 celic/dan (slika 74). Tudi v letu 2002 je bila dinamika debelinske rasti zelo podobna. Izrazite pa so bile razlike v trajanju kambijeve aktivnosti, in sicer se je kambijeva delitvena aktivnost v letu 2002 končala več kot en mesec kasneje kot v naslednjem letu.



Slika 74: Izračunano število nastalih ksilemskih celic na dan na posameznih ploskvah v letih 2002 in 2003.

Figure 74: Calculated no. of produced xylem cells per day at individual plot in the years 2002 and 2003.
Julijanski dnevi = Julian days, *št. celic* = no. of cells

4.3 VPLIV TEMPERATURE IN PADAVIN NA KSILOGENEZO PRI NAVADNI JELKI IN NAVADNI SMREKI NA RAZLIČNIH RASTIŠČIH

Rast in razvoj dreves je nadzorovana z notranjimi in zunanji dejavniki. Zunanji dejavniki (temperatura, padavine, radiacija, dolžina dneva itd.) uravnavajo začetek oziroma zaključek razvojnih procesov ter vplivajo na stopnjo in obseg rasti (Denne in Dodd, 1981, Schweingruber, 1988, Larson, 1994, Savidge 1996, 2000a, b, Kozlowsky in Pallardy 1997, Lachaud in sod., 1999, Wodzicki, 2001, Larcher, 2003). Dinamika in trajanje nastanka ksilemske branike pri drevesih na različnih rastiščih in v različnih letih je različna. Vpliv klimatskih dejavnikov na rast dreves je najbolj viden na manj ugodnih rastiščih, kot je npr. zgornja gozdna meja ali sušna področja. V prvem primeru predstavljajo omejitve za rast dreves nizke temperature, zlasti spomladi, v drugem pa pomanjkanje padavin, predvsem v poletnih mesecih. V takšnih primerih sta struktura in širina ksilemskih branik zelo odvisni od določenega parametra in varirata glede na njegovo razpoložljivost. Signal je zelo močan in spremenljiv, zato ga je lažje zaslediti in ovrednotiti. Na ugodnih rastiščih, ki ustrezajo določeni drevesni vrsti, je težje izraziti zvezo med posameznim klimatskim parametrom in celičnim prirastkom. Ker klima tekom rastne sezone ne predstavlja velike omejitve v debelinski rasti, pridejo do izraza ostali dejavniki. V takšnem okolju preživijo tudi manj vitalna drevesa. Pojavijo se velike razlike v širini branike po obodu drevesa in med posameznimi drevesi.

Vpliv temperature in padavin na nastanek ksilemske branike 2003 smo na izbranih 3 rastiščih proučili s pomočjo linearne regresije. Izračunali smo korelacijske koeficiente med dejanskim povprečnim tedenskim prirastkom in vremenskimi spremenljivkami, kot so: povprečna tedenska temperatura zraka, povprečna minimalna tedenska temperatura zraka, povprečna maksimalna tedenska temperatura zraka, odčitana tedenska minimalna temperatura zraka, odčitana tedenska maksimalna temperatura zraka in tedenska vsota padavin. Povprečne tedenske vrednosti smo izračunali za 1 teden nazaj od dneva vzorčenja. Poleg tega smo povprečne tedenske vrednosti zamikali za 1 dan od dneva vzorčenja do največ 7 dni nazaj od dneva vzorčenja. S tem smo želeli preveriti, ali se produkcija celic v kambiju takoj odzove na temperaturne in padavinske spremembe ali z zamikom. Vpliv naštetih vremenskih spremenljivk smo na vsakem rastišču izračunali za rani in za kasni les posebej, saj sta morfološko različna in najverjetneje njun nastanek ni pogojen z zunanjimi dejavniki, temveč z notranjimi.

4.3.1 Vpliv temperature in padavin na ksilogenezo pri navadni jelki na Ravniku

Korelacijski koeficienti linearne regresije med tedenskimi prirastki za rani in kasni les ter vremenskimi spremenljivkami, kot so povprečna tedenska temperatura zraka, odčitana tedenska maksimalna temperatura zraka, povprečna maksimalna tedenska temperatura zraka, odčitana minimalna tedenska temperatura zraka, povprečna minimalna tedenska temperatura zraka ter tedenska vsota padavin so prikazani v preglednicah 17 in 18. Izračune smo opravili za časovni zamik 1, 2, 3, 4, 5, 6 in 7 dni od dneva vzorčenja dreves. Vse statistično značilne korelacije so označene z *. Največje vrednosti korelacije za tedenski prirastek in posamezni vremenski parameter so odebeljene.

Najvišje in vselej statistično značilne pozitivne korelacije s temperaturo in tedenskim prirastkom celic ranega lesa smo dobili pri zamiku 7 dni (povprečna tedenska temperatura 7 dni nazaj od dneva vzorčenja) (preglednica 17). Izjema je le odčitana tedenska maksimalna temperatura, kjer smo dobili največjo vrednost pri zamiku 3 dni. Pozitivna zveza med ksilemskim prirastkom in temperaturami pove, da se je z višajočo temperaturo dinamika delitev večala. Pri tedenskih kumulativah padavin ni bilo statistično značilnih korelacij s tedenskimi prirastki celic ranega lesa (preglednica 17). Razen pri zamiku 1 dan so bili vsi ostali dnevi (2, 3, 4, 5, 6, 7) v negativni korelaciji. Sicer smo tudi v tem primeru dobili najvišjo vrednost pri zamiku 7 dni. Eden izmed razlogov za nizke koeficiente korelacije je zagotovo v tem, da količina padavin ni neposredno povezana z vodnimi razmerami v tleh oz. vodo razpoložljivo za drevo. Količina vode v tleh, ki jo drevo potrebuje, je med drugim odvisna tudi od sestave tal, debeline zgornjega sloja tal, velikosti in razvejanosti koreninskega sistema itn. Poleg količine padavin je pomembna tudi njihova razporeditev. Padavine so povezane tudi s temperaturami; če dežuje, se ozračje ohladi. Za rast jelk so optimalna mokra in ne prevroča poletja (Levanič, 1996). V povprečju je na Ravniku v letu 2003 v obdobju nastajanja ranega lesa padlo 65 mm/mesec padavin, ki so bile enakomerno razporejene. Najverjetneje v tem času padavine niso omejevale celične produkcije.

Preglednica 17: Korelacijski koeficienti linearne regresije med tedenskimi prirastki za rani les in vremenskimi spremenljivkami za časovne zamike 1, 2, 3, 4, 5, 6 in 7 dni od dneva vzorčenja pri jelkah na Ravniku ($p < 0,05$). T_{pov} – povprečna tedenska temperatura zraka, T_{max} – odčitana tedenska maksimalna temperatura zraka, $T_{ed\ T_{max}}$ – povprečna maksimalna tedenska temperatura zraka, T_{min} – odčitana tedenska minimalna temperatura zraka, $T_{ed\ T_{min}}$ – povprečna minimalna tedenska temperatura zraka, P – tedenska vsota padavin, * - statistično značilne korelacije; največje vrednosti korelacije za tedenski prirastek in posamezni vremenski parameter so odebeljene (prim. preglednica 19)

Table 17: Correlation coefficients of linear regression between weekly increments of early wood and climate variables for time lags 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7 days from sampling date in silver firs at Ravnik ($p < 0,05$). T_{pov} – average weekly air temperature, T_{max} – actual weekly maximum air temperature, $T_{ed\ T_{max}}$ – average maximum weekly air temperature, T_{min} – actual weekly minimum air temperature, $T_{ed\ T_{min}}$ – average minimum weekly air temperature, P – weekly cumulative sum of precipitation, * - statistically significant correlations, highest values of correlation between weekly increment and individual climatic parameters are bolded (comp. table 19)

RANI LES <i>EARLY WOOD</i>	T_{pov}	T_{max}	$T_{ed\ T_{max}}$	T_{min}	$T_{ed\ T_{min}}$	P
Zam 1	0,392	0,511	0,110	0,364	0,437	0,172
Zam 2	0,494	0,564*	0,468	0,369	0,456	-0,218
Zam 3	0,480	0,744*	0,532*	0,365	0,517	-0,167
Zam 4	0,539*	0,721*	0,504	0,368	0,534*	-0,171
Zam 5	0,580*	0,692*	0,540*	0,373	0,615*	-0,121
Zam 6	0,623*	0,700*	0,607*	0,581*	0,666*	-0,227
Zam 7	0,675*	0,700*	0,678*	0,631*	0,669*	-0,229

Izračunani koeficienti linearne regresije med vremenskimi parametri in tedenskim prirastkom celic kasnega lesa so izrazito drugačni kot pri ranem lesu. Izračunane korelacije z različnimi temperaturami zraka s tedenskimi prirastki so bile statistično značilne, vendar v negativni zvezi (preglednica 18). Previsoke temperature zraka v drugi polovici vegetacije torej niso ugodno vplivale na celično produkcijo. Z izjemo povprečne maksimalne tedenske temperature zraka se je s časovnim zamikom dni korelacijski koeficient nekoliko

povečeval, vendar za različne temperature različno. S padavinami smo zasledili negativne in dvakrat pozitivne korelacije, ki pa niso bile statistično značilne. Količina padavin v mesecu juliju in avgustu je bila 55 mm/mesec, padavine pa so bile tekom obeh mesecev dokaj enakomerno razporejene (slika 50). Na osnovi izračunov lahko sklepamo, da padavine v poznem poletju niso zavirale debelinske rasti dreves.

Preglednica 18: Korelacijski koeficienti linearne regresije med tedenskimi prirastki za kasni les in vremenskimi spremenljivkami za časovne zamike 1, 2, 3, 4, 5, 6 in 7 dni od dneva vzorčenja pri jelkah na Ravniku ($p < 0,05$). T_{pov} – povprečna tedenska temperatura zraka, T_{max} – odčitana tedenska maksimalna temperatura zraka, T_{min} – odčitana tedenska minimalna temperatura zraka, P – tedenska vsota padavin, * - statistično značilne korelacije; največje vrednosti korelacije za tedenski prirastek in posamezni vremenski parameter so odebeljene (prim. preglednica 20)

Figure 18: Correlation coefficients of linear regression between weekly increments of late wood and climate variables for time lags 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7 days from sampling date in silver firs at Ravnik ($p < 0,05$). T_{pov} – average weekly air temperature, T_{max} – actual weekly maximum air temperature, T_{min} – actual weekly minimum air temperature, P – weekly cumulative sum of precipitation, * - statistically significant correlations, highest values of correlation between weekly increment and individual climatic parameters are bolded (comp. table 20)

KASNI LES LATE WOOD	T_{pov}	T_{max}	T_{min}	P
Zam 1	-0,236	-0,146	-0,690*	-0,232
Zam 2	-0,349	-0,205	-0,411	-0,196
Zam 3	-0,480	-0,457	-0,534	-0,096
Zam 4	-0,590*	-0,475	-0,571	-0,033
Zam 5	-0,612*	-0,510	-0,589*	0,032
Zam 6	-0,584*	-0,510	-0,480	0,020
Zam 7	-0,494	-0,518	-0,436	-0,050

V spodnjih preglednicah 19 in 20 so prikazani vsi ostali koeficienti linearne regresije med tedenskimi prirastki celic in temperaturnimi spremenljivkami za časovni zamik, ko je bila dosežena najvišja zveza. V preglednicah 17 in 18 so te vrednosti odebeljene.

Preglednica 19: Koeficienti linearne regresije med tedenskimi prirastki celic ranega lesa pri jelkah na Ravniku ter temperaturnimi spremenljivkami za časovni zamik, ko je bila dosežena najvišja vrednost. T_{pov} – povprečna tedenska temperatura zraka, T_{max} – odčitana tedenska maksimalna temperatura zraka, T_{min} – odčitana tedenska minimalna temperatura zraka, P – tedenska vsota padavin, * - statistično značilne korelacije; največje vrednosti korelacije za tedenski prirastek in posamezni vremenski parameter so odebeljene (prim. preglednica 20)

Table 19: Coefficients of linear regression between weekly increments of early wood cells in silver firs at Ravnik and temperature variables for time lag when highest value was achieved. T_{pov} – average weekly air temperature, T_{max} – actual weekly maximum air temperature, T_{min} – actual weekly minimum air temperature, P – weekly cumulative sum of precipitation, * - statistically significant correlations, highest values of correlation between weekly increment and individual climatic parameters are bolded (comp. table 20)

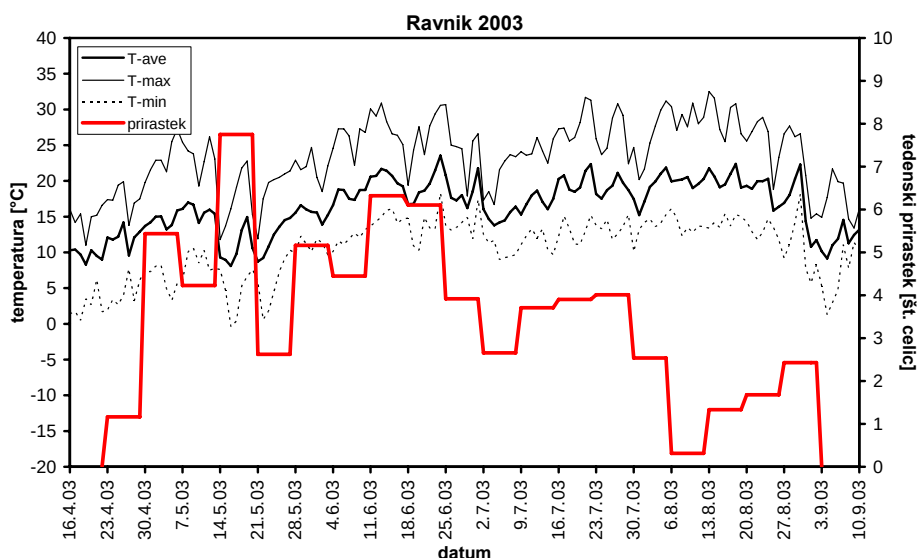
RANI LES EARLY WOOD	T_{pov}	T_{max}	T_{min}	P
a	-1,374	-6,926	-3,892	2,760
b	0,392	0,438	0,383	0,347
R^2	45,59	55,44	46,02	39,82
p	<0,05	<0,01	<0,05	<0,05

Preglednica 20: Koeficienti linearne regresije med tedenskimi prirastki celic kasnega lesa pri jelkah na Ravniku ter temperaturnimi spremenljivkami za časovni zamik, ko je bila dosežena najvišja vrednost. T_{pov} – povprečna tedenska temperatura zraka, T_{max} – odčitana tedenska maksimalna temperatura zraka, $T_{ed\ T_{max}}$ – povprečna maksimalna tedenska temperatura zraka, T_{min} – odčitana tedenska minimalna temperatura zraka, $T_{ed\ T_{min}}$ – povprečna minimalna tedenska temperatura zraka, linearna enačba: $prirastki = a + b * (T_{pov}, T_{max}, T_{ed\ T_{max}}, T_{min}, T_{ed\ T_{min}})$ (prim. preglednica 18)

Table 20: Coefficients of linear regression between weekly increments of late wood cells in silver firs at Ravnik and temperature variables for time lag when highest value was achieved. T_{pov} – average weekly air temperature, T_{max} – actual weekly maximum air temperature, $T_{ed\ T_{max}}$ – average maximum weekly air temperature, T_{min} – actual weekly minimum air temperature, $T_{ed\ T_{min}}$ – average minimum weekly air temperature, linear equation: $increments = a + b * (T_{pov}, T_{max}, T_{ed\ T_{max}}, T_{min}, T_{ed\ T_{min}})$ (comp. table 18)

KASNI LES LATE WOOD	T_{pov}	T_{max}	$T_{ed\ T_{max}}$	T_{min}	$T_{ed\ T_{min}}$
a	12,058	8,753	8,446	8,925	15,190
b	-0,513	-0,214	-0,246	-0,582	-0,967
R²	37,40	26,81	47,66	60,46	55,42
p	<0,10	<0,10	<0,05	<0,05	<0,05

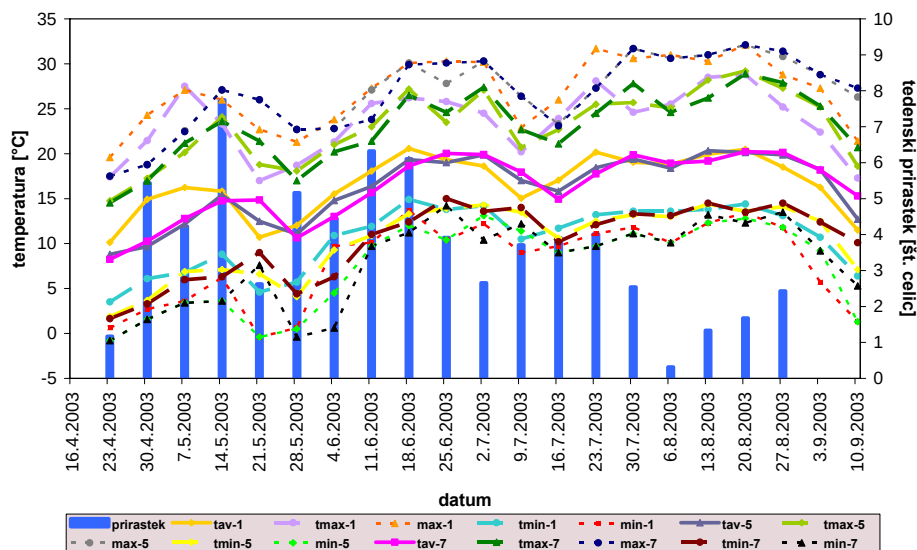
Ker na osnovi statističnih analiz nismo dobili statistično značilnih korelacij med tedenskimi ksilemskimi prirastki in padavinami, so na spodnjih slikah 75 in 76 prikazani le dejanski tedenski prirastki ksilemskih celic ranega in kasnega lesa ter dnevne povprečne, minimalne in maksimalne temperature. Slika 75 kaže, da se je kambijeva aktivnost začela, ko so bile minimalne temperature zraka nad 0°C, povprečne temperature pa okoli 10°C. Koeficienti linearne regresije in časovno zamikanje dni ter vizuelna ocena kažejo, da tedenski prirastki celic sovpadajo z gibanjem temperatur, vendar z nekoliko zamika. Iz tega lahko zaključimo, da se kambij nekoliko z zakasnitvijo odziva na zunanje temperature.



Slika 75: Povprečni dejanski tedenski prirastki jelk in povprečna, maksimalna in minimalna dnevna temperatura zraka na Ravniku tekom rastle sezone.

Figure 75: Average actual weekly increments of silver firs and average, maximum and minimum daily air temperature at Ravnik during the growth period.

Na spodnji sliki 76 so prikazani korelacijski koeficienti linearne regresije med povprečnimi dnevnimi prirastki celic v posameznem tednu za rani in kasni les ter povprečno tedensko temperaturo zraka, odčitano tedensko maksimalno temperaturo zraka, povprečno maksimalno tedensko temperaturo zraka, odčitano minimalno tedensko temperaturo zraka in povprečno minimalno tedensko temperaturo zraka za časovne zamike 1, 5 in 7 dni, ki so pokazali največjo statistično značilnost. Celični prirastek za rani les (od 23.4. do 9.7.2003) je bil v pozitivni korelaciji s temperaturo, za kasni les pa v negativni korelaciji.



Slika 76: Povprečni tedenski prirastki jelk na Ravniku in temperaturne spremenljivke zraka za časovne zamike, ki so pokazali najvišje korelacije: 1, 5 in 7 dni od dneva vzorčenja. T_{av} – povprečna tedenska temperatura zraka, T_{max} – odčitana tedenska maksimalna temperatura zraka, $T_{ed\ T_{max}}$ – povprečna maksimalna tedenska temperatura zraka, T_{min} – odčitana tedenska minimalna temperatura zraka, $T_{ed\ T_{min}}$ – povprečna minimalna tedenska temperatura zraka

Figure 76: Average weekly increments of silver firs at Ravnik and air temperature variables for time lag that showed highest correlation: 1, 5 and 7 days from sampling date. T_{av} – average weekly air temperature, T_{max} – actual weekly maximum air temperature, $T_{ed\ T_{max}}$ – average maximum weekly air temperature, T_{min} – actual weekly minimum air temperature, $T_{ed\ T_{min}}$ – average minimum weekly air temperature

4.3.2 Vpliv temperature in padavin na ksilogenezo pri navadni smreki na Sorškem polju

Pri Sorškemu polju koeficienti linearne regresije med tedenskimi prirastki celic ranega lesa in temperaturni parametri niso bili statistično značilni. Kljub temu so bili koeficienti dokaj visoki in pozitivni, največje vrednosti pa so dosegli za časovni zamik 3 dni oziroma za zamik 1 ali 2 dni (preglednica 21). Z naraščajočo temperaturo se je produkcija celic večala. Pri tedenskih vsotah padavin ni bilo statistično značilnih korelacij s tedenskimi prirastki celic ranega lesa, četudi so bile včasih vrednosti koeficientov relativno visoke. Razen zamika 1 dneva in 2 dni, so bili vsi ostali časovni zamiki v pozitivni korelaciji. Najvišjo vrednost smo dobili pri zamiku 5 dni. V povprečju je na Sorškem polju v letu 2003 v obdobju nastajanja ranega lesa (maj in prva polovica junija) padlo 55 mm/mesec padavin.

Količina padavin pa ni bila enakomerno razporejena; največ padavin je padlo v prvi polovici maja in v drugi polovici junija, ko je že začel nastajati kasni les (slika 56).

Preglednica 21: Korelacijski koeficienti linearne regresije med tedenskimi prirastki za rani les in vremenskimi spremenljivkami za časovne zamike 1, 2, 3, 4, 5, 6 in 7 dni od dneva vzorčenja pri smrekah na Sorškem polju ($p < 0,05$). T_{pov} – povprečna tedenska temperatura zraka, T_{max} – odčitana tedenska maksimalna temperatura zraka, $Ted T_{max}$ – povprečna maksimalna tedenska temperatura zraka, T_{min} – odčitana tedenska minimalna temperatura zraka, $Ted T_{min}$ – povprečna minimalna tedenska temperatura zraka, P – tedenska vsota padavin, * - statistično značilne korelacije; največje vrednosti korelacije za tedenski prirastek in posamezni vremenski parameter so odebeljene (prim. preglednica 23)

Table 21: Correlation coefficients of linear regression between weekly increments of early wood and climate variables for time lags 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7 days from sampling date in Norway spruce at Sorško polje ($p < 0,05$). T_{pov} – average weekly air temperature, T_{max} – actual weekly maximum air temperature, $Ted T_{max}$ – average maximum weekly air temperature, T_{min} – actual weekly minimum air temperature, $Ted T_{min}$ – average minimum weekly air temperature, P – weekly cumulative sum of precipitation, * - statistically significant correlations, highest values of correlation between weekly increment and individual climatic parameters are bolded (comp. table 23)

RANI LES EARLY WOOD	T_{pov}	T_{max}	$Ted T_{max}$	T_{min}	$Ted T_{min}$	P
Zam 1	0,401	0,460	0,523	0,206	0,416	-0,357
Zam 2	0,466	0,516	0,584	0,291	0,364	-0,422
Zam 3	0,641	0,638	0,660	0,236	0,348	0,219
Zam 4	0,395	0,547	0,475	0,235	0,268	0,477
Zam 5	0,365	0,442	0,424	0,210	0,267	0,516
Zam 6	0,296	0,409	0,373	0,271	0,179	0,357
Zam 7	0,295	0,400	0,393	0,215	0,083	0,370

Izračunani koeficienti linearne regresije med vremenskimi parametri in tedenskim prirastkom celic kasnega lesa so drugačni kot pri ranem lesu. Izračunane korelacije med različnimi temperaturami zraka in tedenskimi prirastki z izjemo povprečnim minimalnih tedenskih temperatur in odčitanih tedenskih minimalnih temperatur zraka niso bile statistično značilne. Korelacije med temperaturami in prirastki so bile vselej negativne (preglednica 22). Podobno kot pri jelkah na Ravniku tudi pri smrekah na Sorškem polju previsoke temperature zraka niso ugodno vplivale na celično produkcijo. S časovnim zamikom od 1 do 7 dni se je korelacijski koeficient povečeval. Padavine so bile v negativni zvezi s prirastkom in so bile samo za časovni zamik 1 dneva v statistično značilni zvezi s tedenskimi prirastki celic kasnega lesa. Količina padavin v mesecu juliju in avgustu je bila 55 mm/mesec, padavine pa so bile tekom obeh mesecev dokaj enakomerno razporejene (slika 56). Zakaj je bila celična produkcija v negativni zvezi s povprečno količino padavin v obdobju nastajanja kasnega lesa, je težko pojasniti. Rastišče na nanosih reke Save, kjer so sestoji smreke antropogenega nastanka, je podvrženo velikim sezonskim nihanjem količine vode v tleh, kar povzroča vodni stres. Rastišče za smrekove sestoeje ni primerno, zato je za smreke na Sorškem polju značilna rdeča trohnoba in pogosta prizadetost dreves z lubadarjem. Dejansko zvezo med celično produkcijo in količino padavin popačijo padavine konec julija, ko se je kambijeva aktivnost že zaključevala. Količina padavin je bila ob nadpovprečno visokih temperaturah zelo majhna, z izjemo prvih dni julija. Prodna tla ne zadržujejo velike količine vode, zato so se morebitne vodne zaloge v drugi polovici rastne sezone najverjetneje izčrpale. Padavine, ki so se pojavile konec julija, pa so bile prepozne za ponoven porast celičnih delitev.

Preglednica 22: Korelacijski koeficienti linearne regresije med tedenskimi prirastki za kasni les in vremenskimi spremenljivkami za časovne zamike 1, 2, 3, 4, 5, 6 in 7 dni od dneva vzorčenja pri smrekah na Sorškem polju ($p < 0,05$). T_{pov} – povprečna tedenska temperatura zraka, T_{max} – odčitana tedenska maksimalna temperatura zraka, $Ted T_{max}$ – povprečna maksimalna tedenska temperatura zraka, T_{min} – odčitana tedenska minimalna temperatura zraka, $Ted T_{min}$ – povprečna minimalna tedenska temperatura zraka, P – tedenska vsota padavin, * - statistično značilne korelacije; največje vrednosti korelacije za tedenski prirastek in posamezni vremenski parameter so odebeljene (prim. preglednica 24)

Table 22: Correlation coefficients of linear regression between weekly increments of late wood and climate variables for time lags 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7 days from sampling date in Norway spruce at Sorško polje ($p < 0,05$). T_{pov} – average weekly air temperature, T_{max} – actual weekly maximum air temperature, $Ted T_{max}$ – average maximum weekly air temperature, T_{min} – actual weekly minimum air temperature, $Ted T_{min}$ – average minimum weekly air temperature, P – weekly cumulative sum of precipitation, * - statistically significant correlations, highest values of correlation between weekly increment and individual climatic parameters are bolded (comp. table 24)

KASNI LES LATE WOOD	T_{pov}	T_{max}	$Ted T_{max}$	T_{min}	$Ted T_{min}$	P
Zam 1	0,408	0,017	0,459	-0,174	-0,10	-0,689*
Zam 2	0,227	0,161	0,289	-0,250	-0,312	-0,490
Zam 3	-0,043	-0,244	0,027	-0,439	-0,456	-0,474
Zam 4	-0,135	-0,364	-0,065	-0,526	-0,677*	-0,310
Zam 5	-0,380	-0,529	-0,382	-0,545	-0,731*	-0,329
Zam 6	-0,463	-0,526	-0,494	-0,736*	-0,868*	-0,178
Zam 7	-0,579	-0,543	-0,584	-0,612	-0,855*	-0,100

V spodnjih preglednicah 23 in 24 so prikazani vsi koeficienti linearne regresije med tedenskimi prirastki celic in temperaturnimi spremenljivkami za časovni zamik, ko je bila dosežena najvišja zveza. V preglednicah 21 in 22 so te vrednosti odebeljene.

Preglednica 23: Koeficienti linearne regresije med tedenskimi prirastki celic ranega lesa pri smrekah na Sorškem polju ter temperaturnimi spremenljivkami za časovni zamik, ko je bila dosežena najvišja vrednost. T_{pov} – povprečna tedenska temperatura zraka, T_{max} – odčitana tedenska maksimalna temperatura zraka, $Ted T_{max}$ – povprečna maksimalna tedenska temperatura zraka, T_{min} – odčitana tedenska minimalna temperatura zraka, $Ted T_{min}$ – povprečna minimalna tedenska temperatura zraka, linearna enačba: prirastki = $a + b * (T_{pov}, T_{max}, Ted T_{max}, T_{min}, Ted T_{min})$ (prim. preglednica 21)

Table 23: Coefficients of linear regression between weekly increments of early wood cells in Norway spruce at Sorško polje and temperature variables for time lag when highest value was achieved. T_{pov} – average weekly air temperature, T_{max} – actual weekly maximum air temperature, $Ted T_{max}$ – average maximum weekly air temperature, T_{min} – actual weekly minimum air temperature, $Ted T_{min}$ – average minimum weekly air temperature, linear equation: increments = $a + b * (T_{pov}, T_{max}, Ted T_{max}, T_{min}, Ted T_{min})$ (comp. table 21)

RANI LES EARLY WOOD	T_{pov}	T_{max}	$Ted T_{max}$	T_{min}	$Ted T_{min}$
a	-2,783	-2,821	-1,960	2,082	0,982
b	0,306	0,198	0,210	0,124	0,213
R²	41,14	40,66	43,60	8,49	17,31
p	<0,10	<0,10	<0,10	0,10	0,10

Preglednica 24: Koeficienti linearne regresije med tedenskimi prirastki celic kasnega lesa pri smrekah na Sorškem polju ter temperaturnimi spremenljivkami za časovni zamik, ko je bila dosežena najvišja vrednost. T_{pov} – povprečna tedenska temperatura zraka, T_{max} – odčitana tedenska maksimalna temperatura zraka, T_{min} – odčitana tedenska minimalna temperatura zraka, T_{max} – povprečna maksimalna tedenska temperatura zraka, T_{min} – povprečna minimalna tedenska temperatura zraka, linearna enačba: $prirastki = a + b * (T_{pov}, T_{max}, T_{min}, Ted T_{max}, Ted T_{min})$ (prim. preglednica 22)

Table 24: Coefficients of linear regression between weekly increments of late wood cells in Norway spruce at Sorško polje and temperature variables for time lag when highest value was achieved. T_{pov} – average weekly air temperature, T_{max} – actual weekly maximum air temperature, T_{min} – actual weekly minimum air temperature, T_{max} – average maximum weekly air temperature, T_{min} – average minimum weekly air temperature, linear equation: $increments = a + b * (T_{pov}, T_{max}, T_{min}, Ted T_{max}, Ted T_{min})$ (comp. table 22)

KASNI LES LATE WOOD	T_{pov}	T_{max}	T_{min}	T_{max}	T_{min}
a	8,573	9,104	7,441	8,329	10,438
b	-0,351	-0,252	-0,225	-0,604	-0,644
R²	33,47	29,51	34,07	54,18	73,07
p	0,10	0,10	0,10	<0,10	<0,05

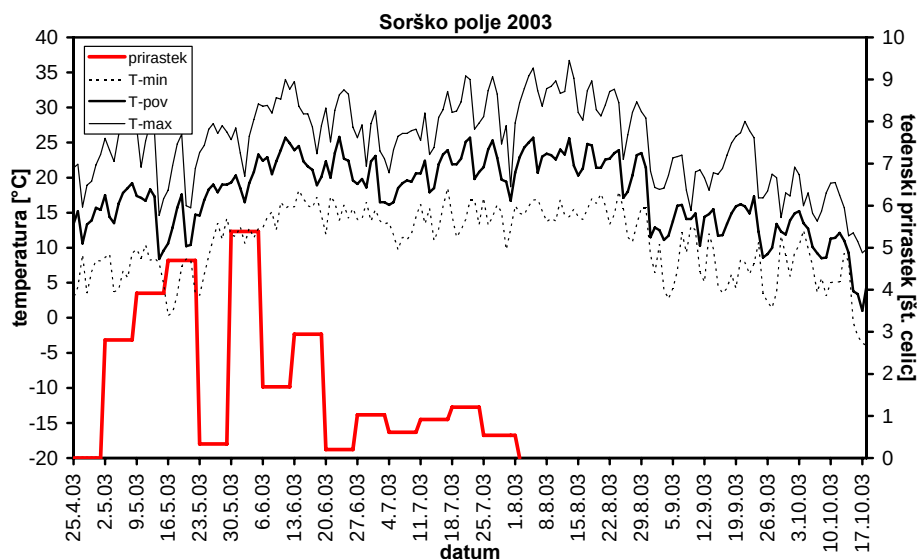
Izračunani korelacijski koeficienti linearne regresije za padavine in tedenske prirastke celic kasnega lesa za obdobje med 20.6. in 18.7.2003 so prikazani v preglednici 25. Iz podatkov smo izločili tiste iz zadnjih 2 tednov vegetacije, ko padavine najbrž niso več vplivale na zaključek kambijeve aktivnosti. Preverili smo, ali so se vrednosti korelacijskih koeficientov ob tem spremenile. Pri časovnem zamiku 1 dan so bile korelacije še vedno negativne, vendar pa so se ob zamiku 4 dni spremenile v pozitivne. Vrednosti so se z zamikom od 1 do 7 dni zviševale (preglednica 25). Podoben zasuk vrednosti iz negativnih v pozitivne lahko opazimo tudi pri ranem lesu. Rezultati bi lahko pomenili, da količina padavin pozitivno vpliva na debelinsko rast dreves, a s časovnim zamikom.

Preglednica 25: Korelacijski koeficienti linearne regresije med tedenskimi prirastki za kasni les (med 20.6. in 18.7.2003) in vremenskimi spremenljivkami za časovne zamike 1, 2, 3, 4, 5, 6 in 7 dni od dneva vzorčenja pri smrekah na Sorškem polju ($p < 0,05$). P – tedenska vsota padavin, * - statistično značilne korelacije

Table 25: Correlation coefficients of linear regression between weekly increments for late wood (between 20.6. and 18.7.2003) and climate variables for time lags 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7 days from sampling date in Norway spruces at Sorško polje ($p < 0,05$). T_{pov} – average weekly air temperature, P – weekly cumulative sum of precipitation, * - statistically significant correlations

KASNI LES LATE WOOD	P
Zam 1	-0,777
Zam 2	-0,390
Zam 3	-0,348
Zam 4	0,262
Zam 5	0,020
Zam 6	0,737
Zam 7	0,741

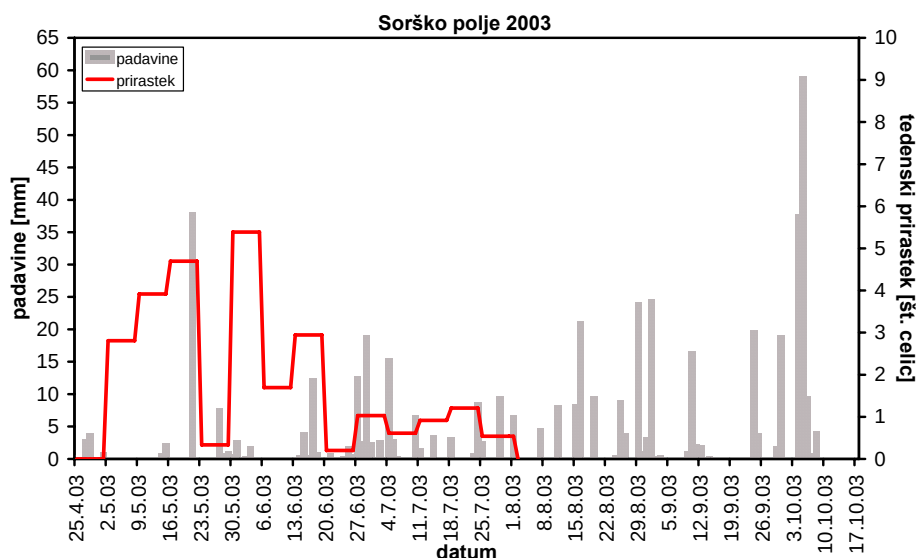
Na spodnji sliki 77 so prikazani dejanski tedenski prirastki ksilemskih celic ranega in kasnega lesa ter dnevne povprečne, minimalne in maksimalne temperature. Slika 77 kaže, da se je kambijeva aktivnost začela, ko so se minimalne temperature gibale okoli 0°C, povprečne temperature zraka pa nad 10°C. Tedenski prirastki celic sovpadajo z gibanjem temperatur, vendar nekoliko z zamikom.



Slika 77: Povprečni dejanski tedenski prirastki smrek in povprečna, maksimalna in minimalna dnevna temperatura zraka na Sorškem polju tekom rastne sezone.

Figure 77: Average actual weekly increments of Norway spruce and average, maximum and minimum daily air temperature at Sorško polje during the growth period.

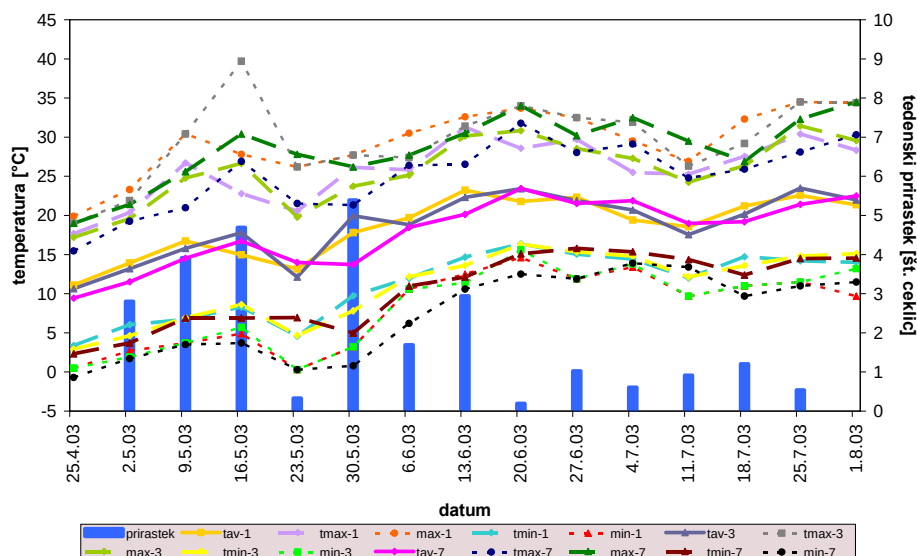
Na sliki 78 so prikazani dejanski tedenski prirastki ksilemskih celic ranega in kasnega lesa ter skupna dnevna količina padavin. Vizuelno je težko oceniti kakšno koli zvezo med dnevno količino padavin in povprečnim dejanskim tedenskim prirastkom celic ranega lesa. V obdobju nastajanja kasnega lesa vrednosti padavin in povprečnih dejanskih tedenskih prirastkov nekoliko bolj sovpadajo, razen zadnja 2 tedna, ko se je debelinska rast drevesa zaključevala in klimatske razmere najverjetneje niso imeli vpliva na delovanje kambija (slika 78).



Slika 78: Povprečni dejanski tedenski prirastki smrek in skupna dnevna količina padavin na Sorškem polju tekom rastne sezone.

Figure 78: Average actual weekly increments of Norway spruce and total daily amount of precipitation at Sorško polje during the growth period.

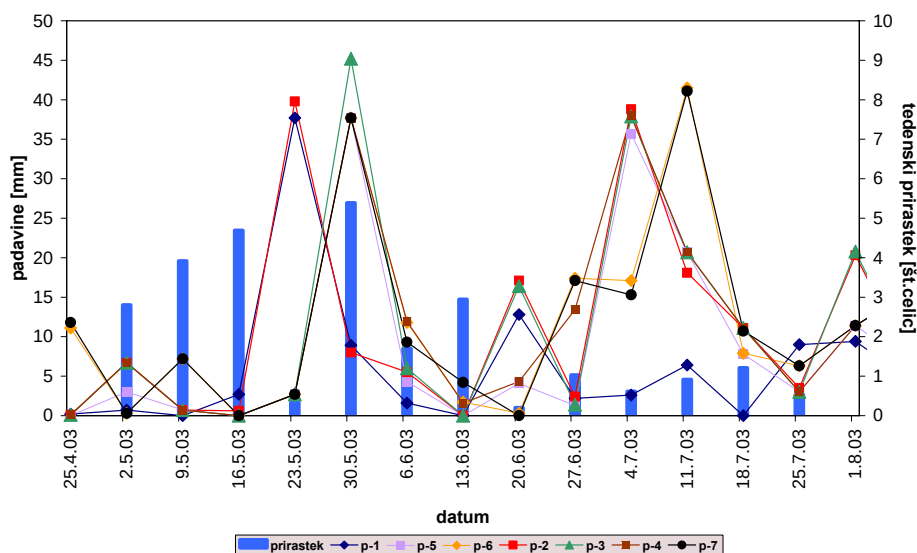
Na spodnji sliki 79 so prikazani korelacijski koeficienti linearne regresije med povprečnimi dnevnimi prirastki celic v posameznem tednu za rani in kasni les ter povprečno tedensko temperaturo zraka, odčitano tedensko maksimalno temperaturo zraka, povprečno maksimalno tedensko temperaturo zraka, odčitano minimalno tedensko temperaturo zraka in povprečno minimalno tedensko temperaturo zraka za časovne zamike 1, 3 in 7 dni, ki so pokazali največjo statistično značilnost. Celični prirastek za rani les (od 25.4. do 13.6.2003) je bil v pozitivni korelaciji s temperaturo, za kasni les pa v negativni korelaciji.



Slika 79: Povprečni tedenski prirastki smrek na Sorškem polju in temperaturne spremenljivke zraka za časovne zamike, ki so pokazali najvišje korelacije: 1, 3 in 7 dni od dneva vzorčenja. T_{av} – povprečna tedenska temperatura zraka, T_{max} – odčitana tedenska maksimalna temperatura zraka, $Ted T_{max}$ – povprečna maksimalna tedenska temperatura zraka, T_{min} – odčitana tedenska minimalna temperatura zraka, $Ted T_{min}$ – povprečna minimalna tedenska temperatura zraka

Figure 79: Average weekly increments of Norway spruce at Sorško polje and air temperature variables for time lag that showed highest correlation: 1, 3 and 7 days from sampling date. T_{av} – average weekly air temperature, T_{max} – actual weekly maximum air temperature, $Ted T_{max}$ – average maximum weekly air temperature, T_{min} – actual weekly minimum air temperature, $Ted T_{min}$ – average minimum weekly air temperature

Spodnja slika 80 prikazuje korelacijske koeficiente linearne regresije med povprečnimi dnevnimi prirastki celic v posameznem tednu za rani in kasni les ter tedensko količino padavin za časovne zamike 1, 2, 3, 4, 5, 6 in 7 dni. Za rani les je bila največja pozitivna korelacija za zamik 5 dni, za kasni les pa negativna korelacija za zamik 1 dan.



Slika 80: Povprečni tedenski prirastki smrek na Sorškem polju in tedenska količina padavin za časovne zamike 1, 2, 3, 4, 5, 6 in 7 dni od dneva vzorčenja pri smrekah na Sorškm polju. P – tedenska vsota padavin

Figure 80: Average weekly increments of Norway spruce at Sorško polje and weekly amount of precipitation for time lags 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7 days from sampling date in Norway spruce at Sorško polje. P – weekly cumulative sum of precipitation

4.3.3 Vpliv temperature in padavin na ksilogenezo pri navadni smreki na Pokljuki

Pri smrekah na Pokljuki so bili vsi koeficienti linearne regresije med tedenskimi prirastki celic ranega lesa ter temperaturni parametri statistično značilni. Koeficienti so bili v vseh primerih pozitivni, največje vrednosti pa so dosegli za časovni zamik 1 dan (preglednica 26). Pri tedenskih kumulativah padavin ni bilo statistično značilnih korelacij s tedenskimi prirastki celic ranega lesa. Korelacija je bila vedno pozitivna, največja vrednost je bila dosežena pri zamiku 4 dni. V povprečju je na Pokljuki v letu 2003 v obdobju nastajanja ranega lesa (9.5-11.7.2003) padlo preko 100 mm padavin na mesec. Količina padavin je bila enakomerno razporejena, zato najverjetneje na tem rastišču ni predstavljala omejitvenega dejavnika za rast dreves (slika 63).

Preglednica 26: Korelacijski koeficienti linearne regresije med tedenskimi prirastki za rani les in vremenskimi spremenljivkami za časovne zamike 1, 2, 3, 4, 5, 6 in 7 dni od dneva vzorčenja pri smrekah na Pokljuki ($p < 0,05$). T_{pov} – povprečna tedenska temperatura zraka, T_{max} – odčitana tedenska maksimalna temperatura zraka, $Ted T_{max}$ – povprečna maksimalna tedenska temperatura zraka, T_{min} – odčitana tedenska minimalna temperatura zraka, $Ted T_{min}$ – povprečna minimalna tedenska temperatura zraka, P – tedenska vsota padavin, * - statistično značilne korelacije; največje vrednosti korelacije za tedenski prirastek in posamezni vremenski parameter so odebeljene (prim. preglednica 28)

Table 26: Correlation coefficients of linear regression between weekly increments of early wood and climate variables for time lags 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7 days from sampling date in Norway spruce at Pokljuka ($p < 0,05$). T_{pov} – average weekly air temperature, T_{max} – actual weekly maximum air temperature, $Ted T_{max}$ – average maximum weekly air temperature, T_{min} – actual weekly minimum air temperature, $Ted T_{min}$ – average minimum weekly air temperature, P – weekly cumulative sum of precipitation, * - statistically significant correlations, highest values of correlation between weekly increment and individual climatic parameters are bolded (comp. table 28)

RANI LES EARLY WOOD	T_{pov}	T_{max}	$Ted T_{max}$	T_{min}	$Ted T_{min}$	P
Zam 1	0,729*	0,457	0,552*	0,634*	0,736*	0,072
Zam 2	0,675*	0,326	0,479	0,595*	0,701*	0,038
Zam 3	0,602*	0,144	0,359	0,631*	0,618*	0,113
Zam 4	0,609*	0,249	0,296	0,630*	0,666*	0,373
Zam 5	0,599*	0,383	0,303	0,615*	0,617*	0,372
Zam 6	0,565*	0,293	0,291	0,634*	0,574*	0,319
Zam 7	0,530	0,315	0,281	0,538	0,521	0,352

Izračunani koeficienti linearne regresije med vremenskimi parametri in tedenskim prirastkom celic kasnega lesa so drugačni kot pri ranem lesu. Kot na preostalih dveh rastiščih so bile izračunane korelacije z različnimi temperaturami zraka s tedenskimi prirastki negativne. Vrednosti so bile v vseh primerih statistično značilne in so naraščale s časovnim zamikom od 1 do 7 dni (preglednica 27). Previsoke temperature zraka torej tudi na tem rastišču niso ugodno vplivale na celično produkcijo. V obdobju nastajanja kasnega lesa smo dobili pozitivne korelacije s količino padavin, ki pa niso bile statistično značilne. Največja vrednost korelacije je bila za zamik 1 dan. Količina padavin v mesecu juliju in avgustu je bila preko 155 mm/mesec, z enakomerno razporeditvijo padavin (slika 63).

Preglednica 27: Korelacijski koeficienti linearne regresije med tedenskimi prirastki za kasni les in vremenskimi spremenljivkami za časovne zamike 1, 2, 3, 4, 5, 6 in 7 dni od dneva vzorčenja pri smrekah na Pokljuki ($p < 0,05$). T_{pov} – povprečna tedenska temperatura zraka, T_{max} – odčitana tedenska maksimalna temperatura zraka, $Ted T_{max}$ – povprečna maksimalna temperatura zraka, T_{min} – odčitana tedenska minimalna temperatura zraka, $Ted T_{min}$ – povprečna minimalna tedenska temperatura zraka, P – tedenska vsota padavin, * - statistično značilne korelacije, največje vrednosti korelacije za tedenski prirastek in posamezni vremenski parameter so odebeljene (prim. preglednica 29)

Table 27: Correlation coefficients of linear regression between weekly increments of late wood and climate variables for time lags 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7 days from sampling date in Norway spruce at Pokljuka ($p < 0,05$). T_{pov} – average weekly air temperature, T_{max} – actual weekly maximum air temperature, $Ted T_{max}$ – average maximum weekly air temperature, T_{min} – actual weekly minimum air temperature, $Ted T_{min}$ – average minimum weekly air temperature, P – weekly cumulative sum of precipitation, * - statistically significant correlations, highest values of correlation between weekly increment and individual climatic parameters are bolded (comp. table 29)

KASNI LES LATE WOOD	T_{pov}	T_{max}	$Ted T_{max}$	T_{min}	$Ted T_{min}$	P
Zam 1	-0,690	-0,688	-0,772*	-0,612	-0,642	0,317
Zam 2	-0,755*	-0,801*	-0,806*	-0,607	-0,708	0,245
Zam 3	-0,744*	-0,890*	-0,779*	-0,452	0,472	0,231
Zam 4	-0,817*	-0,959*	-0,641	-0,508	-0,894*	0,238
Zam 5	-0,834*	-0,965*	-0,796*	-0,622	-0,913*	0,165
Zam 6	0,887*	-0,955*	-0,821*	-0,702	-0,995*	0,166
Zam 7	-0,908*	-0,953*	-0,867*	-0,672	-0,877*	0,308

V spodnjih preglednicah 28 in 29 so prikazani vsi koeficienti linearne regresije med tedenskimi prirastki celic in temperaturnimi spremenljivkami za časovni zamik, ko je bila dosežena najvišja zveza. V preglednicah 26 in 27 so te vrednosti odebeljene.

Preglednica 28: Koeficienti linearne regresije med tedenskimi prirastki celic ranega lesa pri smrekah na Pokljuki ter temperaturnimi spremenljivkami za časovni zamik, ko je bila dosežena najvišja vrednost. T_{pov} – povprečna tedenska temperatura zraka, T_{max} – odčitana tedenska maksimalna temperatura zraka, $Ted T_{max}$ – povprečna maksimalna tedenska temperatura zraka, T_{min} – odčitana tedenska minimalna temperatura zraka, $Ted T_{min}$ – povprečna minimalna tedenska temperatura zraka, linearna enačba: prirastki = $a + b * (T_{pov}, T_{max}, Ted T_{max}, T_{min}, Ted T_{min})$ (prim. preglednica 26)

Table 28: Coefficients of linear regression between weekly increments of early wood cells in Norway spruce at Pokljuki and temperature variables for time lag when highest value was achieved. T_{pov} – average weekly air temperature, T_{max} – actual weekly maximum air temperature, $Ted T_{max}$ – average maximum weekly air temperature, T_{min} – actual weekly minimum air temperature, $Ted T_{min}$ – average minimum weekly air temperature, linear equation: increments = $a + b * (T_{pov}, T_{max}, Ted T_{max}, T_{min}, Ted T_{min})$ (comp. table 26)

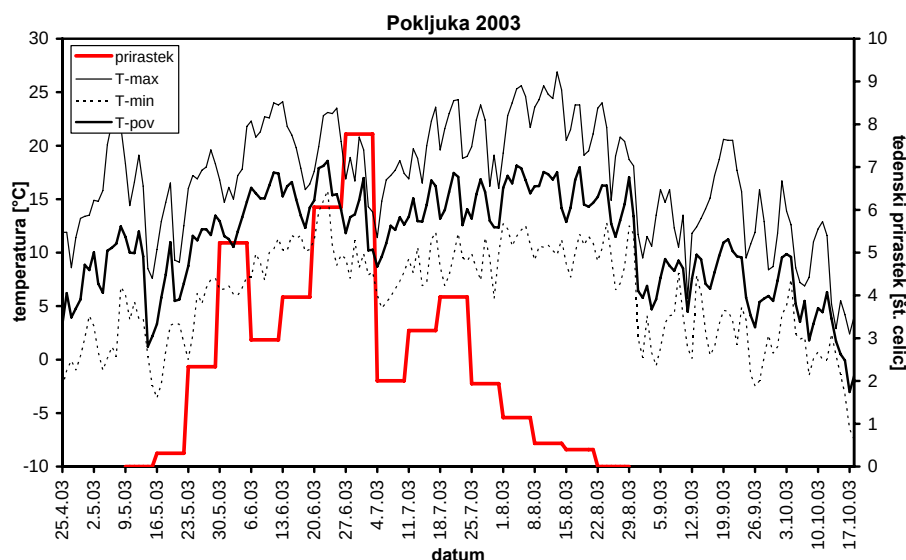
RANI LES EARLY WOOD	T_{pov}	T_{max}	$Ted T_{max}$	T_{min}	$Ted T_{min}$
a	-3,235	-5,873	-4,390	2,217	0,241
b	0,553	0,440	0,439	0,309	0,485
R²	53,10	20,85	30,43	40,17	58,18
p	<0,05	0,10	<0,10	<0,05	<0,05

Preglednica 29: Koeficienti linearne regresije med tedenskimi prirastki celic kasnega lesa pri smrekah na Pokljuki ter temperaturnimi spremenljivkami za časovni zamik, ko je bila dosežena najvišja vrednost. T_{pov} – povprečna tedenska temperatura zraka, T_{max} – odčitana tedenska maksimalna temperatura zraka, $T_{ed\ T_{max}}$ – povprečna maksimalna tedenska temperatura zraka, T_{min} – odčitana tedenska minimalna temperatura zraka, $T_{ed\ T_{min}}$ – povprečna minimalna tedenska temperatura zraka, linearna enačba: $prirastki = a + b * (T_{pov}, T_{max}, T_{ed\ T_{max}}, T_{min}, T_{ed\ T_{min}})$ (prim. preglednica 27)

Table 29: Coefficients of linear regression between weekly increments of kasnega wood cells in Norway spruce at Pokljuki and temperature variables for time lag when highest value was achieved. T_{pov} – average weekly air temperature, T_{max} – actual weekly maximum air temperature, $T_{ed\ T_{max}}$ – average maximum weekly air temperature, T_{min} – actual weekly minimum air temperature, $T_{ed\ T_{min}}$ – average minimum weekly air temperature, linear equation: $increments = a + b * (T_{pov}, T_{max}, T_{ed\ T_{max}}, T_{min}, T_{ed\ T_{min}})$ (comp. table 27)

KASNI LES LATE WOOD	T_{pov}	T_{max}	$T_{ed\ T_{max}}$	T_{min}	$T_{ed\ T_{min}}$
a	12,680	16,113	10,838	5,799	13,120
b	-0,760	-0,620	-0,453	-0,592	-1,323
R²	82,46	93,06	75,11	49,24	99,00
p	<0,05	<0,01	<0,05	0,10	<0,01

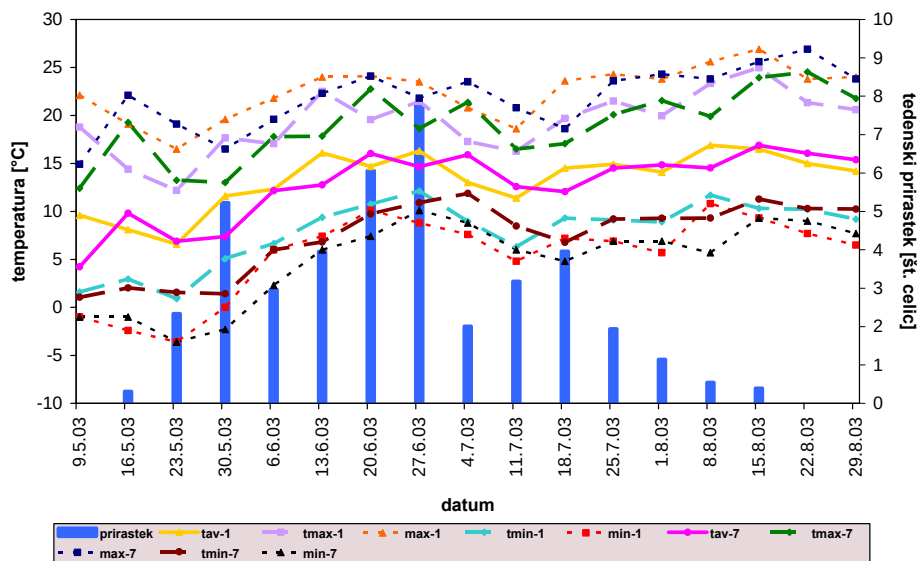
Na osnovi statističnih analiz nismo dobili statistično značilnih korelacij med tedenskimi ksilemskimi prirastki in padavinami, zato so na spodnjih slikah 81 in 82 prikazani le dejanski tedenski prirastki ksilemskih celic ranega in kasnega lesa ter dnevne povprečne, minimalne in maksimalne temperature za vizuelno oceno. Iz rezultatov analiz smo zaključili, da padavine na tem rastišču niso omejevale debelinske dinamike rasti dreves. Slika 81 kaže, da se je kambijeva aktivnost začela, ko so bile minimalne temperature še vedno pod 0°C, povprečne temperature zraka pa okoli 5°C. Tedenski prirastki celic ranega lesa sovpadajo z gibanjem temperatur, vendar tudi tu z zamikom.



Slika 81: Povprečni dejanski tedenski prirastki smrek in povprečna, maksimalna in minimalna dnevna temperatura zraka na Pokljuki tekom rastle sezone.

Figure 81: Average actual weekly increments of Norway spruce and average, maximum and minimum daily air temperature at Pokljuka during the growth period.

Na spodnji sliki 82 so prikazani korelacijski koeficienti linearne regresije med povprečnimi dnevnimi prirastki celic v posameznem tednu za rani in kasni les ter povprečno tedensko temperaturo zraka, odčitano tedensko maksimalno temperaturo zraka, povprečno maksimalno tedensko temperaturo zraka, odčitano minimalno tedensko temperaturo zraka in povprečno minimalno tedensko temperaturo zraka za časovne zamike 1 in 7 dni, ki so pokazali največjo statistično značilnost. Celični prirastek za rani les (od 9.5. do 11.7.2003) je bil v pozitivni korelaciji s temperaturo, za kasni les pa v negativni korelaciji.



Slika 82: Povprečni tedenski prirastki smrek na Pokljuki in temperaturne spremenljivke zraka za časovna zamika, ki so pokazali najvišje korelacije: 1 in 7 dni od dneva vzorčenja. T_{av} – povprečna tedenska temperatura zraka, T_{max} – odčitana tedenska maksimalna temperatura zraka, $T_{ed\ T_{max}}$ – povprečna maksimalna tedenska temperatura zraka, T_{min} – odčitana tedenska minimalna temperatura zraka, $T_{ed\ T_{min}}$ – povprečna minimalna tedenska temperatura zraka

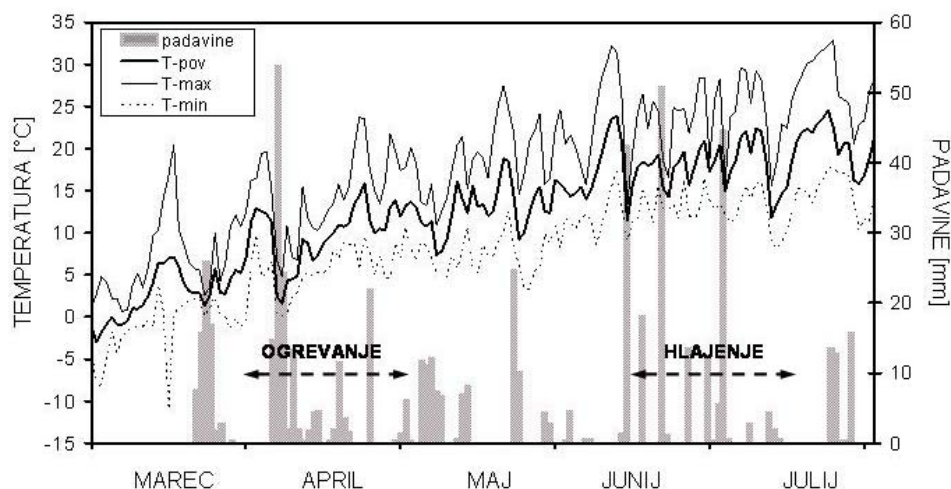
Figure 82: Average weekly increments of Norway spruce at Pokljuka and air temperature variables for time lag that showed highest correlation: 1 and 7 days from sampling date. T_{av} – average weekly air temperature, T_{max} – actual weekly maximum air temperature, $T_{ed\ T_{max}}$ – average maximum weekly air temperature, T_{min} – actual weekly minimum air temperature, $T_{ed\ T_{min}}$ – average minimum weekly air temperature

4.4 OGREVANJE IN HLAJENJE DELA DEBLA NAVADNE SMREKE V LETU 2004

Alternativen način študij vplivov določenih klimatskih dejavnikov na posamezne procese ksilogeneze je izpostavitve delov drevesa v obdobju kambijeve aktivnosti ali dormance eksperimentalno nadzorovanim razmeram.

4.4.1 Klimatske razmere med izvajanjem eksperimentov gretja in hlajenja

Povprečne, maksimalne in minimalne temperature zraka zabeležene v obdobju od 20. marca do 20. julija 2004 v času izvajanja obeh eksperimentov so prikazane na sliki 83. V obdobju med 29.3.2004 in 3.5.2004, ko smo ogrevali del debla smreke, so bili klimatske razmere dokaj mile, z minimalnimi temperaturami pod 0°C le v prvih dneh izvajanja poskusa. Temperatura zraka je med našim grelnim eksperimentom postopoma naraščala, vendar maksimalne temperature niso presegle 25°C. Med nadzorovanim ohlajanjem dela debla smreke v obdobju med 14.6.2004 in 21.7.2004 je bilo precej topleje kot med prejšnjim poskusom. Minimalne temperature so bile vselej nad 5°C, maksimalne pa le redko nad 30°C. V splošnem je bil v času izvajanja obeh eksperimentov najbolj moker mesec april, s skupno količino padavin 169 mm, najbolj suh pa julij, ko je padlo 100 mm padavin.

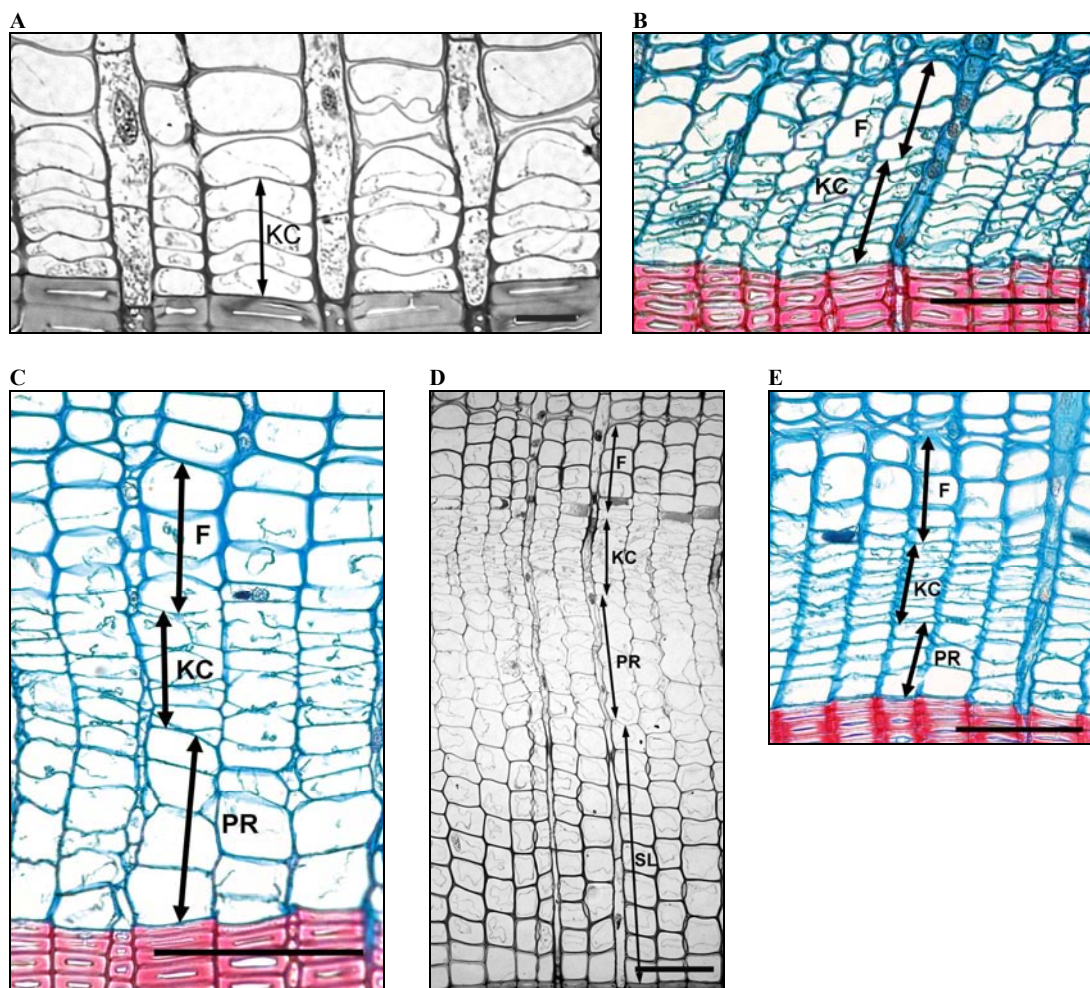


Slika 83: Povprečne, maksimalne in minimalne dnevne temperature zraka ter količina padavin v Ljubljani (323 m n.v.) v letu 2004 med izvajanjem gretja in hlajenja dela debla navadne smreke. Obdobje izvajanja obeh eksperimentov je označeno s puščicama.

Figure 83: Average, maximum and minimum daily air temperatures and amount of precipitation in Ljubljana (323 m a.s.l.) in the year 2004 during heating and cooling of stem portion of Norway spruce. Periods of heating and cooling experiments are indicated by arrows. Datum = date, temperatura = temperature, padavine = precipitation, ogrevanje = heating, hlajenje = cooling

4.4.2 Poskus z ogrevanjem

Del debla drevesa smo pričeli ogrevati pred začetkom redne kambijeve aktivnosti, t.j. v obdobju kambijevega mirovanja. Na dan pričetka poskusa, 29.3.2004 v kambiju nismo zasledili celičnih delitev niti pri kontrolnem drevesu niti pri drevesu namenjenem grelnemu eksperimentu. Dormanten kambij je sestavljalo približno 4 do 5 plasti celic z ozkimi radialnimi dimenzijami (slika 84A). Po 10 dneh ogrevanja smo na vzorcu odvzetem na ogrevanem delu debla zasledili začetek delitev v kambiju, vendar le na floemski strani. Floemski prirastek so predstavljale 3 plasti sitastih celic ranega floema. Število celic v kambiju je tedaj naraslo na 7 do 8 (slika 84B). Na vzorcu odvzetem iz kontrolnega drevesa ter vzorcu odvzetem nad ogrevanim delom debla v tem času ni bilo opaziti kambijeve aktivnosti. Po 20 dneh ogrevanja se je kambijeva aktivnost pričela tudi na ksilemski strani. Kambij ogrevanega vzorca je bil sestavljen iz 7 do 8 plasti celic, tekoči floemski prirastek iz 3 do 4 plasti sitastih celic in tekoči ksilemski prirastek iz 3 do 5 plasti traheid ranega lesa v fazi postkambijske rasti (slika 84C). Pri kontrolnem drevesu in vzorcu odvzetem nad ogrevanim delom drevesa je bil kambij še vedno dormanten in širok do 5 plasti celic. Po 30 dneh ogrevanja, 3. 5. 2004, se je redna kambijeva aktivnost pričela tudi pri kontrolnem drevesu in nad ogrevanim delom debla. Kambij je bil širok 7 do 8 plasti celic, rani floem so sestavljale 3 plasti sitastih celic ter ksilem 3 plasti radialno rastočih traheid ranega lesa (slika 84E). V istem času je pri ogrevanem vzorcu nastalo do 15 plasti celic ranega lesa (slika 84D). V fazi postkambijske rasti je bilo 5 do 6 plasti celic, v fazi odlaganja sekundarne celične stene in lignifikacije pa 7 do 9 plasti celic (slika 84E). Popolnoma oblikovanih traheid nismo zasledili, vendar pa so bile najstarejše traheide tekoče ksilemske branike, ki so se nahajale ob kasnem lesu branike prejšnjega leta, v zaključnih fazah procesa diferenciacije. Floemski prirastek je bil sestavljen iz 5 do 6 plasti sitastih celic, ob kambijevih celicah je bil že viden tangencialni pas aksialnega parenhima, ki razmejuje sitaste celice ranega in kasnega floema.

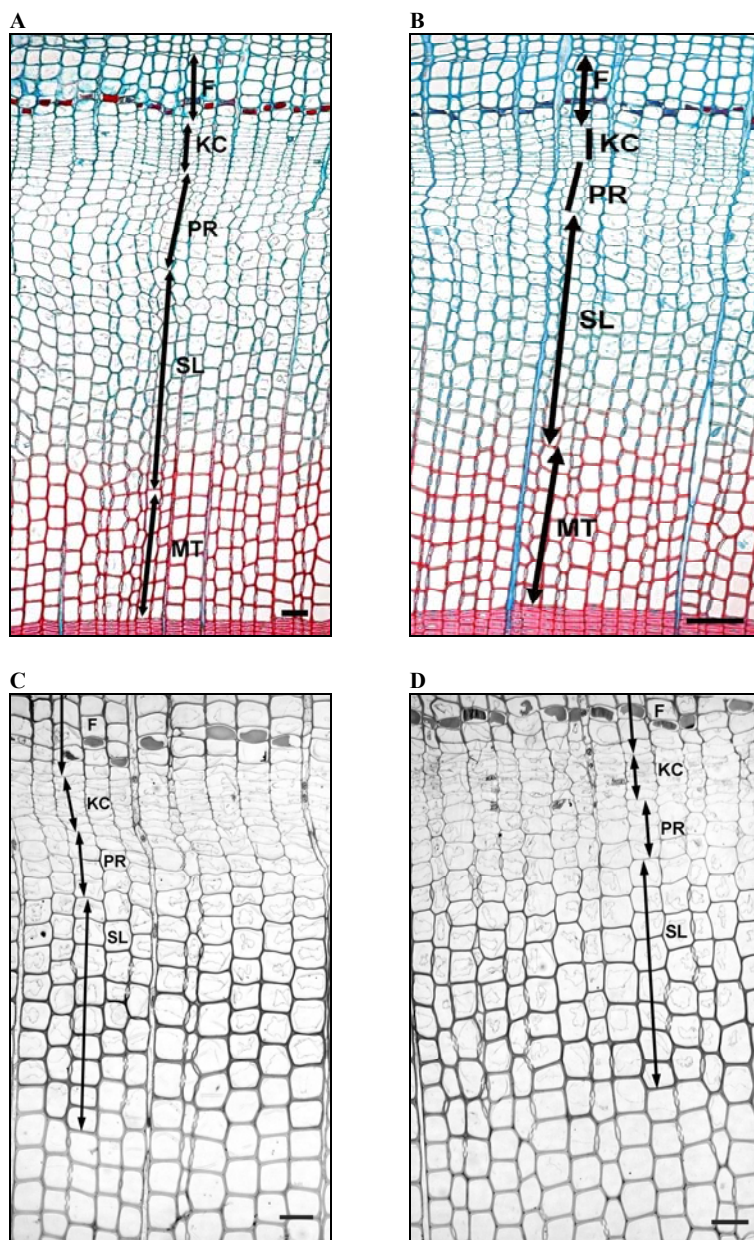


Slika 84: Odziv kambija na eksperimentalno ogrevanje. A – Dormanten kambij, sestavljen iz 4 do 5 plasti kambijevih celic; B – Floemske celice nastale po 10 dneh ogrevanja; C – Floemske in ksilemske celice v postkambijski rasti nastale po 20 dnevih ogrevanja; D – Floemske in ksilemske celice v postkambijski rasti ter fazi odlaganja sekundarne celične stene in lignifikacije nastale po 30 dnevih ogrevanja; E – Pričetek redne kambijeve aktivnosti pri kontrolnem drevesu po 30 dneh; F – floemske celice, KC – kambijeve celice, PR – ksilemske celice v postkambijski rasti, SL – ksilemske celice v fazi odlaganja sekundarne celične stene in lignifikacije; A: daljica = 50 µm; B, C, D, E: daljica = 100 µm

Figure 84: Response of the cambium to heating experiment. A – Dormant cambium consisting of 4 to 5 layers of cambial cells; B – Phloem cells formed after 10 days of heating; C – Phloem and xylem cells in postcambial growth formed after 20 days of heating; D – Phloem and xylem cells in postcambial growth and phase of secondary cell wall formation and lignification formed after 30 days of heating; E – Beginning of regular cambial activity in control tree after 30 days; F – phloem cells, KC – cambial cells, PR – xylem cells in postcambial growth, SL – xylem cells undergoing secondary cell wall deposition and lignification; A: scale bars = 50 µm; B, C, D, E: scale bars = 100 µm

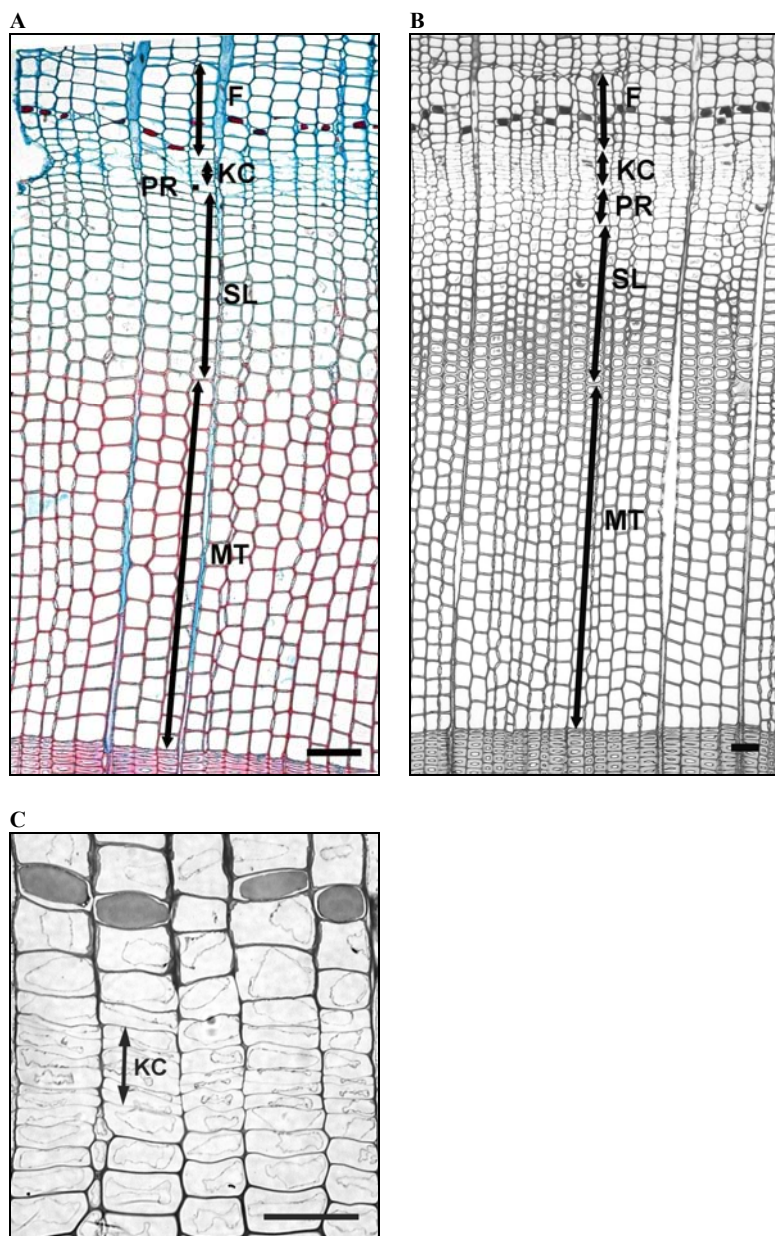
4.4.3 Poskus z ohlajanjem

S poskusom ohlajanja dela debla smreke smo začeli 14.6.2004, na višku kambijeve aktivnosti. Na vzorcih odvzetih na dan začetka eksperimenta je bila kambij širok 8 do 10 plasti celic (slika 85A). Nastali floemski prirastek so sestavljale 3 do 4 plasti sitastih celic ranega floema, sledil je tangencialni pas aksialnega parenhima ter 1 do 2 plasti sitastih celic kasnega floema. V tekoči ksilemski braniki je bilo v fazi postkambijske rasti do 7 plasti celic, v fazi odlaganja sekundarne celične stene ter lignifikacije pa 9 do 10 plasti celic. Popolnoma oblikovanih je bilo do 6 plasti traheid ranega lesa. Po 10 in 20 dnevih eksperimenta med kontrolnim, hlajenim vzorcem ter vzorcem odvzetim nad ohlajanim delom debla na anatomskem nivoju ni bilo zaslediti nobenih razlik v sestavi floema, ksilema ali kambija (slika 85B, C, D). Kambij je štel 6 do 7 plasti celic, v fazi postkambijske rasti je bilo 6 (po 10 dneh) oziroma do 4 (po 20 dneh) plasti celic ranega lesa. V procesu sinteze sekundarne stene in lignifikacije je bilo v povprečju 11 celic in zrelih traheid je bilo okoli 8 (po 10 dneh) oziroma 12 (po 20 dneh) plasti. Floem je bil sestavljen iz 3 do 4 plasti sitastih celic ranega lesa z velikimi radialnimi dimenzijami in tankimi celičnimi stenami. Sledil je sklenjen tangencialni pas aksialnega parenhima in temu do 3 plasti celic kasnega floema z majhnimi radialnimi dimenzijami in debelejšimi celičnimi stenami. Prve razlike med kontrolnim, in hlajenim vzorcem ter vzorcem odvzetim nad hlajenim delom debla smo na ksilemski strani opazili po 30 dneh hlajenja, 20.7.2004 (slika 86A, B). Pri hlajenem vzorcu se je pričel tvoriti kasni les. Radialne dimenzije traheid neposredno ob kambiju so bile majhne, v fazi postkambijske rasti sta bili največ 2 plasti celic. Število celic v kambiju se je zmanjšalo na okoli 5 plasti celic, kar je značilno za dormantno obdobje (slika 86C). Na vzorcu odvzetem pri kontrolnem drevesu in vzorcu odvzetem nad hlajenim delom debla je bil kambij širši, sestavljen iz do 8 plasti celic. Pri teh dveh vzorcih so na ksilemsko stran še vedno nastajale celice ranega oziroma prehodnega lesa (slika 86A). V fazi postkambijske rasti je bilo 6 do 7 plasti celic. Na floemski strani tudi po 30 dneh na mikroskopskem nivoju nismo opazili nobenih razlik med hlajenim in nehlajenima vzorcema. Floem je bil sestavljen iz 3 do 4 plasti celic ranega floema, sledil je sklenjen tangencialni aksialnega parenhima in do 4 plasti celic kasnega floema.



Slika 85: Odziv kambija na eksperimentalno ohlajanje. A – Stanje v floemu, kambiju in ksilemu ob pričetku eksperimenta v sredini junija; B – Stanje v floemu, kambiju in ksilemu pri kontrolnem in hlajenem vzorcu po 10 dneh hlajenja; C, D – Po 20 dneh hlajenja ni bilo opaziti nobenih razlik na anatomskem nivoju med kontrolnim (C) in hlajenim (D) vzorcem; F – floemske celice, KC – kambijeve celice, PR – ksilemske celice v postkambijski rasti, SL – ksilemske celice v fazi odlaganja sekundarne celične stene in lignifikacije; A, C, D: daljica = 50 μ m, B: daljica = 100 μ m

Figure 85: Response of the cambium to cooling experiment. A – Situation in phloem, cambium and xylem at the beginning of the experiment in mid-June; B – Situation in phloem, cambium and xylem in control and cooled sample after 10 days of cooling; C, D – After 20 days of cooling, no differences at anatomical level were observed between non-treated (C) and treated sample (D); F – phloem cells, KC – cambial cells, PR – xylem cells in postcambial growth, SL – xylem cells in phase of secondary cell wall formation and lignification; A, C, D: scale bars = 50 μ m, B: scale bars = 100 μ m

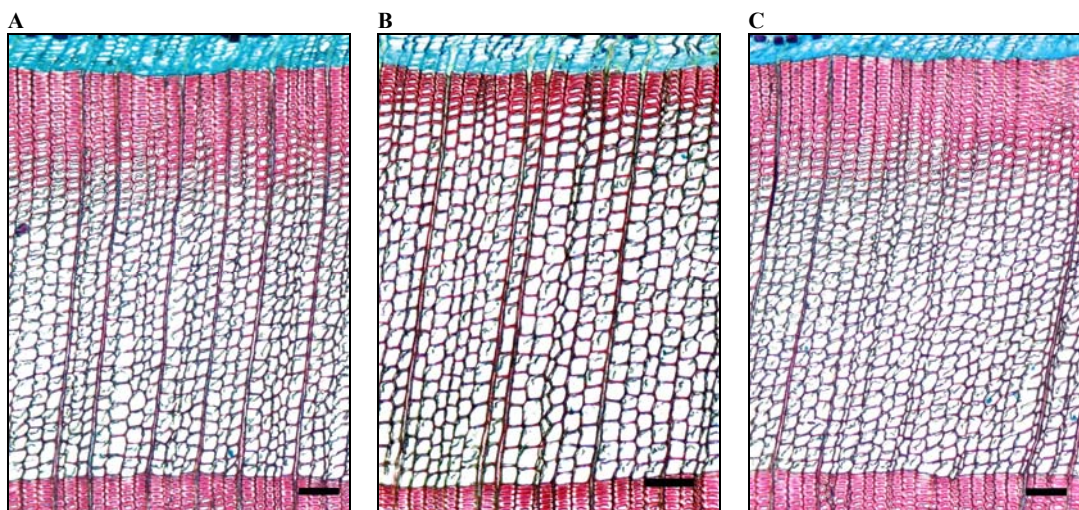


Slika 86: Odziv kambija na eksperimentalno ohlajanje po 30 dneh. A – Nastanek kasnega lesa pri hlajenem vzorcu; B – Rani oziroma prehodni les nastal pri kontrolnem drevesu; C – Kambij širok le 5 plasti celic pri hlajenem vzorcu; F – floemske celice, KC – kambijeve celice, PR – ksilemske celice v postkambijski rasti, SL – ksilemske celice v fazi odlaganja sekundarne celične stene in lignifikacije; B, C: - daljica = 50 μm , A: daljica = 100 μm

Figure 86: Response of the cambium to cooling experiment after 30 days. A – Formation of late wood in cooled sample; B – Early wood or transition wood formed in control tree; C – Cambium up to 5 layers of cells wide in cooled sample; F – phloem cells, KC – cambial cells, PR – xylem cells in postcambial growth, SL – xylem cells in phase of secondary cell wall formation and lignification; B, C: scale bars = 50 μm , A: scale bars = 100 μm

4.4.4 Anatomija ksilema in floema po zaključku rastne sezone

Za raziskavo vplivov obeh eksperimentov na strukturo in širino floemskih in ksilemskih prirastkov, smo vzorce iz ogrevanega in hlajenega dela debla ter kontrolnega drevesa odvzeli po koncu rastne sezone, 16.12.2004 (slika 87). Ogrevani in kontrolni vzorec sta pokazala primerljive širine ksilemskih branik (okoli 35 plasti celic) ter podoben delež kasnega lesa (okrog 40%) (slika 87A, C). Na anatomski ravni tudi v floemu nismo zasledili nobenih razlik med obema vzorcema, kakor tudi ne v širini floemskih branik 2004. Floemski prirastek pri obeh drevesih je sestavljalo 3 do 5 plasti sitastih celic ranega floema. Tangencialni pas aksialnega parenhima je razmejeval rani floem od kasnega sestavljenega iz 3 do 5 plasti sitastih celic. Opazovanje hlajenega in kontrolnega vzorca je pokazalo, da je na ksilemski strani pri ohlajanem vzorcu nekoliko zmanjšan delež kasnega lesa (okrog 20%) v primerjavi s kontrolnim vzorcem (okrog 40%), četudi sta bili širini ksilemskih branik primerljivi (35 plasti celic) (slika 87B). Na floemski strani nismo ob koncu vegetacije pri ohlajenem in kontrolnem vzorcu zasledili nobenih razlik v širini branike ali anatomski zgradbi. Floem je bil sestavljen iz 3 do 5 plasti sitastih celic ranega floema, sklenjenega tangencialnega pasu aksialnega parenhima in 3 do 5 plasti celic kasnega floema.

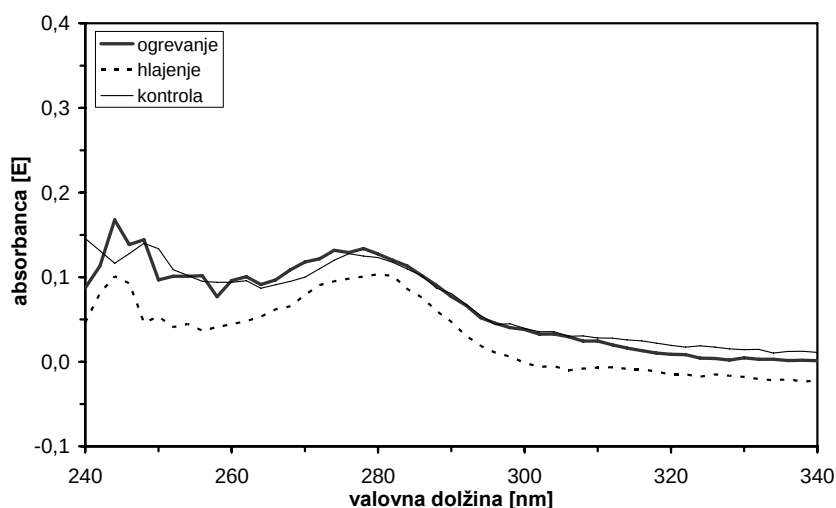


Slika 87: Prečni prerezi ksilemskih branik 2004 po zaključku rastne sezone. A – ogrevani vzorec; B – hlajeni vzorec z zmanjšanim deležem kasnega lesa; C – kontrolno drevo. Daljica = 100 μ m

Figure 87: Light micrographs of xylem growth rings 2004 at the end of the vegetation period. A – Heated sample; B – Cooled sample with reduced portion of latewood; C – Control sample. Scale bars = 100 μ m

4.4.5 UV spektrofotometrija in TEM

Za proučevanje morebitnih sprememb v strukturi lignina, ki bi lahko nastale zaradi nadzorovane povišane ali znižane temperature, smo uporabili UV-spektrofotometrijo (Fergus in sod., 1969, Fukuzawa in Imagawa, 1981, Fengel in Wegener, 1989, Takabe in sod., 1992, Koch in Kleist, 2001, Grünwald in sod., 2002a, b, Koch in Grünwald, 2004). Z UV mikroskopskim točkovnim merjenjem z velikostjo točke $1\ \mu\text{m}^2$ smo merili absorpcijo lignina v območju sekundarne celične stene. Tretirani in netretirani vzorci so pokazali tipične UV-spektre lignina iglavcev z razločnim maksimumom pri 280 nm valovne dolžine ter lokalnim minimumom pri 260 nm valovne dolžine (slika 88). Meritve UV absorpcije v zunanjih področjih sekundarne celične stene so pokazale, da se proces lignifikacije v tem delu celične stene še ni zaključil, saj je bila absorpcijska vrednost pri 280 nm pod 0,2 (slika 88). Za popolnoma diferencirane traheide znaša absorpcijski maksimum $\log \text{abs}_{280\text{nm}}$ v notranjem področju sekundarne celične stene pri smreki več kot 0,4 (Koch in Kleist, 2001).

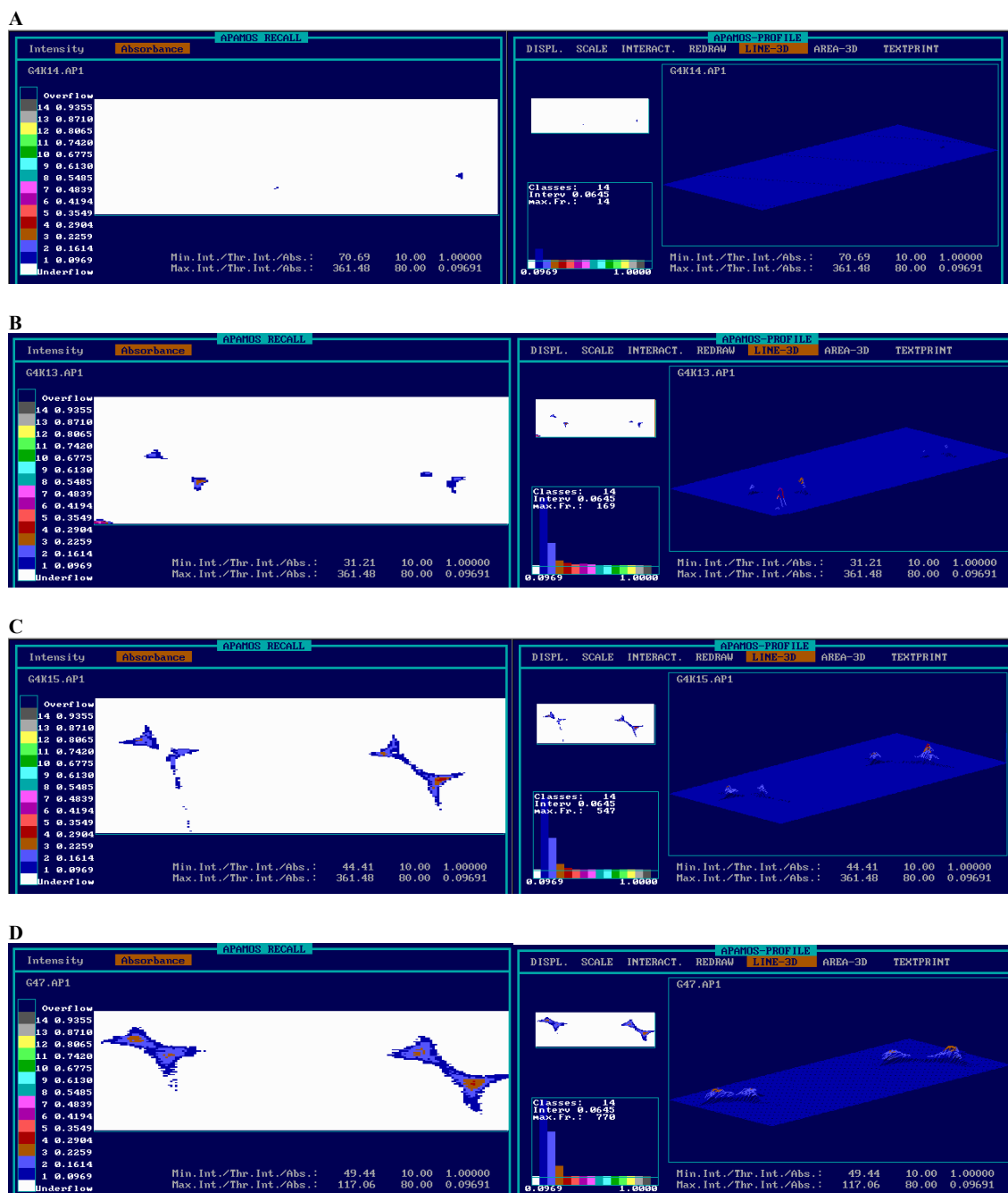


Slika 88: UV-absorpcijski spektri, izmerjeni v notranjih področjih sekundarne celične stene pri ogrevanem, hlajenem in kontrolnem vzorcu smreke kažejo tipični absorpcijski maksimum pri 280 nm valovne dolžine. Nizke absorpcijske vrednosti nakazujejo nezaključen proces lignifikacije.

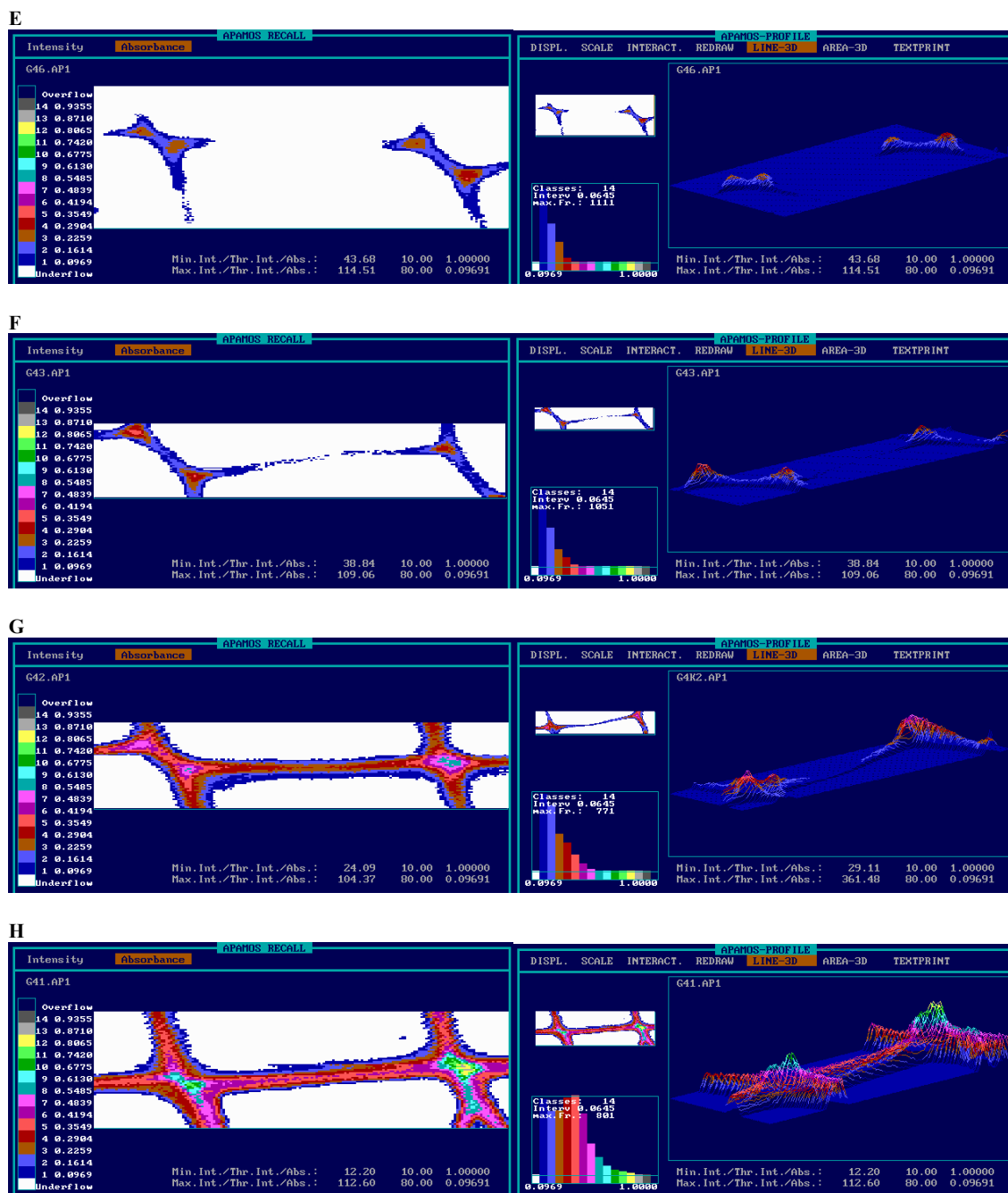
Figure 88: UV- spectra measured in secondary cell wall regions of tracheids in heat-treated, cool-treated and control samples showed a typical absorption maximum at 280 nm. Lower values than typically measured indicated incomplete development of the xylem cells. *Valovna dolžina* = wavelength, *absorbanca* = absorbance

UV-spektrofotometrično skeniranje majhnih področjih celičnih sten diferencirajočih traheid z resolucijo $0,75\ \mu\text{m}^2$ ogrevanega, hlajenega in kontrolnega vzorca ni pokazalo nobenih sprememb v procesu lignifikacije. Absorpcijske vrednosti so pri 280 nm valovne dolžine z oddaljenostjo od kambija naraščale, kar potrjuje nižjo vsebnost lignina mlajših ksilemskih celic v procesu diferenciacije (slika 89). Lignifikacija se je pričela v celičnih vogalih in nato širila proti notranjem področjem sekundarne celične stene. Vsebnosti lignina so bile v celičnih vogalih in združeni srednji lameli višje kot v sekundarni celični steni, kar je značilno za traheide. Višje UV absorpcijske vrednosti lignina v posameznih področjih celične stene so prikazane s pomočjo barvne lestvice 14 osnovnih barv. Na

osnovi opazovanj vzorcev ksilemskih tkiv z UMSP smo zaključili, da ni nobenih razlik v načinu odlaganja lignina ter njegovi strukturi med ogrevanim, hlajenim in kontrolnim vzorcem (slika 89).



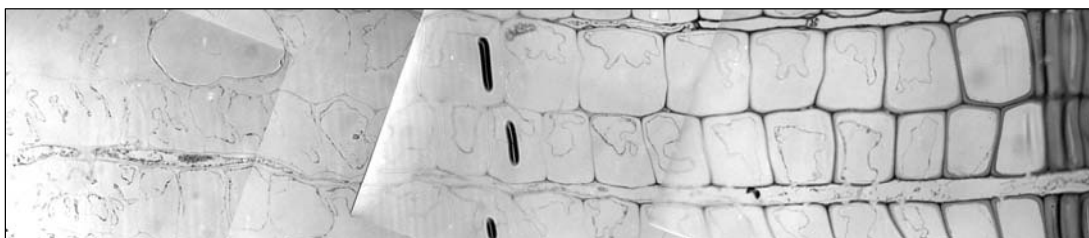
Nadaljevanje na strani 131



Slika 89: 3D profili celičnih sten diferencirajočih traheid ranega lesa ogrevanega vzorca skeniranega z geometrično resolucijo $0,25 \mu\text{m}^2$. Barvna lestvica izraža različne UV absorpcijske vrednosti pri 280 nm valovne dolžine. A – 4-5 tangencialna celična stena traheid od kambija, B – 5-6, C – 6-7, D – 7-8, E – 8-9, F – 9-10, G – 10-11 in H – 11-12 celična stena traheid od kambija.

Figure 89. UV micrographs and 3D profiles of cell walls of early wood tracheids in heat-treated Norway spruce scanned with a geometrical resolution of $0.25 \mu\text{m}^2$. The scales exhibit different UV—absorbance values at a wavelength of 280 nm. A – 4-5 th tangential cell wall of tracheids from the cambium, B – 5-6, C – 6-7, D – 7-8, E – 8-9, F – 9-10, G – 10-11 in H – 11-12th cell wall of tracheids from the cambium.

Posnete UV fotografije poltankih rezin v monokromatski svetlobi z UMSP mikroskopom, kažejo na postopno odlaganje lignina v celične stene traheid (slika 90). Lignifikacija celičnih sten sledi sintezi zunanjih delov sekundarne celične stene. Na sliki 90 se lepo vidi, da se prične v celičnih vogalih in srednji lameli in se nato postopoma širi proti notranjim področjem sekundarne celične stene. V lumnih so dobro vidni ostanki citoplazme.

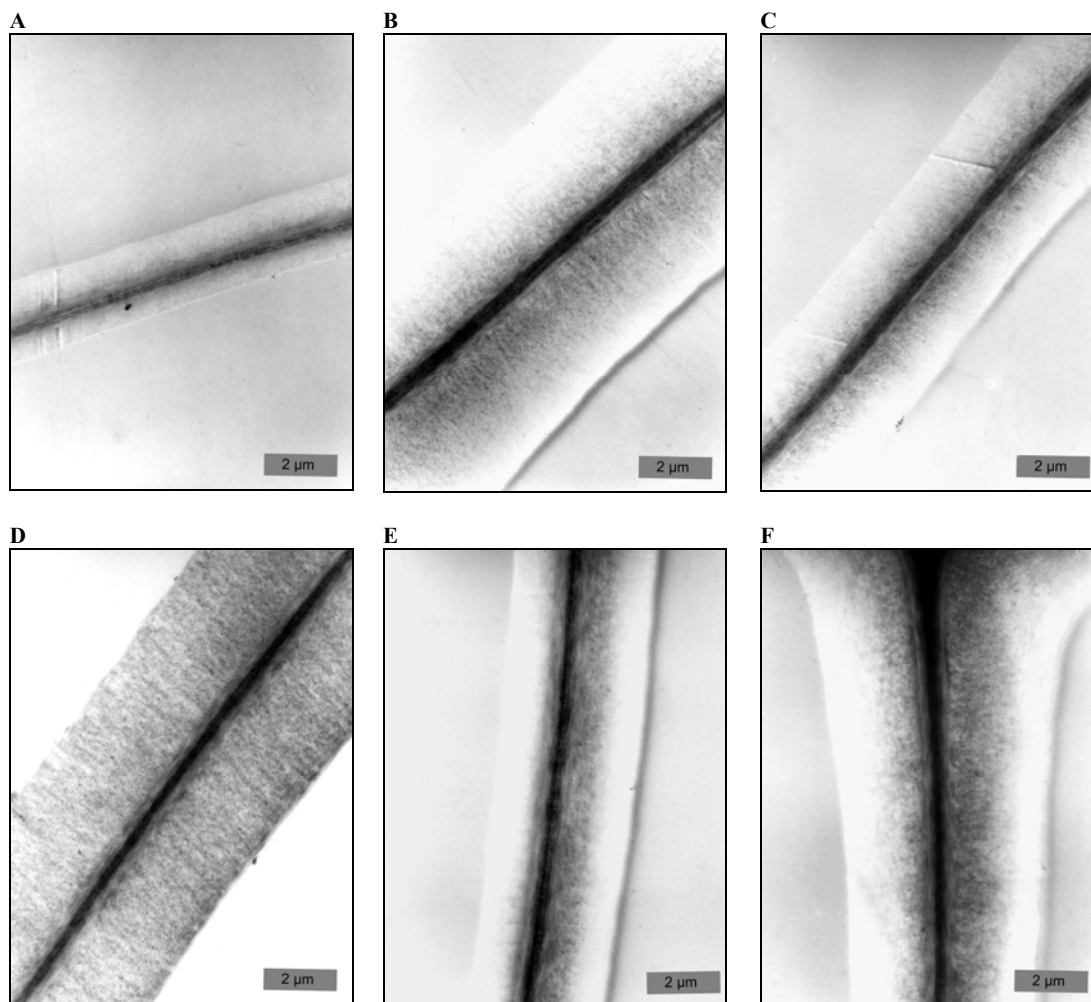


Slika 90: UV posnetek ksilemskega tkiva ogrevanega vzorca. Vsebnost lignina v celičnih stenah traheid z oddaljenostjo od kambija narašča.

Figure 90: UV image of xylem tissue of heated sample. Lignin content increases with increasing distance from the cambium.

Raziskave s TEM so pri ogrevanem vzorcu pokazale, da so bile po 30 dneh izvajanja poskusa (3.5.2004) številne ksilemske celice v procesu diferenciacije (slika 91). Redna kambijeva aktivnost se je tedaj pri kontrolnem drevesu že pričela, vendar so bile prve nastale ksilemske celice v fazi postkambijske rasti. Podobno so bile pri ogrevanem vzorcu mlajše traheide ob kambiju v postkambijski rasti in so imele tanke primarne celične stene. Nekoliko vstran od kambija se je v ksilemskih celicah pričela sinteza sekundarne celične stene. Z naraščajočo oddaljenostjo od kambija je naraščala tudi debelina sekundarne celične stene (slika 91A, B). Kontrastiranje preparatov s kalijevim permanganatom je potrdilo, da proces lignifikacije celičnih sten vedno sledi odlaganju polisaharidov in se prične v celičnih vogalih in združeni srednji lameli. V naslednji fazi se razširi na zunanja področja sekundarne celične stene in nazadnje tudi v notranja. Na sliki 91A sta celični steni traheid ranega lesa s tankimi celičnimi stenami v bližini kambija pri ogrevanem vzorcu, ki smo ga odvzeli 3.5.2005. Združena srednja lamela, sloj S1 in zunanje področje sloja S2 sekundarne celične stene so bili lignificirani, medtem ko se v notranjih področjih sloja S2 lignin še ni pričel odlagati. Sloj S3 ni bil oblikovan. Na sliki 91B sta celični steni traheid ogrevanega vzorca, ki sta 8 in 9 celic oddaljeni od kambija. Celična stena je bila vidno debelejša kot na prejšnji sliki, a še vedno ni bila popolnoma formirana. Združena srednja lamela, sloj S1 in zunanje področje sloja S2 sekundarne celične stene so bili lignificirani. V notranjem področju sloja S2 se lignifikacija še ni začela. Sloj S3 ni bil oblikovan.

V procesu diferenciacije in v ultrastrukturi ksilemskih celic nismo zasledili nobenih razlik med kontrolnim in hlajenim vzorcem (slika 91C, D, E, F). Podobno kot pri ogrevanemu vzorcu je bilo mogoče od kambija navzven slediti vsem razvojnim fazam v celicah začevši s postkambijsko rastjo traheid ob kambiju, sintezo sekundarne celične stene pri nekoliko starejših traheidah, ki ji je sledil proces lignifikacije. Pri hlajenem vzorcu odvzetem po 30 dneh traheide 9 in 10 celic od kambija niso bile povsem oblikovane (slika 91C, D). Podobno tudi traheide 9 in 10 celic od kambija pri kontrolnem drevesu niso zaključile z razvojem (slika 91E). Sinteza in lignifikacija celotne sekundarne celične stene je bila končana 13 do 14 celic od kambija. Na sliki 91F je dobro vidna ultrastruktura večplastne celične stene. Navadna smreka bradavičastega sloja na notranji strani sloja S3 sekundarne celične stene nima. Kontrastnost sovпада z vsebnostjo lignina v posameznem sloju celične stene (Bland in sod., 1971, Parham, 1974, Kutscha in Schwarzmann, 1975, Donaldson, 1992, Schmitt in sod., 2003, Schmitt in Melcher, 2004). S kalijevim permanganatom se je najintenzivneje kontrastirala združena srednja lamela, najverjetneje zaradi večje vsebnosti lignina.



Slika 91: TEM posnetki tangencialnih celičnih sten traheid pri kontrolnih in ogrevanih oziroma hlajenih vzorcih. A – Ogrevani vzorec po 30 dneh, traheidi ranega lesa s tankimi celičnimi stenami v bližini kambija, združena srednja lamela, sloj S1 ter zunanje področje S2 so lignificirani, notranji sloj S2 je nelignificiran; B – Ogrevani vzorec po 30 dneh, pri 8 in 9 traheidi od kambija je debelina sekundarne celične stene narasla; C – Hlajeni vzorec po 30 dneh, 9 in 10 celična stena traheid od kambija je nepopolnoma oblikovana; D – Hlajen vzorec po 30 dneh, 13-14 sekundarna stena celic od kambija, ki so prve z dokončno oblikovano sekundarno celično steno; E – Kontrolni vzorec po 30 dneh, sekundarna stena traheid 6-7 celic od kambija ni popolnoma oblikovana; F – Kontrolni vzorec po 30 dneh, sekundarna celična stena traheid 9-10 celic od kambija je debeljša od mlajših, a še vedno ni v celoti oblikovana.

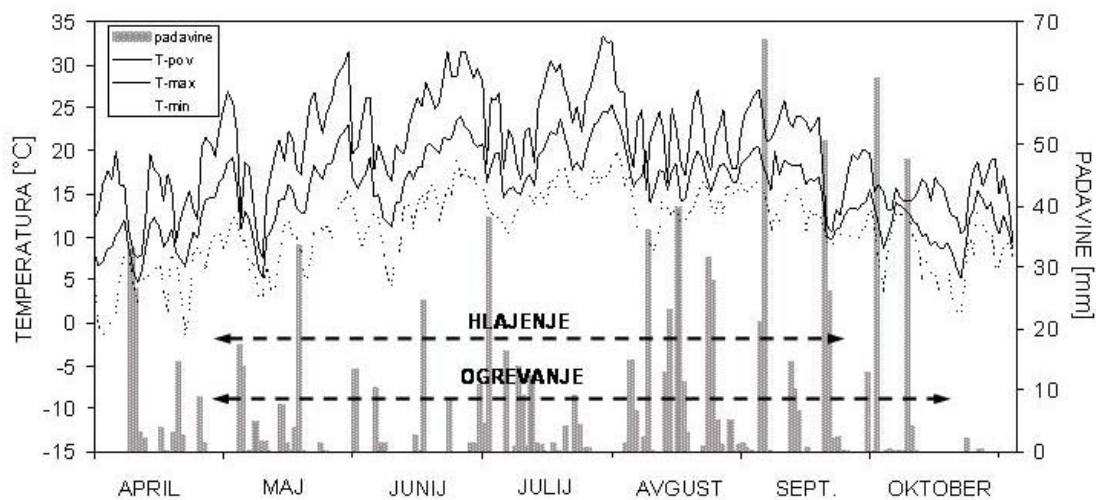
Figure 91: Electron micrographs of tangential tracheid cell walls of treated and non-treated samples. A – Heated sample after 30 days, earlywood cells close to the cambium with thin walls; middle lamella, S1 and outer S2 lignified, inner S2 without lignin; B – Heated sample after 30 days, eighth and ninth tracheid row from the cambium, width of secondary wall increased; C – Cooled sample after 30 days, ninth and tenth tracheid row incompletely lignified; D – Cooled sample after 30 days, thirteenth and fourteenth tracheid row with distinct lignification of the whole cell wall; E – Control tree of heating experiment after 30 days, sixth and seventh tracheid row incompletely developed; F – Control tree of heating experiment after 30 days, secondary cell wall of ninth and tenth tracheid row is thicker, but still incompletely lignified.

4.5 OGREVANJE IN HLAJENJE DELA DEBLA NAVADNE SMREKE V LETU 2005

V letu 2005 smo eksperimentalno nadzorovana poskusa ponovili. V nasprotju z enomesečnima poskusoma opravljenima v letu 2004, sta v letu 2005 oba poskusa potekala v času celotne rastne sezone.

4.5.1 Klimatske razmere med izvajanjem eksperimentov gretja in hlajenja

Povprečne, maksimalne in minimalne temperature zraka zabeležene v obdobju od 1. aprila do 31. oktobra 2005 v času izvajanja obeh eksperimentov so prikazane na sliki 92. Z obema poskusoma smo pričeli istočasno, 26.4.2005, tik pred pričetkom nastajanja ksilemske branike. Ob zastavitvi obeh poskusov so bile temperature zraka relativno visoke, z dnevnimi nad 25°C in nočnimi nad 5°C. V prvi polovici maja in junija smo zabeležili krajša, nekoliko hladnejša obdobja, kjer so se najvišje dnevne temperature spustile pod 20°C in minimalne pod 5°C. Poletje 2005 je bilo mokro in ne prevroče. Maksimalne temperature so le redko presegle 30°C v juniju in juliju. Avgust je bil deževen z maksimalnimi temperaturami redko nad 25°C. Ker je povprečna temperatura zraka konec septembra padla pod 15°C, smo s poskusom hlajenja končali 20.9.2005. Z ogrevanjem smo nadaljevali še tri tedne do 11.10.2005, ko smo tudi s tem eksperimentom zaključili. Povprečne temperature so se tedaj gibale okrog 10°C. Najbolj suh mesec v obdobju izvajanja obeh eksperimentov je bil oktober, s skupno količino padavin 56 mm. Nadpovprečna količina padavin je padla v septembru: 275 mm. Neobičajno moker mesec je bil tudi avgust z 230 mm.



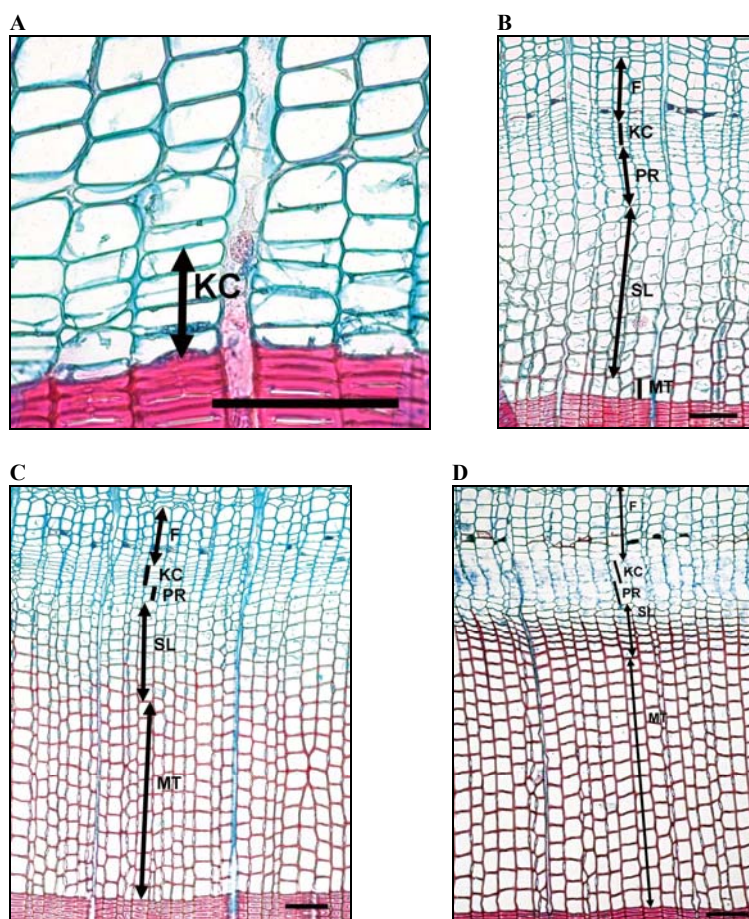
Slika 92: Povprečne, maksimalne in minimalne dnevne temperature zraka ter količina padavin v Ljubljani (323 m n.m.) v letu 2005 med izvajanjem eksperimentov hlajenje in ogrevanja. Obdobje izvajanja obeh eksperimentov je označeno s puščicama.

Figure 92: Average, maximum and minimum daily air temperatures and amount of precipitation in Ljubljana (323 m a.s.l.) in the year 2005 during heating and cooling experiments. Periods of the heating and cooling experiments are indicated by arrows. Datum = date, temperatura = temperature, padavine = precipitation, ogrevanje = heating, hlajenje = cooling

4.5.2 Poskus z ogrevanjem

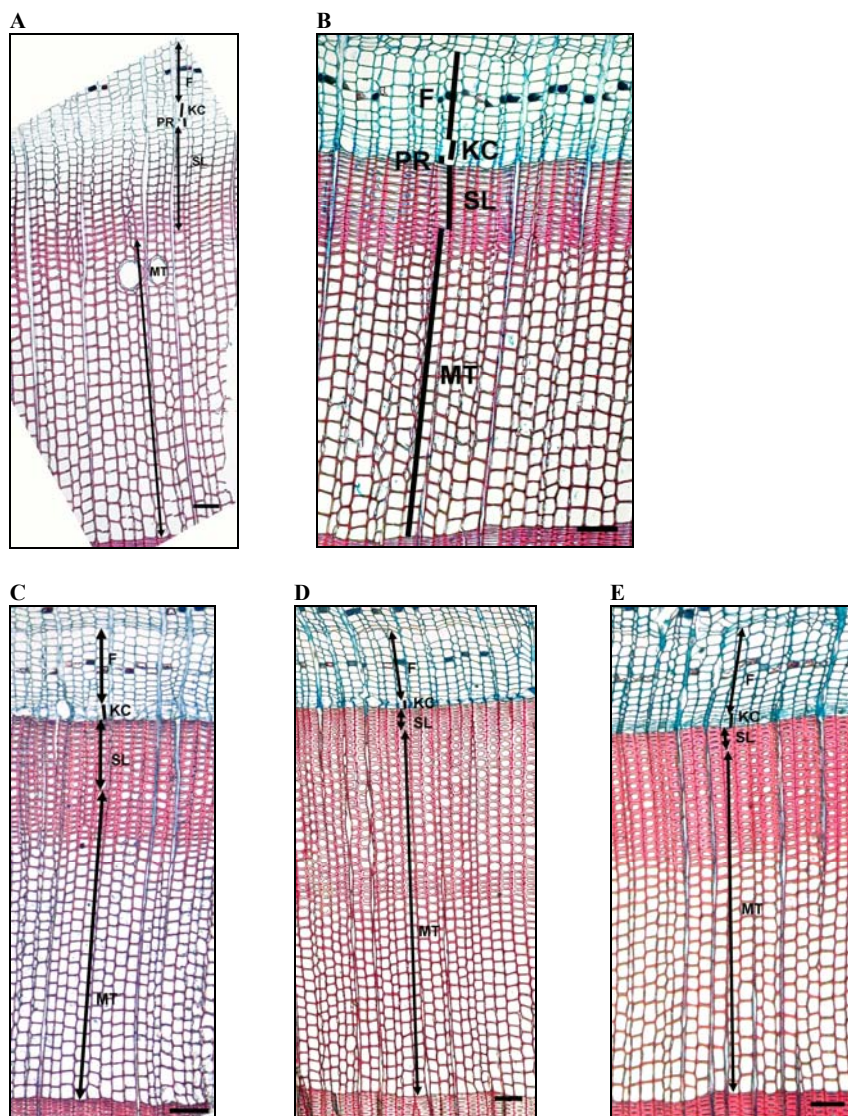
S poskusom ogrevanja dela debela navadne smreke smo pričeli 26.4.2005. Tedaj je bil kambij sestavljen iz 6 do 7 slojev celic (slika 93A). Delitve so se takrat že pričele. Ksilemskih celic v postkambijski rasti ni bilo zaslediti, medtem ko sta bila na floemski strani do 2 sloja celic v procesu diferenciacije. Pri naslednjem vzorčenju, 17.5.2005, je kambij sestavljalo do 8 slojev celic (slika 93B). V postkambijski rasti je bilo 5 do 6 slojev ksilemskih celic, v procesu odlaganja sekundarne celične stene pa 9 do 11 slojev celic. V posameznem radialnem nizu smo zasledili prvo zrelo traheido. Floemski prirastek so sestavljali 3 do 4 sloji sitastih celic ranega lesa in še ne v celoti sklenjeni tangencialni pas aksialnega parenhima, ki razmejuje rani in kasni floem. Pojavljale so se tudi prve celice kasnega floema. Šest tednov po začetku eksperimenta, 7.6.2005, je kambij štel do 7 slojev celic (slika 93C). Na ksilemski strani je bilo 5 do 6 slojev celic v postkambijski rasti, v fazi odlaganja sekundarne celične stene pa do 9 slojev traheid. Popolnoma oblikovanih je bilo do 13 slojev celic. Rani floem je bil sestavljen iz 3 do 4 slojev celic. Sklenjenemu tangencialnemu pasu aksialnega parenhima sta sledila 2, redkeje 3 sloji sitastih celic kasnega floema. Konec junija, 28.6.2005, je bil kambij še vedno širok do 6 slojev celic (slika 93D). Njegova aktivnost se še ni zaključila, saj smo zasledili v fazi postkambijske rasti do 3 sloje celic. V procesu odlaganja sekundarne celične stene in lignifikacije je bilo 7 do 8 slojev celic. Zrelih traheid je bilo 15 do 16 slojev. Na floemski strani je bilo 3 do 5 slojev oblikovanih sitastih celic ranega floema, sklenjen pas aksialnega parenhima ter do 3 sloji celic kasnega floema v fazi diferenciacije. V drugi polovici julija (19.7.2005) je bil kambij sestavljen iz 6 slojev celic (slika 94A). V fazi postkambijske rasti sta bila 2 sloja traheid, v fazi odlaganja sekundarne celične stene pa do 15 slojev. Do 21 slojev traheid je bilo popolnoma oblikovanih. Floemski prirastek je bil zgrajen iz 3 do 4 slojev oblikovanih celic ranega floema, sklenjenega tangencialnega pasu aksialnega parenhima ter 4 slojev celic kasnega floema, pri čemer zadnja celica še ni bila popolnoma formirana. V začetku avgusta (9.8.2005) je bil kambij še vedno širok 6 slojev celic (slika 94B). V fazi postkambijske rasti sta bila 1 do 2 sloja traheid, v fazi odlaganja sekundarne celične stene in lignifikacije pa do 11 slojev celic. Popolnoma oblikovanih je bilo do 25 slojev ksilemskih celic. Rani floem je bil sestavljen iz 3 do 4 slojev celic, katere je od 4 do 6 slojev celic kasnega floema ločil sklenjeni tangencialni pas aksialnega parenhima. Zadnja sitasta celica kasnega floema je bila še vedno v procesu diferenciacije. Konec avgusta, 30.8.2005, je bil kambij sestavljen iz 6 slojev celic (slika 94C). Najverjetneje se je njegova delitvena aktivnost nekoliko pred vzorčenjem zaključila, saj v fazi postkambijske rasti nismo zasledili nobene celice, medtem ko jih je bilo v fazi odlaganja sekundarne celične stene še vedno relativno veliko, do 11 slojev celic. Odraslih traheid je bilo okrog 30 slojev. Zgradba floemskega prirastka 2005 je bila podobna zgradbi prejšnjega vzorčenja: do 4 sloji celic ranega floema, sledil je tangencialni pas aksialnega parenhima in do 6 slojev celic kasnega floema, pri čemer zadnja nastala sitasta celica še vedno ni bila popolnoma oblikovana. V drugi polovici septembra (20.9.2005) je kambij sestavljalo do 6 slojev celic (slika 94D). Na ksilemski strani je bilo v procesu sinteze sekundarne celične stene in lignifikacije 5 do 6 slojev celic. Popolnoma oblikovanih je bilo do 38 slojev traheid. Floemska branika je bila sestavljena iz 3 do 4 slojev sitastih celic ranega floema, sklenjenega tangencialnega pasu aksialnega parenhima, ki mu je sledilo do 7 slojev popolnoma oblikovanih sitastih celic kasnega floema. Oktobra (11.10.2005) se proces diferenciacije terminalnih traheid kasnega lesa še ni zaključil. Zadnjih 6 slojev celic je še vedno vsebovalo protoplazmo v celičnih lumnih in notranja področja sekundarne stene so

bila modro obarvana (slika 94E). Takrat smo s procesom nadzorovanega ogrevanja tudi zaključili. V začetku novembra (4.11.2005) je bila tudi ksilemska branika popolnoma oblikovana. Širina ksilemske branike je štela v povprečju 35 slojev celic, od tega je bilo okoli 16 slojev celic kasnega lesa, kar predstavlja približno 45% celotne branike. Na slikah 94B, C, D in E je mogoče opaziti morfološke spremembe v celicah prehodnega in kasnega lesa. Dimenzije celičnih sten prehodnega lesa so bile ozke, kasneje pa so se nekoliko povečale in nato zopet zmanjšale.



Slika 93: Odziv kambija navadne smreke na nadzorovano ogrevanje na prečnih prerezi tkiv pod svetlobnim mikroskopom; A – Na dan začetka poskusa, 26.4.2005, so se delitve v kambiju že začele; B – Datum odvzema vzorca 17.5.2005. Prve nastale traheide ranega lesa so bile popolnoma oblikovane; C – Datum odvzema vzorca 7.6.2005. Nastajanje celic ranega lesa.; D – Datum odvzema vzorca 28.6.2005. Nastajanje celic prehodnega lesa. F – floemske celice, KC – kambijeve celice, PR – ksilemske celice v postkambijski rasti, SL – ksilemske celice v fazi odlaganja sekundarne celične stene in lignifikacije, MT – zrele traheide; Daljica = 100 μ m

Figure 93: The response of cambium in Norway spruce to experimental heating, as viewed on cross sections of tissues by light microscope. A – At the beginning of the experiment, 26 April 2005, divisions in the cambium have already started; B – Date of the sampling 17 May 2005. First formed early wood tracheids were fully developed; C – Date of the sampling 7 June 2005. Formation of early wood cells. D – Date of the sampling 28 June 2005. Formation of transition early-late wood cells. F – phloem cells, KC – cambial cells, PR – xylem cells in postcambial growth, SL – xylem cells undergoing secondary cell wall deposition and lignification, MT – mature tracheids; Scale bars = 100 μ m

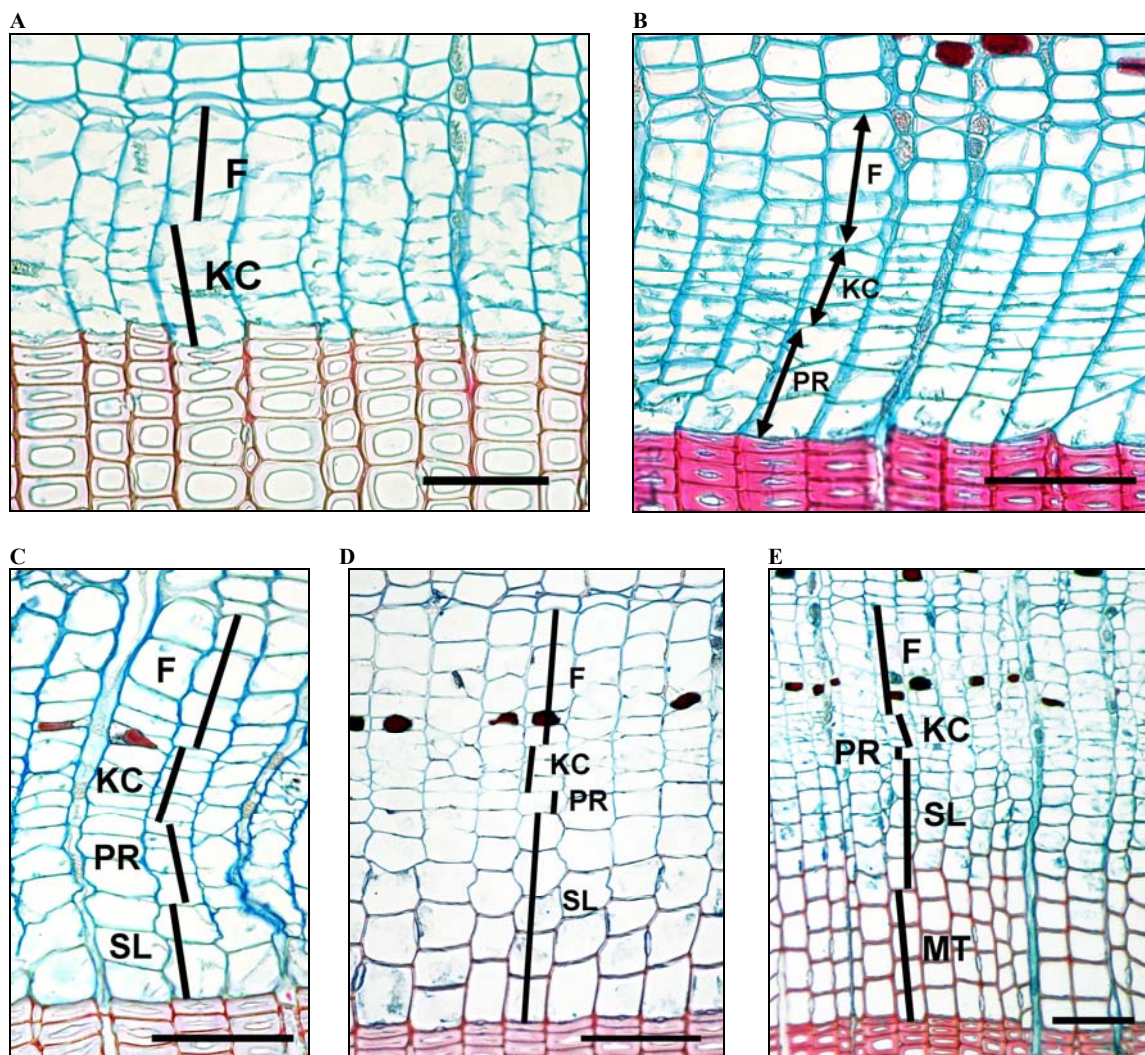


Slika 94: A – Datum odvzema vzorca 19.7.2005. Nastajanje celic prehodnega in kasnega lesa; B – Datum odvzema vzorca 9.8.2005. Kambijeva aktivnost se počasi zaključuje, nastajajo celice kasnega lesa; C – Datum odvzema vzorca 30.8.2005. Delitve v kambiju so se ustavile. Terminalne traheide v procesu odlaganja sekundarne celične stene in lignifikacije; D – Datum odvzema vzorca 20.9.2005. Terminalne traheide še niso popolnoma oblikovane; E – Datum odvzema vzorca 11.10.2005. Razvoj ksilemske branike 2005 je zaključen. F – floemske celice, KC – kambijeve celice, PR – ksilemske celice v postkambijski rasti, SL – ksilemske celice v fazi odlaganja sekundarne celične stene in lignifikacije, MT – zrele traheide; Daljica = 100 μm

Figure 94: A – Date of the sampling 19 July 2005. Formation of transition early-late wood and late wood cells; B – Date of the sampling 9 August 2005. Cambial activity is stopping, late wood cells are formed; C – Date of the sampling 30 August 2005. Divisions in the cambium ended. Terminal late wood tracheids are in process of secondary wall deposition and lignification; D – Date of the sampling 20 September 2005. Terminal tracheids have not been fully developed; E – Date of sampling 11 October 2005. Development of xylem growth ring 2005 is completed. F – phloem cells, KC – cambial cells, PR – xylem cells in postcambial growth, SL – xylem cells undergoing secondary cell wall deposition and lignification, MT – mature tracheids; Scale bars = 100 μm

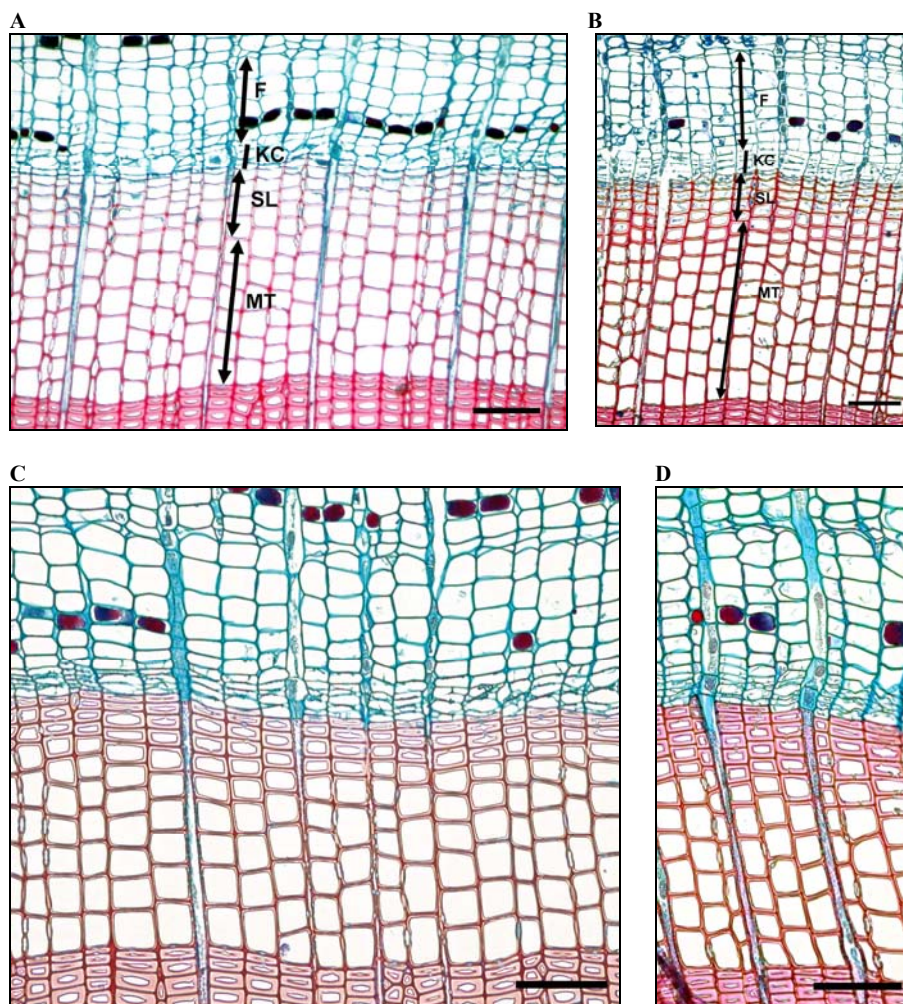
4.5.3 Poskus z ohlajanjem

S poskusom ohlajanja dela debela smreke smo tako kot z ogrevanjem pričeli 26.4.2005 (slika 95A). Delitve v kambiju so se takrat že pričele, saj je bil širok do 7 celic. Na ksilemski strani celic v postkambijski rasti nismo opazili, medtem ko so na floemski strani nastali 2 do 3 sloji sitastih celic ranega floema. Tri tedne kasneje, 17.5.2005, je kambij sestavljalo do 8 slojev celic (slika 95B). Ksilemska branika tekočega leta je že pričela nastajati. V postkambijski rasti je bilo 4 do 5 slojev traheid. Floemski prirastek je bil sestavljen iz 3 do 4 slojev sitastih celic ranega floema. Dobro viden je bil tangencialni pas aksialnega parenhima, vendar še ni bil popolnoma sklenjen. V začetku junija (7.6.2005) se je kambij zožal na 6 celic (slika 95C). Na ksilemski strani smo prvič zasledili 2 do 3 sloja traheid v procesu sinteze sekundarne celične stene in lignifikacije, medtem ko je bilo v postkambijski rasti 4 do 5 slojev celic. Rani floem je bil sestavljen iz 3 do 4 slojev celic, sledil je tangencialni pas aksialnega parenhima. Pojavil se je že prvi sloj celic kasnega floema z ozkimi radialnimi dimenzijami in debelejšimi celičnimi stenami. Konec junija, 28.6.2005, je bil kambij širok do 6 slojev celic (slika 95D). Število celic v postkambijski rasti se je zmanjšalo na največ 2. V procesu odlaganja sekundarne celične stene in lignifikacije je bilo 5 do 6 slojev celic. Popolnoma oblikovanih traheid takrat še vedno nismo zasledili. Floemski prirastek je bil sestavljen iz 3 do 4 slojev sitastih celic ranega floema, kjer sta bila zadnja 2 sloja še vedno v procesu diferenciacije. Tangencialni pas aksialnega parenhima ni bil popolnoma sklenjen, v kasnem floemu smo opazili 1 sloj celic. Dva meseca in pol po začetku izvajanja eksperimenta (19.7.2005) je bil kambij sestavljen iz 6 slojev celic (slika 95E). Na ksilemski strani smo prvič zasledili zrele traheide, in sicer 3 do 4 sloje. Do 5 slojev celic je bilo v fazi odlaganja sekundarne celične stene in lignifikacije. V postkambijski rasti je bil največkrat le 1 sloj celic. Rani floem je bil zgrajen iz 3 do 4 slojev oblikovanih sitastih celic, tangencialnega pasu aksialnega parenhima ter 2 slojev celic kasnega floema. Število celic v kambiju je bilo ob naslednjem vzorčenju (9.8.2005) podobno prejšnjim, 5 do 6 slojev (slika 96A). Primerjava prečnih prereзов kambijevega tkiva s prejšnjim vzorcem je pokazala, da se je njegova aktivnost zaključila v drugi polovici julija. Neposredno pod kambijem nismo zasledili novo nastalih ksilemskih celic v postkambijski rasti. V fazi odlaganja sekundarne celične stene in lignifikacije je bilo 4 do 5 slojev celic, pod njimi pa 5 do 7 slojev odraslih ksilemskih celic. Floemska branika tekočega leta je bila popolnoma oblikovana. Celicam ranega floema (3 do 4 sloji) je sledil tangencialni pas aksialnega parenhima in temu 2 do 3 sloji sitastih celic kasnega floema. Konec avgusta, 30.8.2005, je dormanten kambij sestavljalo 5 do 6 slojev celic (slika 96B). V ksilemu se je število zrelih traheid povečalo na 8 do 9 slojev, medtem ko so bili do 4 sloji terminalnih traheid kasnega lesa še vedno v zaključnih fazah diferenciacije. Ker so konec septembra, 20.9.2005, povprečne temperature zraka padle pod 15°C, smo se odločili zaključiti z eksperimentom nadzorovanega hlajenja. Kambij je tedaj štel 5 ali 6 slojev celic (slika 96C). Ksilemska branika je bila popolnoma oblikovana, sestavljena iz 9 do 11 slojev celic. Floemski prirastek je bil sestavljen iz 3 do 4 slojev celic ranega floema, nesklenjenega tangencialnega pasu aksialnega parenhima in 2 do 3 slojev celic kasnega floema. Stanje v sredini oktobra (11.10.2005) je bilo podobno (slika 96D). V ozkih ksilemskih branikah je bilo 4 do 5 slojev celic kasnega lesa, t.j. približno 40% celotne branike.



Slika 95: Odziv kambija navadne smreke na nadzorovano hlajenje viden na prečnih prerezihi tkiv pod svetlobnim mikroskopom; A – Na dan začetka poskusa, 26.4.2005, so se delitve v kambiju že začele; B – Datum odvzema vzorca 17.5.2005. V postkambijski rasti 4 do 5 slojev ksilemskih celic; C – Datum odvzema vzorca 7.6.2005. Ksilemske celice v procesu sinteze sekundarne stene; D – Datum odvzema vzorca 28.6.2005. Delitve v kambiju so se upočasnile. Zrelih traheid še ni bilo zaslediti; E – Datum odvzema vzorca 19.7.2005. Prve popolnoma oblikovane ksilemske celice; F – floemske celice, KC – kambijeve celice, PR – ksilemske celice v postkambijski rasti, SL – ksilemske celice v fazi odlaganja sekundarne celične stene in lignifikacije, MT – zrele traheide. Daljica = 100 μm

Figure 95: The response of cambium in Norway spruce to experimental cooling, as viewed on cross sections of tissues by light microscope. A – At the beginning of the experiment, 26 April 2005, divisions in the cambium have already started; B – Date of the sampling 17 May 2005. In the postcambial growth 4 to 5 layers of xylem cells; C – Date of the sampling 7 June 2005. Xylem cells in the process of secondary wall synthesis; D – Date of the sampling 28 June 2005. Divisions in the cambium have slowed down. No mature tracheids at that time; E – Date of sampling 19 July 2005. First fully developed xylem cells. F – phloem cells, KC – cambial cells, PR – xylem cells in postcambial growth, SL – xylem cells undergoing secondary cell wall deposition and lignification, MT – mature tracheids. Scale bars = 100 μm.



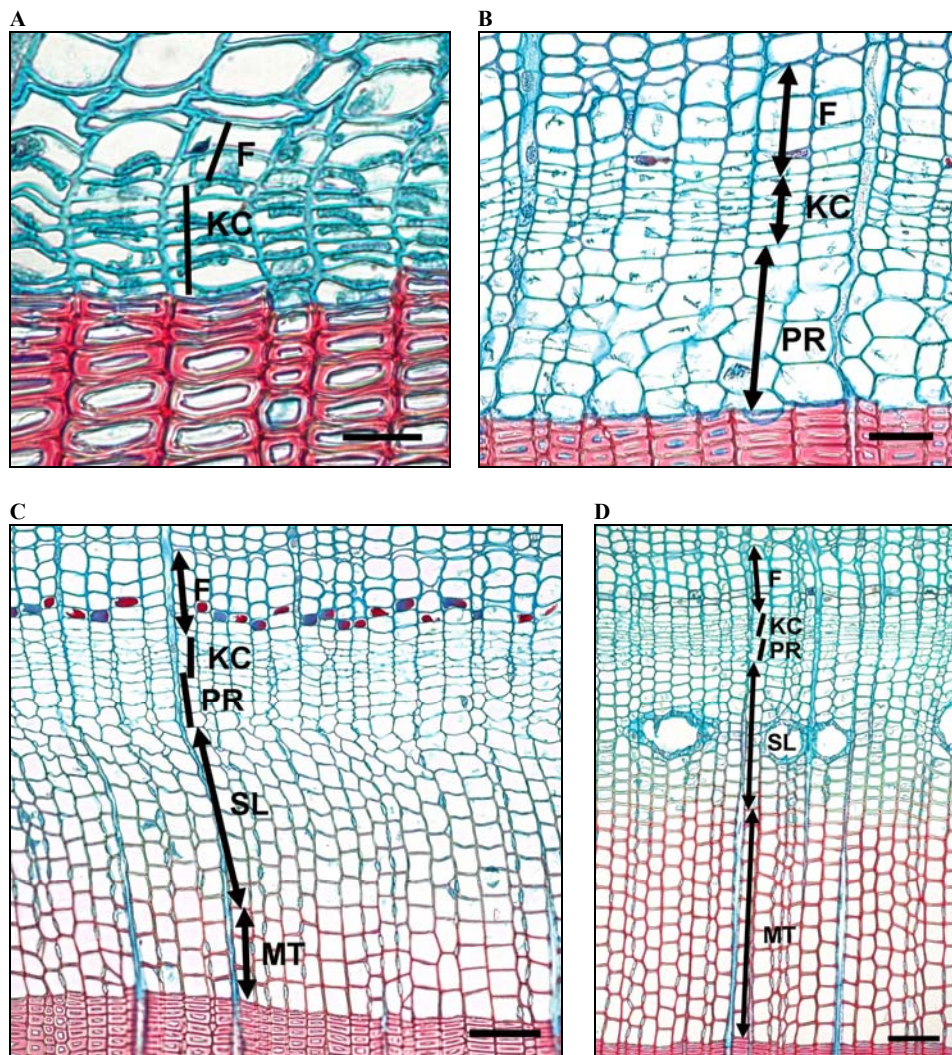
Slika 96: A – Datum odvzema vzorca 9.8.2005. Kambijeva aktivnost se je zaključila; B – Datum odvzema vzorca 30.8.2005. Terminalne traheide v zaključnih fazah diferenciacije; C, D – Datum odvzema vzorca 20.9.2005 oziroma 11.10.2005. Popolnoma oblikovana ozka ksilemska branika 2005. F – floemske celice, KC – kambijeve celice, PR – ksilemske celice v postkambijski rasti, SL – ksilemske celice v fazi odlaganja sekundarne celične stene in lignifikacije; MT – zrele traheide. Daljica = 100 μ m

Figure 96: A – Date of sampling 9 August 2005. Cambial activity has stopped; B – Date of the sampling 30.8.2005. Terminal tracheids in the final stages of differentiation; C, D – Date of the sampling 20 September 2005 and 11 October 2005, respectively. Fully developed narrow xylem growth ring 2005. F – phloem cells, KC – cambial cells, PR – xylem cells in postcambial growth, SL – xylem cells undergoing secondary cell wall deposition and lignification; MT – mature tracheids. Scale bars = 100 μ m

4.5.4 Kontrolni poskus

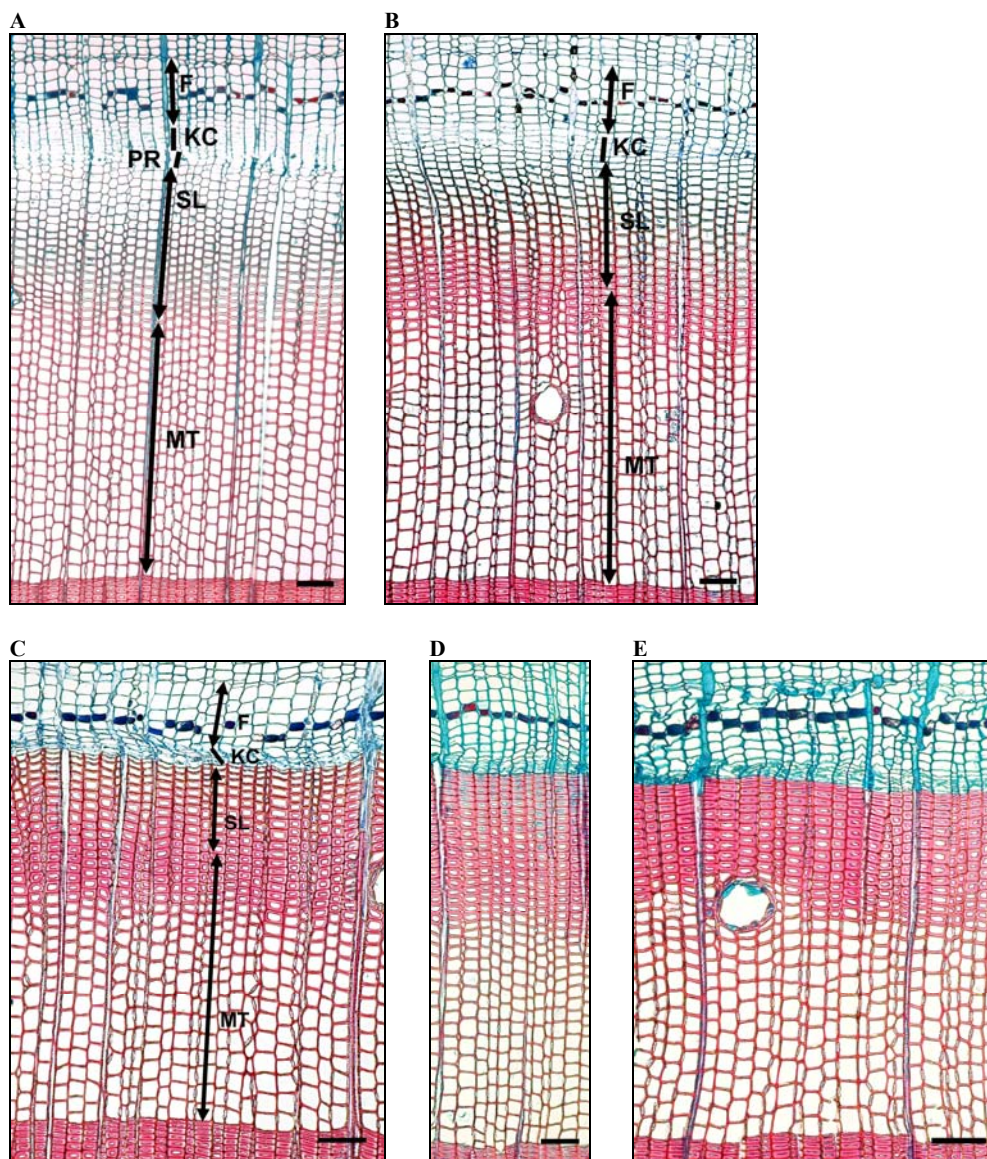
Pri poskusu nadzorovanega ogrevanja in ohlajanja dela debla navadne smreke smo vzorce iz eksperimentalnih dreves odvzeli vsake tri tedne (21 dni). Istočasno smo odvzeli vzorec iz kontrolnega drevesa, s čimer smo pridobili informacijo o redni kambijevi aktivnosti in celični diferenciaciji dreves na tem rastišču. Na vzorcu odvzetemu na dan začetka poskusov (26.4.2005) smo pri kontrolnem vzorcu zasledili podobno situacijo kot pri ostalih dveh. Kambij je bil sestavljen iz 7 do 8 slojev celic, kar je kazalo na to, da so se delitve že pričele, vendar novo nastalih ksilemskih celic branike 2005 tedaj še nismo zasledili (slika 97A). Na floemski strani sta bila 2 sloja sitastih celic ranega floema v fazi postkambijske rasti že vidni. Pri naslednjem vzorčenju, 17.5.2005 je bilo kambijevih celic v povprečju 7 slojev, pod njim se je oblikovalo do 6 slojev celic ranega lesa v fazi postkambijske rasti (slika 95B). Rani floem je bil sestavljen iz 3 do 4 slojev celic. Pojavljati so se začele parenhimske celice, vendar tangencialni pas tedaj ni bil sklenjen. Diferenciacija celic ranega floema se še ni zaključila. V začetku junija (7.6.2005) je število celic v kambiju ostalo nespremenjeno, 7 slojev (slika 97C). Zasledili smo zrele traheide ranega lesa (do 4 sloji). Celic v procesu debelitve celične stene in odlaganja lignina je bilo od 9 do 10 slojev, rastočih celic v postkambijski rasti pa okoli 4 sloji. Rani floem (3 do 4 sloji celic) je bil popolnoma oblikovan, sklenjenemu tangencialnemu pasu aksialnega parenhima sta sledila do 2 sloja celic kasnega floema. Pri četrtem vzorčenju (28.6.2005) je bil kambij še vredno sestavljen iz 7 slojev celic (slika 97D). Število odraslih traheid je naraslo na 10 do 14 slojev celic. V procesu odlaganja sekundarne celične stene in lignifikacije je bilo okoli 11 slojev celic. Pod kambijem so bili do 3 sloji rastočih celice, obdanih le s primarno steno. V sredini julija, 19.7.2005, so kambiju, ki je štel 7 slojev celic, v centripetalni smeri sledili 2 do 3 sloji ksilemskih celic v fazi postkambijske rasti (slika 98A). Število celic v procesu sinteze sekundarne celične stene in lignifikacije je naraslo na 17 slojev, odraslih traheid je bilo 17 do 19 slojev. Rani floem (3 do 4 sloji) je tangencialni pas aksialnega parenhima ločil od 3 do 4 slojev celic kasnega floema. Zadnje nastale floemske celice še niso bile popolnoma oblikovane. Tri tedne kasneje, 9.8.2005, je bila kambijeva aktivnost že zaključena. Kambij se je nekoliko zožal na 5 do 6 slojev celic, medtem ko celic v fazi postkambijske rasti nismo zasledili (slika 98B). Cona odlaganja sekundarne celične stene in lignifikacije je bila še vedno široka (16 do 18 slojev celic), odraslih traheid smo našli 19 do 21 slojev. Sestava floemske branike se od prejšnjega vzorčenja ni spremenila: 3 do 4 sloji celic ranega floema, tangencialni pas aksialnega parenhima, in nato 4 redkeje 5 slojev celic kasnega floema. Zadnja sitasta celica še ni bila popolnoma oblikovana. Konec avgusta, 30.8.2005, je dormanten kambij štel 5 do 6 slojev celic (slika 98C). Ksilemska branika še ni bila popolnoma oblikovana. Število celic v procesu odlaganja sekundarne celične stene in lignifikacije se je zmanjšalo na 10 do 12 slojev, zrelih traheid je bilo do 21 slojev. Na floemski strani smo opazili 4 sloje celic ranega floema, pas aksialnega parenhima in 4 do 5 slojev celic kasnega floema, kjer zadnja celica še vedno ni bila popolnoma oblikovana. Septembra (20.9.2005) je bil kambij sestavljen iz približno 6 slojev celic (slika 98D). Na ksilemski strani je bilo do 8 slojev najmlajših traheid kasnega lesa še vedno v procesu odlaganja sekundarne stene in lignifikacije. Okoli 28 slojev traheid je bilo popolnoma oblikovanih. Floemski prirastek je bil zgrajen iz 3 do 4 slojev sitastih celic ranega lesa. Sledil je sklenjen pas aksialnega parenhima in za njim do 5 slojev odraslih sitastih celic kasnega floema. Tri tedne kasneje, 11.10.2005, sta bili zadnja 2 sloja terminalnih traheid v zaključnih fazah diferenciacije, preostalih 27 slojev celic je bilo zrelih (slika 98E). Tri tedne kasneje, 4.11.2005, je bila tekoča ksilemska branika v celoti

oblikovana. Širina ksilemske branike je štela v povprečju 29 slojev celic, od tega je bilo okoli 13 slojev celic kasnega lesa, t.j. približno 45% celotne branike.



Slika 97: Nastanek ksilemske branike 2005 pri kontrolnem drevesu; A – Na dan začetka poskusa, 26.4.2005, so se delitve v kambiju že začele; B – Datum odvzema vzorca 17.5.2005. Traheide ranega lesa v postkambijski rasti; C – Datum odvzema vzorca 7.6.2005. Prve popolnoma oblikovane ksilemske celice; D – Datum odvzema vzorca 28.6.2005. Delitve v kambiju so se upočasile. F – floemske celice, KC – kambijeve celice, PR – ksilemske celice v postkambijski rasti, SL – ksilemske celice v fazi odlaganja sekundarne celične stene in lignifikacije, MT – zrele traheide; Daljica = 100 µm

Figure 97: Formation of xylem growth ring 2005 in control tree; A – At the beginning of the experiment, 26 April 2005, divisions in the cambium have already started; B – Date of the sampling 17 May 2005. Tracheids of early wood in postcambial growth; C – Date of the sampling 7 June 2005. First fully developed xylem cells; D – Date of the sampling 28 June 2005. Divisions in the cambium slowed down. F – phloem cells, KC – cambial cells, PR – xylem cells in postcambial growth, SL – xylem cells undergoing secondary cell wall deposition and lignification, MT – mature tracheids; Scale bars = 100 µm



Slika 98: A – Datum odvzema vzorca 19.7.2005. Nastajanje celic prehodnega lesa; B – Datum odvzema vzorca 9.8.2005. Kambijeva aktivnost se je zaključila; C – Datum odvzema vzorca 30.8.2005. Delitve v kambiju so se ustavile. Terminalne traheide v procesu odlaganja sekundarne stene in lignifikacije; D – Datum odvzema vzorca 20.9.2005. Terminalne traheide še niso popolnoma oblikovane; E – Datum odvzema vzorca 11.10.2005. Razvoj ksilemske branike 2005 je zaključen. F – floemske celice, KC – kambijeve celice, PR – ksilemske celice v postkambijski rasti, SL – ksilemske celice v fazi odlaganja sekundarne celične stene in lignifikacije, MT – zrele traheide; Daljica = 100 µm

Figure 98: A – Date of the sampling 19 July 2005. Formation of transition early-late wood cells; B – Date of the sampling 9 August 2005. Cambial activity has ceased; C – Date of the sampling 30 August 2005. Divisions in the cambium ended. Terminal late wood tracheids are in process of secondary wall deposition and lignification; D – Date of the sampling 20 September 2005. Terminal tracheids have not been fully developed; E – Date of sampling 11 October 2005. Development of xylem growth ring 2005 is completed. F – phloem cells, KC – cambial cells, PR – xylem cells in postcambial growth, SL – xylem cells undergoing secondary cell wall deposition and lignification, MT – mature tracheids; Scale bars = 100 µm

4.5.5 Temperature v kambiju med ogrevanjem in ohlajanjem

Pri nadzorovanem poskusu ogrevanja in hlajenja dela debela navadne smreke smo v letu 2004 z odvzemanjem vzorcev 10 cm nad ogrevanim oziroma hlajenim delom debela ugotovili, da naš eksperiment ni vplival na kambijevo aktivnost in celično diferenciacijo izven izoliranega območja, saj je bila situacija vsakokrat primerljiva z vzorcem odvzetim iz kontrolnega drevesa. Zaključili smo, da se temperatura ni prenesla po deblu iz izoliranega območja. Na osnovi teh rezultatov smo se pri izvajanju poskusov v letu 2005 odločili, da bomo hkrati z vsakim odvzemom nekajkrat merili tudi temperaturo kambija v izoliranem delu debela ter 10 cm nad in pod njim. Izmerjene temperature so prikazane v spodnji preglednici 30. Temperature v kambiju v izoliranem delu pri ogrevanju oziroma hlajenju kažejo, da so nihale v skladu s temperaturo zraka, ne glede na to, da je bila temperatura v izoliranem delu vseskozi enaka. Od maja do julija je lepo viden trend počasnega naraščanja temperature v kambiju, v avgustu je zaradi daljšega obdobja nižjih temperatur tudi temperatura v kambiju nekoliko upadla in nato proti koncu avgusta zaradi dviga temperatur v okolici zopet nekoliko narasla. Temperature nad in pod ogrevanim oziroma hlajenim delom debela so se obnašale podobno. Nad ogrevanim delom debela so bile temperature v kambiju nekoliko višje kot pod ogrevanim delom, pri hlajenju pa je bilo ravno obratno (preglednica 30).

Preglednica 30: Temperature v kambiju v izoliranem delu debela ter nad in pod njim. Zabeležene so bile med nadzorovanim ogrevanjem in ohlajanjem.

Table 30: Temperatures in the cambium in isolated stem portion, and above and below it. They were recorded during heating and cooling experiments.

datum date	17.5.05	7.6.05	28.6.05	19.7.05	9.8.05	30.8.05
temperatura v kambiju [°C] temperature in cambium [°C]						
gretje heating	23,3	24,5	26,1	25,8	20,7	24,0
nad gretjem above heating	17,0	19,1	21,8	23,2	20,5	19,0
pod gretjem below heating	14,9	15,8	21,3	22,0	15,7	17,8
hlajenje cooling	11,7	11,6	12,0	14,4	12,1	12,5
nad hlajenjem above cooling	14,4	14,2	19,3	21,0	15,2	17,7
pod hlajenjem below cooling	15,0	15,3	20,2	21,9	15,8	17,8

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

5.1.1 Pining in vzorčenje intaktnih vzorcev

Metodi pining in odvzem intaktnih vzorcev sta primerni za raziskave sezonske dinamike nastanka ksilemske branike pri smreki in jelki. Pri metodi pining je vbod z iglo povzročil izsušitev ksilemskega tkiva, nekrozo kambija in nediferenciranih ksilemskih celic, nastanek kalusa, travmatskih smolnih kanalov in poranitvenega lesa. Meja med kambijevimi celicami ter celicami v postkambijski rasti, ki so se nahajale v kalusu, je določala ksilemski prirastek nastal do trenutka vboda. Proces preraščanja poškodbe so drugi avtorji razložili kot nastanek dediferenciranega kalusnega tkiva, znotraj katerega se sčasoma ponovno oblikuje vaskularno tkivo (Yoshimura in sod., 1981a, b, Kuroda in Shimaji, 1984a, b, Oven, 1997). Nov kambij se pojavi v nadaljevanju starega kambija (Oven, 1997). Polarni tok avskina je nujen za prostorsko organiziranje prevodnih tkiv in za vzdrževanje vaskularnega kambija. Ob poškodbi se tok avksina prekine, kar povzroči dezorganizirano rast kambija (Lachaud in sod., 1999, Savidge, 2000a, b, Sundberg in sod., 2000). Kambijeve celice, ki so izolirane od redne oskrbe z avksinom, se dediferencirajo v parenhimske celice (Savidge, 2000b). Celice poranitvenega lesa, ki so nastale nad kalusom, so bile deorientirane in nepravilnih oblik. Oven (1997) je zabeležil, da so bile prve nastale celice poranitvenega lesa traheoide, nato kratke, deorientirane traheide, v nadaljevanju pa postopoma normalne traheide, urejene v radialnih nizih. V nasprotju z opazovanji Kurode in Shimaji (1983) travmatski smolni kanali, ki so nastali kot posledica poškodbe z iglo, niso zanesljivo označevali ksilemske rasti tekom vegetacije pri navadni smreki (Demšar, 2004, Oven in sod., 2004, Zupan, 2005). Poleg tega se je kambij v trenutku vboda pri navadni smreki nahajal v kalusu in ne nad njim kot pri vrstah *Chamaecyparis obtusa* in *Cedrus deodara* (Kuroda in Kiyono, 1997). Letnice nad kalusom so bile valovite, saj se je v neposredni bližini poškodbe (vboda) celična produkcija povečala. Poškodba z iglo je lahko ponovno spodbudila kambijevo aktivnost ob koncu rastne sezone, o čemer so drugi avtorji že poročali (Kuroda in Kiyono, 1997, Oven, 1997). Reaktivacija kambija je bila zlasti očitna na nižinskem rastišču Sorško polje in je oteževala določanje zaključka redne kambijeve delitve. Neobičajna reaktivacija je bila po vsej verjetnosti posledica hormonalnega neravnovesja, ki ga je povzročila poškodba z iglo (Kuroda in Kiyono, 1997). Metoda odvzema intaktnih vzorcev je bila primernejša za proučevanje posameznih faz ksilogeneze, saj so bile celice bolj ohranjene. S to metodo smo lahko sledili spremembam v številu kambijevih celic tekom rastne sezone. Metoda je omogočala raziskave sezonske dinamike celične produkcije tudi na floemski strani. Zaradi relativno velikih vzorcev pa lahko večletno vzorčenje istega drevesa vpliva na njegovo dolgoročno rast in razvoj. Težave pri vzorčenju se lahko pojavljajo pri drevesih z debelejšo skorjo, kjer je potrebno odstraniti velik del ritidoma in je odzemanje vzorcev tkiv s kladivom in dletom oteženo (Dorado in sod., 2005).

5.1.2 Vpliv temperature in padavin na dinamiko nastanka ksilemske branike 2003 pri testnih jelkah na Ravniku in smrekah na Pokljuki ter Sorškem polju

Kambijeva aktivnost se je v letu 2003 najhitreje začela pri vzorčnih jelkah na Ravniku, in sicer konec aprila. Pri smrekah na Sorškem polju so se delitve v kambiju začele nekaj dni kasneje, najkasneje pa pri smrekah na Pokljuki, približno z 2 tedenskim zamikom. Na vseh 3 rastiščih se je kambijeva aktivnost pričela za tem, ko so nekajdnevne minimalne temperature presegle 5°C, povprečne temperature so se gibale okrog 10°C in maksimalne med 15° in 20°C. Kasnejši padec temperatur na stopnjo celične produkcije ni vplival. Ko so se delitve v kambiju začele, se je število celic podvojilo, kar je v skladu z opazovanji drugih avtorjev (Kutscha in sod., 1975, Larson, 1994, Deslauriers, 2003). Fink (1986) je pri navadni jelki v aktivnem kambiju zabeležil 5 do 10 slojev celic, medtem ko smo jih v našem primeru našli tudi do 16 slojev. Po delitvah v kambiju, ki so sovpadale s povečanim številom kambijskih celic, smo zabeležili prve ksilemske celice v fazi postkambijske rasti. Časovni zamiki med zaporednimi fazami ksilogeneze so pri smreki in jelki na vseh 3 rastiščih znašali približno 2 tedna. Na vseh 3 ploskvah je bilo ob prehodu ranega v kasni les oblikovane okoli 70% ksilemske branike. Trajanje debelinske rasti dreves se je na posameznih ploskvah razlikovalo. Delitve v kambiju so se najhitreje zaključile pri vzorčnih drevesih s Sorškega polja (konec julija), sledila so drevesa s Pokljuke (sredina avgusta) in nazadnje še z Ravnika (konec avgusta). Pri smrekah na Sorškem polju je rastna sezona v povprečju trajala 2 meseca in pol, pri smrekah na Pokljuki 2 meseca in pri jelkah na Ravniku 4 mesece in pol. Število celic v dormantnem kambiju je bilo pri smreki in jelki enako, med 7 in 9 slojev. Podobno situacijo so zasledili tudi Kutscha in sodelavci (1975) pri jelki *Abies balsamea*. Nasprotno pa je Fink (1986) zabeležil samo 1 do 3 sloje celic v dormantnem kambiju pri navadni jelki. Število celic v kambiju je poleg drevesne vrste in obdobja povezano tudi z vitalnostjo drevesa. Razen trajanja kambijeve aktivnosti vpliva na končno širino ksilemskih celic oziroma širino branike še stopnja celičnih delitev (Gregory in Wilson, 1968, Larson, 1994, Rossi in sod., 2006b). Za vse 3 ploskve smo izdelali modelne krivulje debelinske rasti dreves v letu 2003 z uporabo Gompertzove funkcije. Gompertzova funkcija je, podobno kot v prejšnjih raziskavah (Zeide, 1993, 2004, Deslauriers, 2003, Deslauriers in sod., 2003, Rossi in sod., 2003), tudi v naših ustrezno opisala debelinsko rast vzorčnih dreves. Na vseh 3 rastiščih je bilo ujemanje Gompertzove krivulje s povprečnimi dejanskimi podatki preko 95%. Večja odstopanja podatkov od izračunanega modela smo zasledili proti koncu vegetacije, ko je stopnja celičnih delitev v kambiju upadla. Variabilnost v številu celic po obodu individualnega drevesa, kot rezultat različne dinamike kambijeve aktivnosti, je bila takrat zelo izrazita. Kasnejši začetek celičnih delitev v kambiju in krajša rastna sezona nista povezana z manjšo dinamiko celične produkcije in s tem z nastankom ožjih branik ali obratno (Deslauriers in Morin, 2005), kar potrjujejo tudi naše raziskave. Pri testnih drevesih na Pokljuki smo zabeležili največjo dinamiko celičnih delitev, v povprečju 0,68 celic/dan, na Ravniku 0,51 celic/dan in najmanj na Sorškem polju; 0,35 celic/dan. Izračunana končna širina ksilemske branike 2003 je bila pri vzorcih z Ravnika okoli 70 celic, s Pokljuke 42 celic in s Sorškega polja 26 celic.

Na rast dreves poleg endogenih dejavnikov vplivajo tudi dejavniki okolja, ki določajo začetek, trajanje, dinamiko in zaključek posameznih faz ksilogeneze (Skene, 1971, Denne in Dodd, 1981, Schweingruber, 1990, Larson, 1994, Kozłowski in Pallardy, 1997, Wodzicki, 2001, Larcher, 2003). Drevesa naj bi izkazovala veliko plastičnost in

prilagodljivost na okolje, v katerem rastejo (Gregory in Wilson, 1968, Alpert in Simms, 2002, Rossi in sod., 2006b). Rossi in sodelavci (2006b) so za številne iglavce (*Abies balsamea*, *Larix decidua*, *Picea abies*, *Picea mariana*, *Pinus cembra*, *Pinus sylvestris*, *Pinus uncinata*) severne poloble, ki rastejo v hladnih območjih, izračunali obdobje maksimalne celične produkcije. To obdobje je bilo ne glede na drevesno vrsto ali rastišče le par dni pred poletnim solsticijem (21. junij), in sicer 164. Julijanski dan. Julijanski dan predstavlja število dni od 1. januarja istega leta. Takrat je dolžina fotoperiode najdaljša. Do podobnih zaključkov so prišli tudi Horacek in sodelavci (1999) za smreko *Picea abies* na Češkem. Avtorji (Rossi in sod., 2006b) so zaključili, da se drevesa uravnavajo po stanovitnejšem signalu fotoperiode in ne po temperaturah. Časovno usklajevanje maksimalne stopnje debelinske rasti s temperaturno kulminacijo, ki nastopi mesec dni kasneje, konec julija, bi za rastline predstavljalo preveliko tveganje, saj poteka diferenciacija zadnjih nastalih traheid v širokih ksilemskih branikah do pozne jeseni (Gričar in sod., 2005a, Rossi in sod., 2006b). Raziskave kažejo, da so drevesa zelo prilagodljiva glede začetka, trajanja, dinamike in zaključka kambijeve aktivnosti z ozirom na temperaturo zraka in tal ter dolžino fotoperiode v določenem letu in na določenem rastišču. Temperature lahko vplivajo na začetek, konec in dinamiko kambijeve aktivnosti, ne pa na obdobje maksimalne stopnje celične produkcije, ki naj bi bilo vedno okoli solsticija (Rossi in sod., 2006b). Mäkinen in sodelavci (2003) so zabeležili obdobje maksimalne celične produkcije kasneje, v sredini julija, kar pa je najverjetneje posledica neustreznih analiz mikroizvrtkov s stereo-mikroskopom (Rossi in sod., 2006b).

Za vzorčna drevesa z Ravnika smo s pomočjo parametrov Gompertzove funkcije ocenili maksimalno celično produkcijo v letu 2003 148. dan, za Sorško polje 136. dan in za Pokljuko 164. dan. Maksimalna dinamika debelinske rasti je bila pri poskusnih smrekah na Sorškem polju v letu 2003 dosežena več kot mesec dni prej kot na Pokljuki. V obdobju solsticija je pri smrekah na Sorškem polju v letu 2003 že nastajal kasni les in stopnja celične produkcije je upadla. Primerjava dinamike in trajanja nastanka ksilemske branike pri vzorčnih smrekah na Pokljuki in Sorškem polju v rastnih sezonah 2003 in 2002 je pokazala očitne razlike v debelinski rasti dreves na Sorškem polju v obeh letih. V letu 2002 je bila maksimalna celična produkcija na Sorškem polju 160. dan, na Pokljuki pa 173. dan. Na Pokljuki je bilo trajanje in dinamika nastanka ksilemske branike v letih 2002 in 2003 podobno. Rastna sezona je bila v letu 2002 približno en teden daljša v primerjavi z letom 2003. Primerljiva širina branik v obeh letih kaže, da je rastišče zelo ustrezno za rast smrek. Ravno nasprotno lahko zaključimo za Sorško polje. Smrekovi sestoji na Sorškem polju, na nanosih reke Save, so antropogenega nastanka in so izpostavljeni velikim sezonskim nihanjem talne vode. Drevesa so pogosto podvržena napadom lubadarjev in okužbam gliv rjave trohnobe. Širina ksilemskih branik med posameznimi leti zelo variira, predvsem kot rezultat različnega trajanja (zaključka) kambijeve aktivnosti. Kambijeva aktivnost vzorčnih dreves na Sorškem polju je bila v letu 2003 izrazito krajša (11 tednov) v primerjavi z letom 2002 (17 tednov). Spomladi so se v obeh letih delitve v kambiju začele v podobnem obdobju (konec aprila), vendar pa so se v letu 2002 zaključile približno mesec in pol kasneje. Rezultat različnega trajanja kambijeve aktivnosti v obeh letih so bile znatno širše branike v letu 2002 (63 celic) kot v letu 2003 (27 celic).

Vpliv temperature in padavin na nastanek ksilemske branike 2003 smo za vsa 3 rastišča izračunali s pomočjo linearne regresije. Ksilemsko braniko smo razdelili na obdobje

nastajanja ranega in kasnega lesa, saj se morfološko razlikujeta. Njun nastanek ni odvisen od klimatskih, temveč od endogenih dejavnikov (Sundberg in sod., 2000, Ugglja in sod., 2001). Nastanek ranega lesa je bil ne glede na rastišče vedno v pozitivni korelaciji s temperaturami. Na Ravniku korelacije niso bile statistično značilne, vendar pa so bile vrednosti korelacijskih koeficientov visoke. Na Sorškem polju smo dobili največje korelacijske vrednosti pri časovnem zamiku 7 dni, na Pokljuki pa pri časovnem zamiku 1 dan. Na podlagi enoletnega vzorčenja na posameznem rastišču in analiz s klimatskimi podatki je težko pojasniti te razlike. Vendarle pa smo s študijo dobili vpogled v problematiko dogajanja. V primeru, da bi pri večletnih analizah prišli do podobnih rezultatov, bi bilo potrebno poiskati fiziološke razlage za različen časovni vpliv temperatur na celično produkcijo na različnih rastiščih. Kljub temu pa rezultati kažejo, da so pomembne temperature skozi daljše časovno obdobje, t.j. več kot le en teden. Nasprotno sta Deslauriers in Morin (2005) pri jelki *Abies balsamea* ugotovila, da je časovni zamik zmanjšal korelacijske vrednosti med temperaturo in celično produkcijo. Zaključila sta, da se kambij zelo hitro odziva na temperaturne spremembe (Deslauriers in Morin, 2005). Kasnejši začetek delitev v kambiju pri smrekah na Pokljuki kot na preostalih 2 rastiščih je najverjetneje povezan z nižjimi temperaturami v začetku maja. Taljenje snega pozno pomladi in nizke temperature ozrača ter tal omejujejo začetek kambijeve aktivnosti na visokih ležečih rastiščih (Kirdyanov in sod., 2003). Stopnja in trajanje posameznih procesov ksilogeneze določajo morfologijo ksilemskih celic (Whitmore in Zahner, 1966, Skene, 1972, Wodzicki, 1972, Ford in sod., 1978, Sundberg in sod., 2000). Nastanek kasnega lesa naj bi bil rezultat upočasnjene stopnje celičnih delitev, krajšega trajanja in zmanjšane stopnje postkambijske rasti ter daljšega obdobja sinteze sekundarne celične stene (Whitmore in Zahner, 1966, Skene, 1972, Wodzicki, 1972, Ford in sod., 1978, Denne in Dodd, 1981). V nasprotju z ranim lesom pa je bil nastanek kasnega lesa vselej v negativni korelaciji s temperaturami, tudi na alpskem rastišču Pokljuka. Največje vrednosti korelacijskih koeficientov smo dobili na Pokljuki, najmanjše pa na Sorškem polju. Korelacijske vrednosti so bile negativne tudi med tedenskimi prirastki in odčitanimi tedenskimi minimalnimi ter povprečnimi minimalnimi tedenskimi temperaturami. Zdi se, da previsoke temperature ne vplivajo ugodno na celično produkcijo. Na Pokljuki so maksimalne temperature redko presegle 25°C, vendar le v obdobju nastajanja kasnega lesa. Ko se je kambijeve aktivnost zaključevala, so bile minimalne temperature okoli 10°C in so bile višje kot v prvem delu vegetacije. V splošnem se je v vseh 3 primerih s časovnim zamikom od 1 do 7 dni vrednost korelacije večala. Po Rossi in sodelavcih (2006b) naj bi bil maksimum celične produkcije vedno okoli solsticija, česar naše raziskave ne potrjujejo. Na Sorškem polju je bila maksimalna celična produkcija leta 2003 že v sredini maja, več kot mesec dni pred solsticijem. Vzrok za zamik je najverjetneje povezan z visokimi temperaturami in pomanjkanjem padavin ter posledično s pomanjkanjem vode v tleh pri povečani evapotranspiraciji. Rossi in sodelavci (2006b) so poudarili, da obdobje maksimalne celične produkcije ne more nastopiti v juliju, saj se tem primeru terminalne traheide kasnega lesa v širokih branikah ne bi uspele popolnoma oblikovati, ker bi jih prehitela zima. Vendarle pa naši rezultati kažejo, da je obdobje maksimalne celične produkcije lahko premaknjeno na začetek rastne sezone. Leta 2003 je bilo za vso Evropo značilno neobičajno suho in vroče poletje (Dobbertin, 2005). Drevesa na Sorškem polju so s kambijevo aktivnostjo začela konec aprila, kot običajno, kasneje pa je zaradi visokih temperatur in pomanjkanja padavin stopnja celičnih delitev v kambiju upadla, vse dokler se rastna sezona ni predčasno zaključila. Rastišče na Sorškem polju je zaradi prodnih tal in

majhne zaloge talne vode zelo občutljivo na sušo. Kljub temu pa koeficienti linearne regresije med kumulativno tedensko vsoto padavin in tedenskimi prirastki celic na nobenem rastišču niso pokazali statistično značilnih korelacij. Na Ravniku so bile korelacije v obdobju nastajanja ranega in kasnega lesa zelo nizke in v glavnem negativne. Med vegetacijo je na Ravniku padlo v povprečju 60 mm padavin mesečno, ki so bile enakomerno razporejene. Na Pokljuki so bile korelacije med padavinami in tedenskim prirastkom celic ranega in kasnega lesa pozitivne, vendar pa so bile vrednosti nizke in niso bile statistično značilne. Mesečno je na tem rastišču padlo preko 100 mm enakomerno razporejenih padavin. Na Sorškem polju so bile v obdobju nastajanja ranega lesa zabeležene pozitivne korelacije med tedenskimi prirastki in tedensko količino padavin razen časovnega zamika 1 in 2 dni. Korelacijske vrednosti niso bile statistično značilne. V drugi polovici rastne sezone so bile korelacijske vrednosti vseskozi negativne. Samo za časovni zamik 1 dan je bila korelacijska vrednost statistično značilna. Negativne zveze med padavinami in tedenskim celičnim prirastkom je težko komentirati. V juniju in juliju je padlo v povprečju 55 mm padavin. Padavine, ki so padle konec julija, ob zaključku vegetacije, na dinamiko delitev v kambiju niso več vplivale. Ko smo zadnja 2 tedna kambijeve aktivnosti izključili iz analiz, so korelacijski koeficienti z negativnih vrednosti po časovnem zamiku 4 dni prešli na pozitivne vrednosti. Vrednosti korelacijskih koeficientov so bile sorazmerno visoke, vendar ne statistično značilne. Kot smo že poudarili, padavine niso neposredno povezane z oskrbo dreves s talno vodo. Bolj zanesljivi kazalnik vodnih razmer v tleh je merjenje količine vode v tleh. Tudi drugi avtorji med temperaturami in celično produkcijo niso dobili visokih korelacij (Antonova in Stasova, 1993, 1997, Deslauriers in Morin, 2005). Horacek in sodelavci (1999) so za postkambijsko rast ugotovili mejno količino padavin 100 mm. Razen na Pokljuki je bila količina padlih padavin na Sorškem polju in Ravniku v letu 2003 v vseh mesecih vegetacije manjša od 100 mm.

Časovni zamiki med zaporednimi fazami ksilogeneze so bili pri jelki in smreki ne glede na rastišče enaki. Pri ranem lesu se je odlaganje sekundarne celične stene začelo 2 tedna po prvi zabeleženi ksilemski celici v fazi postkambijske rasti. Inicialne traheide so za popoln razvoj potrebovale 4 tedne. Po zaključku delitev v kambiju se je v terminalnih traheidah kasnega lesa nadaljevala sinteza sekundarne celične stene in lignifikacija tudi do 2 meseca, ne glede na rastišče in čas zaključka kambijeve aktivnosti. To je skladno z opazovanji drugih avtorjev na različnih iglavcih, ki rastejo v zmernem pasu (Whitmore in Zahner, 1966, Skene, 1972, Wodzicki, 1972, Kutscha in sod., 1975, Murmanis in Sachs, 1969, Nix in Villiers, 1985, Donaldson, 1991, 1992, 2001, Gindl in sod., 2001, Schmitt in sod., 2003, Gričar in sod., 2003a, b, 2005a). Trajanje posameznih faz diferenciacije ni neposredno povezano s temperaturnimi spremembami (Wodzicki, 2001). Proces lignifikacije traheid kasnega lesa se lahko zaključi dosti kasneje kot odlaganje sekundarne celične stene (Gindl in sod., 2001, Gričar in sod., 2005a). V eni izmed prejšnjih študij smo podrobneje raziskali proces nastajanja sekundarne celične stene in lignifikacije terminalnih traheid kasnega lesa pri navadni jelki v dormantnem obdobju s pomočjo svetlobne in transmisijske elektronske mikroskopije ter UV-mikrospektrofotometrije (Gričar in sod., 2003a, b, 2005a). Kambijeva celična delitvena aktivnost in proces diferenciacije sta se kasneje zaključila pri drevesih s širšimi branikami oziroma produktivnejšim kambijem (Gričar in sod., 2003a). Sinteza notranjih slojev sekundarne celične stene in lignifikacija sta pri teh drevesih v oktobru še vedno potekali. Vendar pa se je razvoj terminalnih traheid pri vseh drevesih zaključil do

sredine novembra, saj nismo opazili nobenih razlik v zgradbi terminalnih traheid ob kambiju med novembrskimi in marčevskimi vzorci (Gričar in sod., 2003a, b, 2005a, b). Naši rezultati so se razlikovali od opažanj nekaterih drugih avtorjev. Murmanis in Sachs (1969) sta poročala o prisotnosti citoplazme v lumnih v enem ali več tangencialnih nizih terminalnih traheid kasnega lesa bora *Pinus strobus* v septembru, oktobru in celo še v januarju. Donaldson (1991, 1992) je zasledil, da se pri večini vzorcev lesa bora *Pinus radiata* proces lignifikacije sekundarnih celičnih sten traheid kasnega lesa ni zaključil do poznega zimskega obdobja. Nix in Villiers (1985) sta na vzorcih odvzetih v novembru in marcu merila dvojne debeline celičnih sten traheid kasnega lesa pri dveh borih *Pinus taeda* ter *Pinus elliotii* in ugotovila, da so bile debeline celičnih sten izmerjene v marcu večje kot v novembru predhodnega leta, kar naj bi nakazovalo, da v novembru proces diferenciacije še ni bil zaključen. Tako Donaldson (1992) kot Nix in Villiers (1985) so sklepali, da se proces diferenciacije traheid kasnega lesa, ki je poleg notranjih dejavnikov potrjen tudi zunanjim vplivom okolja, morda nadaljuje med zimskim obdobjem ali pa se prekine in nadaljuje nekje v marcu naslednje leto ter se zaključi preden nastanejo prve celice nove branike tekočega leta.

5.1.3 Ogrevanje in ohlajanje dela debla navadne smreke

Naši rezultati eksperimentalno nadzorovanega ogrevanja in ohlajanja dela debla navadne smreke so pokazali, da je s temperaturo mogoče vplivati na redno kambijevo aktivnost. Do podobnih zaključkov so prišli že v predhodnih študijah o lokalno ogrevanih deblih pri različnih iglavcih v dormantnem obdobju (Oribe in Kubo, 1997, Oribe in sod., 2001, 2003, 2004). Ogrevanje debla smreke v zaključni fazi dormantnega obdobja (konec marca 2004) je sprožilo zgodnejšo reaktivacijo kambija ter stimuliralo proces celične diferenciacije. Kambijeva aktivnost se je pričela najprej na floemski strani skladno z opazovanji drugih raziskovalcev (Oribe in Kubo, 1997, Oribe in sod., 2001, 2003, 2004). Pri lokalno ogrevanem delu debla jelke *Abies sachalinensis* v dormantnem obdobju so se floemske celice začele diferencirati pred celičnimi delitvami v kambiju. Po reaktivaciji kambija so na ksilemski strani zasledili manjše število celic v fazi postkambijske rasti. Hitrejši odziv floemske strani na ogrevanje so poskušali pojasniti s histokemičnega, strukturnega ali molekulskega stališča (Oribe in sod., 2001). Kljub temu pa po Larsonu (1994) med kambijevimi celicami ni nobene značilne ultrastrukturne razlike. Dormantne kambijeve celice ne vsebujejo rezervnega škroba ne na floemski ne na ksilemski strani (Larson, 1994). Vendarle pa bi bilo mogoče zgodnejše delitve na floemski strani razložiti z zaznavanjem eksogenih dejavnikov v kambiju v obliki gradienta iz floemske proti ksilemski strani (Oribe in sod., 2001). Oribe in sodelavci (2001) so predpostavili dve glavni smeri translokacije ogljikovih hidratov iz skladiščnih celic, ki se vršita pri ogrevanju. Eno pot naj bi predstavljalo gibanje hranilnih snovi v radialni smeri iz floemskih parenhimskih celic do kambijevih celic. Druga pot naj bi bila v tangencialni smeri iz trakovnih parenhimskih celic do kambijevih celic. Iz tega so avtorji zaključili, da bi lahko bile kambijeve celice na floemski strani bolj oskrbljene s hranilnim snovmi, saj se nahajajo v neposredni bližini floemskih parenhimskih celic. Zaradi večje oskrbe naj bi se delitve kambijevih celic začele najprej na floemski in šele nekoliko kasneje na ksilemski strani (Oribe in sod., 2001).

V obdobju dormance zavisi zgodnejša reaktivacija kambija od drevesne vrste, habitusa in tega, ali je drevo zimzeleno ali listopadno (Oribe in Kubo, 1997, Oribe in sod., 2001, 2003). Kambijeve celice zimzelenih iglavcev se lahko pričnejo deliti v obdobju ekodormance, ki jo uravnavajo zunanji dejavniki, neodvisno od rasti novih poganjkov ali razvoja popkov spomladi. Lokalizirano ogrevanje dela debla jelke *Abies sachalinensis* v zimskem obdobju je sprožilo zgodnejšo reaktivacijo kambija. Vendar pa je bila celična produkcija manj izrazita v primerjavi z redno kambijevo aktivnostjo. Poleg tega so se delitve kambijevih celic ustavile kmalu po nastanku majhnega števila celic. Oribe in sodelavci (2003) so predpostavili, da so za kontinuiteto celičnih delitev v lokalno ogrevanem kambiju pri jelki *Abies sachalinensis* manjkali ostali pogoji (poleg zvišane temperature), ki so izpolnjeni v obdobju kambijeve redne aktivnosti. Kambijeve celice potrebujejo za neprekinjene delitve nenehno oskrbo z avksinom skozi polarni transportni sistem (Sundberg in sod., 2000). Pri kriptomeriji *Cryptomeria japonica* je eksperimentalno nadzorovan dvig temperature na 25°C spodbudil celične delitve, pri čemer je odziv kambija na povišano temperaturo naraščal od zime proti spomladi. Decembra se kambij na bazi drevesa ni reaktiviral, kar potrjuje izostanek preostalih dejavnikov, ki so poleg temperature potrebni za prekinitev dormance (Oribe in Kubo, 1997). Reaktivacija kambija je odvisna od dormantnega stanja, pri čemer sta verjetnost in obseg celičnih delitev večja v obdobju ekodormance, ki je inducirana s strani okolja. Pri macesnu *Larix leptolepis* povišane temperature niso sprožile kambijeve aktivnosti. V dormantnem obdobju se kambij ni odzval na dotok avksina. Kambijeva občutljivost na avksin je povezana s sposobnostjo kambijevih celic za polarni transport. V oktobru in novembru transport postane bolj ali manj difuzen, kar nakazuje neaktivnost oziroma izgubo večine avksinskih nosilcev v kambiju (Lachaud in sod., 1999). Avtorja (Oribe in Kubo, 1997) sta zaključila, da nizke temperature ne predstavljajo edinega omejujočega dejavnika za sprožitev delitev kambijevih celic pri macesnu *Larix leptolepis*, za katerega je značilno, da jeseni odvrže iglice. Redna kambijeva aktivnost se je pri tej vrsti začela šele po aktivaciji popkov, in sicer najprej pod krošnjo, nato pa se je širila bazipetalno vzdolž debla (Oribe in Kubo, 1997). Pri nekaterih drevesnih vrstah je za reaktivacijo kambija potrebna stalna oskrba z avksinom iz razvijajočih se popkov in ne zadostuje endogeni avksin, ki je prisoten v dormantnem kambiju odraslih dreves (Savidge in Wareing, 1981, Oribe in Kubo, 1997). Pri zimzelenih iglavcih pa se zdi, da lokalno ogrevanje dela debla v obdobju ekodormance zadostuje za stimulacijo celičnih delitev v kambiju neodvisno od rasti novih poganjkov ali razvoja popkov (Oribe in Kubo, 1997).

Enomesečno ogrevanje dela debla smreke v letu 2004 ni vplivalo na širino ali strukturo ksilemskih in floemskih branik. Delež kasnega lesa je pri ogrevanem in kontrolnem vzorcu znašal okoli 40%. Eksperimentalno ogrevanje dela debla navadne smreke tekom celotnega vegetacijskega obdobja 2005 je povečalo celično produkcijo v prvi polovici rastne sezone. Redna kambijeva delitvena aktivnost se je ob koncu vegetacije zaradi kontinuiranih povišanih temperatur le nekoliko podaljšala. Zaključila se je v prvi polovici avgusta, nekaj dni kasneje kot pri kontrolnem drevesu. Ksilemska branika 2005 je bila nekoliko širša (35 slojev celic) v primerjavi s kontrolo (27 slojev celic). Dinamika celičnih delitev v kambiju je bila v primerljivo dolgem vegetacijskem obdobju večja na začetku rastne sezone. Pri drugem vzorčenju (17.5.2005) smo pri kontrolnem vzorcu na ksilemski strani zasledili le 5 do 6 slojev celic v postkambijski rasti, pri ogrevanem vzorcu pa poleg 5 do 6 slojev celic v postkambijski rasti še 9 do 11 slojev celic v procesu odlaganja sekundarne celične stene in

lignifikacije. Prve traheide so bile tedaj že popolnoma oblikovane. Pri tretjem vzorčenju (7.6.2005) smo pri kontrolnem drevesu zabeležili 3 do 4 sloje zrelih traheid, pri ogrevanem vzorcu pa kar 11 do 13 slojev. Konec junija (28.6.2005) je bilo število odraslih traheid večje pri ogrevanem vzorcu (do 17 slojev) kot pri kontroli (do 12 slojev). Vendar pa je bilo tedaj nekoliko več celic v procesu odlaganja sekundarne celične stene in lignifikacije pri kontroli (do 11 slojev) v primerjavi z ogrevanim vzorcem (do 8 slojev). Pri naslednjih vzorčenjih razlike niso bile izrazite. Na vzorcih odvzetih po zaključku eksperimenta smo pri ogrevanem vzorcu zasledili morfološke razlike v zgradbi traheid prehodnega in kasnega lesa. Radialne dimenzije traheid prehodnega lesa so se zmanjšale in nato zopet nekoliko povečale, medtem ko je debelina celičnih sten ostala nespremenjena. Pojav t.i. lažnih branik je značilen za sušna rastišča, kjer ob pomanjkanju vode začnejo nastajati traheide z majhnimi radialnimi dimenzijami. Pri kasnejših padavinah in padcu temperatur pa se dimenzije nastalih traheid povečajo (Wimmer, 2002). Ali je ta pojav povezan z našim eksperimentom, je na podlagi enoletnega vzorčenja zgolj na enem drevesu težko trditi. Z raziskavo dinamike nastanka ksilemske branike 2003 smo pri vzorčnih drevesih na Pokljuki, Ravniku in Sorškem polju ugotovili negativne zveze med temperaturami in tedenskim prirastkom celic kasnega lesa ter pozitivne zveze v obdobju nastajanja ranega lesa. Kaže, da so visoke temperature ugodne za celično produkcijo v prvi polovici rastne sezone, medtem ko je v drugi polovici vegetacije njen vpliv na debelinsko rast dreves manjši in prevladujejo drugi dejavniki. Previsoke temperature v obdobju nastajanja kasnega lesa lahko celo zavirajo celične delitve. Morda bi bil ob nekoliko nižjih eksperimentalno nadzorovanih temperaturah (npr. 20°C) odziv kambija tekom vegetacije drugačen. Sicer pa naši rezultati podpirajo hipotezo Rossija in sodelavcev (2006a, b), da ugodne temperature v drugi polovici rastne sezone niso povezane z daljšo kambijevo aktivnostjo. Kaže, da se drevesa pred solsticijem lahko odzovejo na ugodne temperature s povečano stopnjo delitev v kambiju, po solsticiju pa ne več, da imajo zadnje nastale celice dovolj časa za popoln razvoj preden nastopi zimsko obdobje. Vpliv temperatur na kambijevo aktivnost se tako tekom vegetacije spreminja.

Odziv kambija in njegovih derivatov na enomesečno lokalno ohlajanje debela smreke na višku vegetacije 2004 (sredina junija) je bil viden šele po 30 dneh, in sicer le na ksilemski strani. Zaradi stalno znižanih temperatur je začel predčasno nastajati kasni les. Obenem se je zmanjšalo število celic v kambiju na 4 do 5 slojev, kar je bilo značilno za dormanten kambij. Zaključili smo, da je ohlajanje sprožilo hitrejši zaključek kambijeve aktivnosti, kar se je odražalo v zmanjšanem deležu kasnega lesa (20%) v primerjavi s kontrolo (40%). Navkljub znižanim temperaturam je struktura in širina floemske branike 2004 ostala nespremenjena. Zaradi lokalnega ohlajanja debela smreke tekom celotne vegetacije 2005 se je redna kambijeva aktivnost skrajšala za približno 3 tedne. Poleg tega je bila zmanjšana tudi stopnja celičnih delitev v kambiju, zlasti v prvi polovici rastne sezone. Ksilemski prirastek je bil zmanjšan približno za tretjino (na 10 slojev celic). Razlika med kontrolnim in hlajenim vzorcem je bila izrazita pri tretjem vzorčenju (7.6.2005), ko so bili pri hlajenem vzorcu največ 3 sloji celic v procesu odlaganja sekundarne stene in lignifikacije, medtem ko je bilo pri kontroli do 10 slojev celic v fazi sinteze sekundarne stene in lignifikacije. Hkrati smo pri kontroli zasledili do 4 sloje odraslih traheid ranega lesa. Prve popolnoma oblikovane traheide ranega lesa (do 3 sloje) smo pri hlajenem vzorcu zabeležili šele v sredini julija (19.7.2005), ko je bilo pri kontroli zrelih do 19 slojev traheid. Kambijeva aktivnost se je v tem času pri hlajenem vzorcu že ustavljala. Razvoj ksilemske

branike 2005 je bil pri hlajenem vzorcu zaključen v začetku septembra, pri kontroli pa šele konec oktobra. Ozka ksilemska branika 2005 hlajenega vzorca je odražala tipično strukturo lesa dreves, ki rastejo v stresnih razmerah. Takrat je zmanjšana predvsem oskrba z asimilati. Stres je značilen odklon od razmer, ki so optimalne za rast in razvoj dreves. Če takšne neugodne razmere trajajo dalj časa, se vitalnost drevesa zelo zmanjša, v določenem trenutku pa lahko nastane nepopravljiva škoda oziroma drevo odmre (Dobbertin, 2005). Poskus lokalnega ohlajanja debla smreke potrjuje velik pomen ugodnih temperatur na dinamiko celičnih delitev v kambiju v prvem obdobju vegetacije.

Ker lokalno ogrevanje oziroma hlajenje dela debla smreke ni vplivalo na kambijevo aktivnost in celično diferenciacijo nad tretiranim mestom in je bila zgodnejša reaktivacija kambija oziroma zgodnejši nastanek kasnega lesa omejen na izolirani del debla, lahko podpremo ugotovitve Barnetta in Millerja (1994), da se vpliv temperature ne prenaša po dolžini debla dreves. Meritve temperature kambija v izoliranem delu debla ter 10 cm nad in pod njim v letu 2005 so pokazale, da je prenos temperature po deblu zanemarljiv, saj so temperaturne razlike pod in nad sistemom znašale le okoli $\pm 2^{\circ}\text{C}$. Temperature v kambiju so tudi v izoliranem delu debla nihale sorazmerno z zunanjo temperaturo, vendar je bil odziv postopen in ne nenaden. Praviloma so na temperaturo v kambiju vplivale dolgoročno znižane ali zvišane temperature zraka. Velik vpliv na temperatur v kambiju ima poleg zračnih temperatur še temperatura tal in talne vode, ki se po lesu prevaja iz korenin proti krošnji. Deslauriers in Morin (2005) sta zasledila hiter odziv kambija na temperaturne spremembe, česar naši rezultati niso potrdili.

Ultrastrukturalne in topokemijske raziskave lesnega tkiva ogrevanega, hlajenega in kontrolnega vzorca v letu 2004 niso pokazale nobenih razlik v procesu odlaganja sekundarne celične stene in lignifikacije ter vsebnosti lignina v posameznih področjih celične stene. Lignifikacija se je pričela v celičnih vogalih in združeni srednji lameli in se nato postopoma širila v sloje sekundarne stene centripetalno proti lumnu. Največ lignina je bilo v celičnih vogalih in združeni srednji lameli, najmanj pa v S2 sloju sekundarne stene, kar je značilno za traheide iglavcev (Terashima, 2000, Donaldson, 2001, Schmit in Melcher, 2004). Gindl in sodelavci (2000) so pri navadni smreki iz Alp zasledili tesno zvezo med lignifikacijo terminalnih traheid kasnega lesa in temperaturo. Če so bile temperature v septembru in oktobru zelo nizke, je bila vsebnost lignina v celicah, ki so bile takrat še v procesu diferenciacije, zmanjšana (Gindl in Grabner, 2000, Gindl in sod., 2000). Pri hlajenem vzorcu nismo zasledili zmanjšane vsebnosti lignina, vendar pa temperature v našem poskusu niso bile izjemno nizke ($9\text{--}11^{\circ}\text{C}$). Kot kaže, enomesečna zvišana oziroma znižana temperatura ne vpliva na proces lignifikacije.

Enomesečno ogrevanje oziroma hlajenje dela debla smreke v letu 2004 ni vplivalo na širino in anatomsko zgradbo floemskih branik. Navkljub ogrevanju in hlajenju tekom celotne vegetacije 2005, se zgradba ranega floema pri ogrevanju in hlajenem vzorcu ni spremenila. Rani floem je bil sestavljen iz 3 do 4 slojev sitastih celic z velikimi radialnimi dimenzijami in tankimi celičnimi stenami, kar je tipično za navadno smreko (Gričar in sod., 2005c). Tangencialni pas aksialnega parenhima, ki razmejuje rani in kasni floem, je navadno sklenjen. Nesklenjen pas se pojavi predvsem pri drevesih, ki rastejo v stresnih razmerah. Takšno situacijo smo v našem primeru zasledili pri hlajenem vzorcu. Vzorci so se razlikovali v številu celic kasnega floema. Pri kontrolnem drevesu smo zabeležili 4 do 5

slojev sitastih celic kasnega floema z manjšimi radialnimi dimenzijami in debelejšimi celičnimi stenami, kar je značilno za sekundarno floemsko braniko pri nižinski smreki (Gričar in sod., 2005c). Pri ogrevanem vzorcu se je število celic kasnega floema povečalo na 7 do 8 slojev, mestoma se je pojavil tudi drugi nesklenjeni pas aksialnega parenhima, ki je značilen za široke floemske prirastke. Nasprotno se je pri hlajenem vzorcu število celic kasnega floema zmanjšalo na 2 do 3 sloje. Za razliko od ksilemske branike se anatomska zgradba floemske branike glede na rastne razmere oziroma stopnjo vitalnosti navadne smreke spreminja (Holdheide, 1951). V zelo stresnih razmerah je tangencialni pas aksialnega parenhima nesklenjen, število celic kasnega floema pa se zmanjša ali celo popolnoma izostane (Holdheide, 1951), podobno kot pri hlajenem vzorcu v našem poskusu. Razlike v anatomski zgradbi floemskih branik med vzorci so bile posledica različnega trajanja kambijeve aktivnosti in ne spremenjene stopnje celične produkcije. V vseh primerih so prve parenhimske celice nastale do sredine maja. Dinamika celičnih delitev v obdobju nastajanja kasnega floema je bila pri vseh vzorcih enaka. Poskusa v letu 2004 in 2005 kažeta, da je dinamika nastanka floemske branike podvržena manjšim vplivom zunanjih dejavnikov v primerjavi s ksilemom.

Naše raziskave in raziskave drugih znanstvenikov potrjujejo, da so zunanji dejavniki zelo pomembni za kambijevo aktivnost in celično diferenciacijo, vsekakor pa tudi vpliv notranjih dejavnikov (fitohormoni, sladkorji idr.) ni zanemarljiv (Little in Bonga, 1974, Riding in Little, 1984, 1986, Mellerowicz in sod., 1992, Savidge in Barnett, 1993, Savidge, 1996, 2000, Kozlowsky in Pallardy, 1997, Lachaud in sod., 1999, Aloni in sod., 2000, Krael, 2000, Uggl, in sod., 2001, Wodzicki, 2001, Oribe, in sod., 2003). Endogeni avksin, ki je prisoten v dormantnem kambiju odraslih dreves, je včasih zadosten za stimulacijo celičnih delitev, a ne vedno. Po reaktivaciji kambija je potrebna neprestana oskrba kambijevih celic z avksinom, kar zagotavljajo rastoči poganjki in razvijajoči se popki, s čimer omogočajo neprekinjene celične delitve (Sundberg in sod., 2000, Oribe in sod., 2003). Vzrok za prekinitev kambijeve aktivnosti je lahko pomanjkanje avksina. Znižane temperature v našem poskusu bi lahko vplivale na hitrost bazipetalnega avksinskega transporta. Po drugi strani pa naj bi bil obseg delitev kambijevih celic odvisen tudi od preskrbe s saharozo iz skladiščnih tkiv (Oribe in sod., 2003). Koncentracijski gradienti topnih sladkorjev v razvijajočem se vaskularnem tkivu kažejo, da naj bi imeli sladkorji (poleg energije in kot sestavine za strukture ter shranjevanje) tudi vlogo razvojnih regulatorjev. Razmerje med avksinom in saharozo naj bi uravnavalo proces diferenciacije v floem ali ksilem (Uggl, in sod., 2001).

5.2 SKLEPI

Metodi pining in odvzem intaktnih vzorcev tkiv sta primerni za raziskave dinamike nastanka ksilemske branike pri navadni smreki in navadni jelki. Pri metodi pining je vbod z iglo povzročil izsušitev ksilemskega tkiva, nekrozo kambija in nediferenciranih ksilemskih celic, nastanek kalusa, travmatskih smolnih kanalov in poranitvenega lesa. Meja med kambijevimi celicami ter celicami v postkambijski rasti, ki so se nahajale v kalusu, je določala ksilemski prirastek nastal do trenutka vboda. Travmatski smolni kanali niso zanesljivo določali ksilemskega prirastka nastalega do trenutka poškodbe. Metoda odvzema intaktnih vzorcev tkiv je bila primernejša za proučevanje posameznih faz ksilogeneze, saj so bile ksilemske in kambijeve celice dobro ohranjene. Metoda je ustrezna tudi za proučevanje sezone dinamične celične produkcije na floemski strani.

Kambijeva delitvena aktivnost se je v letu 2003 najhitreje začela pri testnih jelkah na Ravniku, konec aprila. Pri smrekah na Sorškem polju se je začela nekaj dni kasneje, najkasneje pa pri smrekah na Pokljuki, v sredini maja. Kasnejši začetek delitev v kambiju pri smrekah na Pokljuki je najverjetneje povezan z nižjimi temperaturami v začetku maja. Časovni zamiki med zaporednimi fazami ksilogeneze so bili pri jelki in smreki ne glede na rastišče enaki. V ranem lesu se je odlaganje sekundarne celične stene začelo 2 tedna po prvi zabeleženih ksilemskih celicah v fazi postkambijske rasti. Inicialne traheide so za popoln razvoj potrebovale 4 tedne. Na vseh 3 rastiščih je bilo pri prehodu ranega v kasni les oblikovane približno 70% ksilemske branike 2003. Delitve v kambiju so se najhitreje zaključile pri vzorčnih drevesih iz Sorškega polja (konec julija), nato na Pokljuki (sredina avgusta) in nazadnje še na Ravniku (konec avgusta). Diferenciacija terminalnih traheid kasnega lesa je trajala do 2 meseca in se je pri vseh drevesih zaključila najkasneje do sredine novembra. Pri vzorčnih drevesih na Sorškem polju je bila rastna sezona 2003 dolga 2 meseca in pol, na Pokljuki 2 meseca in na Ravniku 4 mesece in pol.

Gompertzova funkcija je ustrezno opisala razvoj ksilemske branike v rastni sezoni 2003 na vseh 3 ploskvah. Največjo variabilnost v številu ksilemskih celic branike 2003 po obodu posameznega drevesa smo zasledili proti koncu vegetacije, ko je stopnja celične produkcije upadla. Na vzorcih s Pokljuke smo zabeležili največjo dinamiko celičnih delitev, v povprečju 0,68 celic/dan, na Ravniku 0,51 celic/dan in na Sorškem polju 0,35 celic/dan. Izračunana končna širina ksilemske branike 2003 je bila pri vzorčnih drevesih na Ravniku okoli 70 celic, na Pokljuki 42 celic in na Sorškem polju 26 celic. Maksimalna celična produkcija je bila pri vzorčnih drevesih iz Ravnika in Pokljuke okoli solsticija (148. oziroma 164. Julijanski dan), na Sorškem polju pa več kot mesec dni prej (136. Julijanski dan).

Korelacijski koeficienti linearne regresije med povprečnimi tedenskimi prirastki celic ranega lesa in temperaturnimi spremenljivkami so bili ne glede na rastišče vedno pozitivni. Nastanek kasnega lesa pa je bil vselej v negativni korelaciji s temperaturami. Koeficienti linearne regresije med kumulativno tedensko vsoto padavin in tedenskimi prirastki celic na nobenem rastišču niso pokazali statistično značilnih korelacij.

Izkazalo se je, da je z eksperimentalno nadzorovano temperaturo mogoče vplivati na redno kambijevo aktivnost smreke. Ogrevanje dela debla smreke v zaključni fazi dormantnega obdobja (konec marca) v letu 2004 je sprožilo zgodnejšo reaktivacijo kambija in

stimuliralo celično diferenciacijo. Kambijeva aktivnost se je pričela najprej na floemski, kasneje pa tudi na ksilemski strani. Enomesečno ogrevanje ni vplivalo na širino ali strukturo ksilemskih in floemskih branik. Delež kasnega lesa je pri ogrevanju in kontrolnem vzorcu znašal okoli 40%. Eksperimentalno ogrevanje dela debela smreke tekom celotne vegetacije 2005 je povečalo celično produkcijo v prvi polovici rastne sezone. Redna kambijeva delitvena aktivnost se je ob koncu vegetacije zaradi kontinuirano povišanih temperatur le nekoliko podaljšala. Ksilemska branika 2005 ogrevanega vzorca je bila nekoliko širša v primerjavi s kontrolo.

Pri enomesečnem lokalnem ohlajanju debela smreke na višku vegetacije (sredina junija) 2004 je bil odziv kambija viden šele po 30 dneh, in sicer le na ksilemski strani. Zaradi znižanih temperatur je začel predčasno nastajati kasni les. Obenem se je zmanjšalo število kambijevih celic na 4 do 5 slojev, kar je bilo značilno za dormanten kambij. Ohlajanje je sprožilo hitrejši zaključek kambijeve aktivnosti, kar se je odražalo v zmanjšanem deležu kasnega lesa (20%) v primerjavi s kontrolo. Navkljub znižanim temperaturam je struktura in širina floemske branike 2004 ostala nespremenjena. Zaradi stalno znižanih temperatur tekom celotne vegetacije 2005 se je kambijeva aktivnost skrajšala približno za 3 tedne. Poleg tega je bila zmanjšana tudi stopnja celične produkcije, zlasti v prvi polovici rastne sezone. Ksilemski prirastek je bil zmanjšan približno za tretjino. Ozka ksilemska branika 2005 je odražala tipično strukturo lesa dreves, ki rastejo v stresnih razmerah. Prve popolnoma oblikovane traheide ranega lesa smo zasledili več kot mesec dni kasneje v primerjavi s kontrolo. S temperaturo je mogoče vplivati na ksilogenezo pri navadni smreki, vendar pa se njen vpliv tekom vegetacije spreminja. Kaže, da so ugodne temperature ključne za kambijevo aktivnost in razvoj celic predvsem v prvi polovici rastne sezone, medtem ko kasneje prevladajo drugi dejavniki.

Ogrevanje in ohlajanje v letu 2005 je vplivalo na strukturo in širino floemskih prirastkov. Zgradba ranega floema je ostala nespremenjena, medtem ko je bilo število sitastih celic kasnega floema pri hlajenem vzorcu zmanjšano, pri ogrevanju pa povečano v primerjavi s kontrolo. Tangencialni pas aksialnega parenhima, ki razmejuje rani in kasni floem, pri hlajenem vzorcu ni bil sklenjen.

Lokalno ogrevanje oziroma hlajenje debela smreke v letu 2004 ni vplivalo na kambijevo aktivnost in celično diferenciacijo izven tretiranega dela. Prenos temperature iz izoliranega dela je bil po debelu je zanemarljiv, saj so temperaturne razlike v kambiju pod in nad sistemom znašale le okoli $\pm 2^{\circ}\text{C}$. Temperature v kambiju so tudi v izoliranem delu debela nihale sorazmerno z zunanjo temperaturo, vendar je bil odziv postopen. Praviloma so na temperaturo v kambiju vplivale dolgoročne znižane ali zvišane temperature zraka.

Ultrastrukturne in topokemijske raziskave lesnega tkiva ogrevanega, hlajenega in kontrolnega vzorca v letu 2004 so pokazale, da na proces odlaganja sekundarne celične stene in lignifikacije ter na vsebnost lignina v posameznih področjih celične stene temperatura ni vplivala.

6 POVZETEK

Z metodama pining in odvzemom vzorcev intaktnih tkiv smo pri navadni smreki (*Picea abies* Karst.) in navadni jelki (*Abies alba* Mill.) dinamiko nastanka ksilemske branike v rastni sezoni 2003. Testne jelke smo izbrali na Ravniku, smreke pa na Sorškem polju in Pokljuki. Za posamezna rastišča smo s pomočjo Gompertzove funkcije izdelali modelne krivulje debelinske rasti dreves. Raziskali smo zvezo med temperaturo in padavinami ter tedenskim prirastkom ksilemskih celic. V nadaljevanju smo proučili odziv dormantnega in aktivnega kambija na eksperimentalno nadzorovano ogrevanje in ohlajanje dela debla navadne smreke v Ljubljani v letih 2004 in 2005.

Za študijo sezonske dinamike nastanka ksilemske branike smo izbrali 4 navidezno zdrave odrasle jelke na Ravniku (600 m n.m.) in 9 dominantnih ali kodominantnih smrek na Sorškem polju (350 m n.m.) in Pokljuki (1200 m n.m.). Na vsakem rastišču smo iz 4 živih dreves v prsni višini (1,3 m nad tlemi) odvzemali intaktne vzorce tkiv ($1 \times 1 \times 1 \text{ cm}^3$), ki so zajemali notranji del floema, kambija in zunanji del ksilema. Vzorčenje je potekalo v tedenskih intervalih tekom rastne sezone 2003 (od 23.4. do 12.11.2003). Vzorce smo fiksirali v FAA (formalin, etanol, očetna kislina) in dehidrirali v etanolni vrsti. Pripravili smo trajne anatomske preparate prečnih prerezov z jeklenimi noži in drsnim mikrotomom Leica SM 2000R ter jih obarvali z barviloma safranin in astra modro. Na Pokljuki in Sorškem polju smo dodatno na 5 drevesih izvajali ekperiment pining z iglo premera 1,75 mm v 6 nivojih. Eksperiment je potekal isti dan kot vzorčenje intaktnih tkiv. Drevesa smo na koncu posekali, odvzeli poškodovana tkiva in pripravili preparate za svetlobno mikroskopijo po enakem postopku kot intaktne vzorce. Mikroskopske preiskave in meritve smo opravili s svetlobnim mikroskopom Nikon Eclipse E800 (presevna mikroskopija in polarizirana svetloba) ter s sistemom za analizo slike Lucia G 4.8. Za obdelavo podatkov in vse potrebne statistične analize smo uporabili programa Microsoft Excel in Statgraphics.

Za raziskave odziva kambija na eksperimentalno nadzorovano ogrevanje oziroma ohlajanje smo izbrali tri odrasle navidezno zdrave navadne smreke na južnem pobočju Rožnika (315 m n.m.) v Ljubljani, ki so bile med seboj oddaljene največ 10 metrov. Eno drevo smo ogrevali, drugo hladili, tretje drevo pa je bilo služilo za kontrolo. V letu 2004 smo prvo drevo začeli ogrevati 29.3.2004, pred začetkom redne kambijeve aktivnosti. Poizkus smo zaključili 3.5.2004. Del debla drevesa smo do temperature 23-25°C ogrevali na dolžini 1 metra, 70 cm nad tlemi, s samoregulirnim grelnim kablom. Sistem je bil izoliran in temperaturno nadzorovan. Del debla drugega drevesa smo začeli ohlajati 14.6.2004, na višku kambijeve aktivnosti. Poskus je potekal do 20.7.2004. Za hlajenje smo uporabili pretočni hladilni sistem. Del debla drevesa smo na temperaturo 9-11°C hladili na dolžini 1 metra, 70 cm nad tlemi. Sistem je bil izoliran in temperaturno nadzorovan. Intaktne vzorce tkiv smo v prsni višini dreves odvzeli na začetku eksperimenta ter nato vsakih 10 dni. Istočasno smo odvzeli vzorce tkiv 10 cm nad izoliranim delom debla. Dodatno smo odvzeli vzorce tkiv 16.12.2004, ko se je kambijeva aktivnost že zaključila. Vzorce smo fiksirali v FAA, dehidrirali v etanolu, pripravili trajne preparate tkiv prečnih prerezov z drsnim mikrotomom ter jih obarvali z barviloma safranin in astra modro. Za pripravo poltankih preparatov prečnih prerezov tkiv za svetlobno mikroskopijo in UV-mikrospektrofotometrijo smo vzorce nadalje dehidrirali v etanolu in acetonu ter jih vklopili v epoksidno smolo Spurr. Preparate smo izdelali z diamantnim nožem na ultramikrotomu. Vzorce za svetlobno mikroskopijo smo obarvali z barvilom toluidin modro. UV meritve in

analize celičnih sten smo izvedli z UV-mikrospektrofotometrom UMSP 80 Zeiss s programoma LAMWIN® (Zeiss) in APAMOS® (Zeiss). Ultra tanke rezine za transmisijsko elektronsko mikroskopijo smo pripravili z diamantnim nožem na ultramikrotomu in jih kontrastirali s kalijevim permanganatom. Preparate smo proučili pod svetlobnim mikroskopom Nikon Eclipse E 800. Tkiva smo preiskali z elektronskim mikroskopom Philips CM 12 TEM.

Eksperimentalno nadzorovano ogrevanje in ohlajanje dela debela navadne smreke je v letu 2005 potekalo preko celotne rastne sezone. Podobno smo izbrali tri odrasle navidezno zdrave navadne smreke na južnem pobočju Rožnika (315 m n.m.) v Ljubljani, ki so bila med seboj oddaljena največ 15 metrov. Eno drevo smo ogrevali, drugo hladili, tretje pa je bilo kontrolno drevo. Z ogrevanjem in ohlajanjem dela debela smo pričeli 26.4.2005. Temperaturo ogrevanja smo nastavili na 23-25°C, hlajenja pa na 9-11°C, podobno kot v poskusu iz leta 2004. Sistema sta bila enako zastavljena kot leto prej. Intaktne vzorce tkiv smo v prsni višini dreves odvzeli na začetku eksperimenta ter nato vsakih 21 dni tekom celotnega vegetacijskega obdobja 2005. S poskusom hlajenja smo zaključili 20.9.2005, s poskusom ogrevanja pa 11.10.2005. Pri vsakem odvzemu smo s termočleni izmerili temperaturo kambijevega tkiva v izoliranem delu debela ter 10 cm nad in pod njim. Vzorce smo fiksirali v FAA, dehidrirali v etanolu in vklopili v parafin. Pripravili smo trajne preparate tkiv prečnih prerezov z nizko profilnimi jeklenimi noži z rotacijskim mikrotomom Leica RM 2245 in jih obarvali z barviloma safranin in astra modro.

Metodi pining in odvzem intaktnih vzorcev tkiv sta primerni za raziskave dinamike nastanka ksilemske branike pri navadni smreki in navadni jelki. Pri metodi pining je vbod z iglo povzročil izsušitev ksilemskega tkiva, nekrozo kambija in nediferenciranih ksilemskih celic, nastanek kalusa, travmatskih smolnih kanalov in poranitvenega lesa. Oblika ksilemske branike je bila nad kalusom valovita, najverjetneje zaradi lokalno povečane produkcije celic po poškodovanju kambija z iglo. Meja med kambijevimi celicami ter celicami v postkambijski rasti, ki so se nahajale v kalusu, je določala ksilemski prirastek nastal do trenutka vboda. Travmatski smolni kanali niso zanesljivo določali ksilemskega prirastka nastalega do trenutka poškodbe. Metoda odvzema intaktnih vzorcev tkiv je bila primernejša za proučevanje posameznih faz ksilogeneze, saj so bile ksilemske in kambijeve celice dobro ohranjene. Metoda je ustrezna tudi za proučevanje sezonske dinamike celične produkcije na floemski strani.

Kambijeva delitvena aktivnost se je v letu 2003 najhitreje začela pri testnih jelkah na Ravniku, konec aprila. Število celic v kambiju se je tedaj podvojilo. Pri smrekah na Sorškem polju se je začela nekaj dni kasneje, najkasneje pa pri smrekah na Pokljuki, v sredini maja. Kasnejši začetek delitev v kambiju pri smrekah na Pokljuki je najverjetneje povezan z nižjimi temperaturami v začetku maja. Časovni zamiki med zaporednimi fazami ksilogeneze so bili pri jelki in smreki ne glede na rastišče enaki. V ranem lesu se je odlaganje sekundarne celične stene začelo 2 tedna po prvi zabeleženi ksilemski celici v fazi postkambijske rasti. Inicialne traheide so za popoln razvoj potrebovale 4 tedne. Na vseh 3 rastiščih je bilo pri prehodu ranega v kasni les oblikovane približno 70% ksilemske branike 2003. Delitve v kambiju so se najhitreje zaključile pri vzorčnih drevesih iz Sorškega polja (konec julija), nato na Pokljuki (sredina avgusta) in nazadnje še na Ravniku (konec avgusta). Diferenciacija terminalnih traheid kasnega lesa je trajala do 2 meseca in

se je pri vseh drevesih zaključila najkasneje do sredine novembra. Pri vzorčnih drevesih na Sorškem polju je bila rastna sezona 2003 dolga 2 meseca in pol, na Pokljuki 2 meseca in na Ravniku 4 mesece in pol. Kratka rastna sezona smrek na Sorškem polju je bila najverjetneje povezana s pomanjkanjem padavin in visokimi temperaturami v letu 2003.

Za vse 3 ploskve smo izdelali modele debelinske rasti dreves v letu 2003 z uporabo Gompertzove funkcije. Gompertzova funkcija je ustrezno opisala razvoj ksilemske branike 2003 vzorčnih dreves na vseh 3 rastiščih. Ujemanje Gompertzove krivulje s povprečnimi dejanskimi podatki je bilo v vseh primerih nad 95%. Večja odstopanja dejanskih podatkov od izračunane krivulje smo zasledili ob koncu vegetacije, ko je stopnja celičnih delitev v kambiju upadla. Variabilnost v številu ksilemskih celic po obodu posameznega drevesa je bila takrat največja. Na vzorcih s Pokljuke smo zabeležili največjo dinamiko celičnih delitev, v povprečju 0,68 celic/dan, na Ravniku 0,51 celic/dan in na Sorškem polju 0,35 celic/dan. Izračunana končna širina ksilemske branike 2003 je bila pri vzorčnih drevesih na Ravniku okoli 70 celic, na Pokljuki 42 celic in na Sorškem polju 26 celic. S pomočjo parametrov Gompertzove funkcije smo pri vzorčnih drevesih iz Ravnika in Pokljuke ocenili maksimalno celično produkcijo okoli solsticija (148. oziroma 164. Julijanski dan), na Sorškem polju pa več kot mesec dni prej (136. Julijanski dan). Julijanski dan predstavlja število dni od 1. januarja istega leta. Obdobje maksimalne celične produkcije je v normalnih razmerah okoli solsticija (172. Julijanski dan), v neugodnih rastnih sezonah pa je lahko zamaknjeno proti začetku vegetacije.

Korelacijski koeficienti linearne regresije med povprečnimi tedenskimi prirastki celic ranega lesa in temperaturnimi spremenljivkami so bili ne glede na rastišče vedno pozitivni, nastanek kasnega lesa pa je bil vselej v negativni korelaciji s temperaturami. Previsoke temperature v drugi polovici vegetacije niso ugodno vplivale na celično produkcijo. Časovni zamiki in trajanje posameznih faz diferenciacije ni bilo neposredno povezano s temperaturnimi spremembami. Koeficienti linearne regresije med kumulativno tedensko vsoto padavin in tedenskimi prirastki celic na nobenem rastišču niso pokazali statistično značilnih korelacij.

Izkazalo se je, da je z eksperimentalno nadzorovano temperaturo mogoče vplivati na redno kambijevo aktivnost smreke. Ogrevanje dela debela smreke v zaključni fazi dormantnega obdobja (konec marca) v letu 2004 je sprožilo zgodnejšo reaktivacijo kambija in stimuliralo celično diferenciacijo. Kambijeva aktivnost se je pričela najprej na floemski, kasneje pa tudi na ksilemski strani. Enomesečno ogrevanje ni vplivalo na širino ali strukturo ksilemskih in floemskih branik. Delež kasnega lesa je pri ogrevanju in kontrolnem vzorcu znašal okoli 40%. Eksperimentalno ogrevanje dela debela smreke tekom celotne vegetacije 2005 je povečalo celično produkcijo v prvi polovici rastne sezone. Redna kambijeva delitvena aktivnost se je ob koncu vegetacije zaradi kontinuirano povišanih temperatur le nekoliko podaljšala. Zaključila se je v prvi polovici avgusta. Ksilemska branika 2005 ogrevanega vzorca je bila nekoliko širša (35 slojev celic) v primerjavi s kontrolo (27 slojev celic).

Pri enomesečnem lokalnem ohlajanju debela smreke na višku vegetacije (sredina junija) 2004 je bil odziv kambija viden šele po 30 dneh, in sicer le na ksilemski strani. Zaradi znižanih temperatur je začel predčasno nastajati kasni les. Obenem se je zmanjšalo število

kambijevih celic na 4 do 5 slojev, kar je bilo značilno za dormanten kambij. Ohlajanje je sprožilo hitrejši zaključek kambijeve aktivnosti, kar se je odražalo v zmanjšanem deležu kasnega lesa (20%) v primerjavi s kontrolo. Navkljub nižanim temperaturam je struktura in širina floemske branike 2004 ostala nespremenjena. Zaradi stalno nižanih temperatur tekom celotne vegetacije 2005 se je kambijeva aktivnost skrajšala približno za 3 tedne. Poleg tega je bila zmanjšana tudi stopnja celične produkcije, zlasti v prvi polovici rastne sezone. Ksilemski prirastek je bil zmanjšan približno za tretjino (na 10 slojev celic). Ozka ksilemska branika 2005 je odražala tipično strukturo lesa dreves, ki rastejo v stresnih razmerah. Prve popolnoma oblikovane traheide ranega lesa smo zasledili več kot mesec dni kasneje v primerjavi s kontrolo. S temperaturo je mogoče vplivati na ksilogenezo pri navadni smreki, vendar pa se njen vpliv tekom vegetacije spreminja. Kaže, da so ugodne temperature ključne za kambijevo aktivnost in razvoj celic predvsem v prvi polovici rastne sezone, medtem ko kasneje prevladajo drugi dejavniki.

Enomesečno ogrevanje oziroma ohlajanje dela debla smreke v letu 2004 ni vplivalo na širino in anatomsko zgradbo floemskih branik. Ogrevanje in ohlajanje tekom celotne vegetacije 2005 pa je vplivalo na strukturo in širino floemskih prirastkov. Zgradba ranega floema je ostala nespremenjena (3 do 4 sloji sitastih celic z velikimi radialnimi dimenzijami in tankimi celičnimi stenami), medtem ko je bilo število sitastih celic kasnega floema pri hlajenem vzorcu zmanjšano (na 2 do 3 sloje), pri ogrevanem pa povečano (na 7 do 8 slojev) v primerjavi s kontrolo (4 do 5 sloji). Tangencialni pas aksialnega parenhima, ki razmejuje rani in kasni floem, pri hlajenem vzorcu ni bil sklenjen, kar je značilno za drevesa, ki rastejo v stresnih razmerah.

Lokalno ogrevanje oziroma hlajenje debla smreke v letu 2004 ni vplivalo na kambijevo aktivnost in celično diferenciacijo izven tretiranega dela. Prenos temperature iz izoliranega dela je bil po deblu je zanemarljiv, saj so temperaturne razlike v kambiju pod in nad sistemom znašale le okoli $\pm 2^{\circ}\text{C}$. Temperature v kambiju so tudi v izoliranem delu debla nihale sorazmerno z zunanjo temperaturo, vendar je bil odziv postopen in ne nenaden. Praviloma so na temperaturo v kambiju vplivale dolgoročno nižane ali zvišane temperature zraka.

Ultrastrukturne in topokemijske raziskave lesnega tkiva ogrevanega, hlajenega in kontrolnega vzorca v letu 2004 niso pokazale nobenih razlik v procesu odlaganja sekundarne celične stene in lignifikacije ter vsebnosti lignina v posameznih področjih celične stene. Lignifikacija se je začela v celičnih vogalih in združeni srednji lameli, nato pa se je postopoma širila v sloje sekundarne celične stene centripetalno proti lumnu. Največ lignina je bilo v celičnih vogalih in združeni srednji lameli, najmanj pa v S2 sloju sekundarne stene.

7 SUMMARY

Wood or secondary xylem is formed in a complex process of xylogenesis which begins with periclinal cell divisions in a vascular cambium. In a process of differentiation newly formed tracheids specialize for water conduction and mechanical transport. Annual xylem growth ring widths, structure and properties depend on dynamics and duration of individual phases of xylogenesis. Beside endogenous factors, all these processes are regulated by environmental factors. Repeated sampling of cambial and xylem tissue from trees during growing season is one of the methods for investigating mechanism of xylem growth ring formation. Effect of environmental factors can be followed in experiments with trees growing under controlled or natural conditions. Norway spruce (*Picea abies* Karst.) and silver fir (*Abies alba* Mill.) are very important forest species in Slovenia but yet no studies have focused on the effect of precipitation and temperature on seasonal dynamics of xylem formation in these species.

The purpose of the thesis was to estimate the feasibility of the pinning and intact tissue sampling methods for investigations of the seasonal dynamics of the xylem growth ring formation in Norway spruce (*Picea abies* Karst.) and silver fir (*Abies alba* Mill) in the vegetation period 2003. In addition, we examined the anatomical response of Norway spruce to pin insertion. From obtained data, we prepared model curves of radial growth of investigated trees in the year 2003 for each plot using the Gompertz function. To assess the relationship between average weekly cell production and temperature and precipitation, linear regression analyses were performed. Finally, we evaluated the response of dormant and active cambium to experimental heating and cooling of stem portion of adult Norway spruce trees in Ljubljana in the years 2004 and 2005.

For investigations of seasonal dynamics of xylem growth ring formation, we selected 4 apparently healthy silver fir trees, 150-180 years old, with a mean stem diameter at breast height of approximately 50 cm. The forest stand was located at Ravnik (500-700 m a.s.l.), about 50 km SW of Ljubljana. Sampling of Norway spruce trees were performed at Sorško polje (350 m a.s.l.) and Pokljuka (1200 m a.s.l.), about 20 and 100 km NW of Ljubljana. On each site, we selected 9 dominant and co-dominant trees, aged about 70 years, with a mean stem diameter at breast height of approximately 30 cm at Sorško polje and 37 cm at Pokljuka. On each plot, we took samples of intact tissue (1 x 1 x 3 cm³), containing inner phloem, cambium and outer xylem, from 4 living trees at breast height. Weekly sampling was performed during the entire growth season, from 23 April till 12 November 2003. Samples were fixed in FAA (formaldehyde-ethanol-acetic acid) and dehydrated in a graded series of ethanol. In addition, we carried out pinning experiment at 10 Norway spruce trees, 5 at Sorško polje and 5 at Pokljuka. Six pinning holes were set in a semi-helical pattern along the stem of each tree always on the same date using a needle that was 1.75 mm at its thickest part. At the end of the experiment the trees were felled. Samples containing wounded tissue were removed, fixed in FAA and dehydrated.

For both experiments, permanent transverse sections for light microscopy were prepared with Leica SM 2000R sliding microtome. Sections were double-stained with safranin and astra blue, mounted on glass slides using Euparal and examined with a Nikon Eclipse 800 light microscope (bright field and polarized light) and Lucia G 4.8. image analysis system.

For processing of the data and further statistical analysis we used Microsoft Excel and Statgraphics programmes.

For the controlled experiments of cooling and heating in the year 2004, three 70-year old Norway spruce test trees (DBH = 35 cm) were selected in an urban Norway spruce/beech forest at Rožnik (323 m a.s.l.) in Ljubljana. One adult tree was used for the heating experiment and one for the cool treatment. The third tree was not treated and served as a control. The distance among the test trees was about 10 m. Localized heat treatment was applied to the tree prior to the beginning of the regular cambial activity, i.e. from 29 March till 3 May 2004. The stem portion of the first Norway spruce was heated with an electric heat cable which was wrapped around 1 meter of the length of the stem. Insulation material was wrapped around the electric heat cable to prevent energy loss. The temperature between the bark and the insulation was adjusted to 23-25°C, and monitored daily with a thermometer sensor. Localized cooling of the stem of the second experimental spruce was performed between 14 June 2004 and 20 July 2004. A circulating pump pushed cooled water through copper tubes, which were wrapped around 1 meter of the length of the stem. The system was insulated, as well. The temperature between the stem and the insulation was set to 9-11°C, monitored and regulated daily with a capillary thermostat. Blocks of tissue (10 x 10 x 30 mm³) containing inner phloem, cambium and outer xylem were taken at the beginning of each of the treatments and thereafter at 10-day intervals. Samples were taken at breast height (1.3 m above ground) from treated trees and the control tree. Additionally, samples were taken approximately 10 cm above the treated and insulated portions of the stems and on 12 December 2004 (winter). After sampling, blocks of tissue were immediately fixed in FAA and, after one week, dehydrated in a graded series of ethanol. For light microscopy, permanent cross sections of 25 µm in thickness were prepared on a microtome Leica SM 2000R, stained with safranin and astra blue and mounted in Euparal. A Nikon Eclipse 800E light microscope was used for anatomical observations. In addition, semi-thin sections of about 1 µm in thickness were prepared with an ultramicrotome Ultracut S and stained with 1% toluidine blue solution. For this purpose, samples for TEM and UMSP were dehydrated in a graded series of ethanol and water-free acetone and embedded in Spurr's epoxy resin. For TEM, ultrathin transverse sections (80-100 nm thick) were stained with potassium permanganate. Examination was carried out with a Philips CM 12 TEM at accelerating voltages of 40 or 60 kV to enhance contrast. For UV spectroscopic measurements, unstained transverse sections (1 µm thick) were prepared from the epoxy resin embedded samples, transferred to quartz slides, immersed in a drop of non-UV absorbing glycerine and covered with quartz cover slips. Cell wall analyses were performed using a UV-microspectrophotometer (UMSP 80, Zeiss) equipped with a scanning stage enabling the determination of image profiles at defined wavelength. The specimens were first conventionally investigated by point measurements with a spot size of 1 µm² using the programme LAMWIN[®] (Zeiss). The spectra were taken at wavelengths from 240 to 400 nm in 2 nm steps. The measurements were automatically repeated 50 times for each point analysis. Additionally, specimens were scanned with a defined wavelength of 280 nm for conifer lignin, using the scan program APAMOS[®] (Zeiss). The scan programme digitises rectangular fields with a local geometrical resolution of 0.25 µm² and a photometrical resolution of 4096 grey scale levels, which are converted in 14 basic colours to visualize the absorbance intensities.

For the controlled experiments of cooling and heating in the year 2005, another three 70-year old Norway spruce test trees (DBH = 35 cm) were selected in an urban Norway spruce/beech forest Rožnik in Ljubljana. One adult tree was used for the heating experiment and one for the cool treatment. The third tree was not treated and served as a control. Distance among the test trees was about 15 m. We started with both experiments on 26 April 2005. We finished cool treatment on 20 September and heat-treatment on 11 October 2005. Temperature of heating was set to 23-25°C and cooling to 9-11°C, similar as in previous experiment. We built both systems in the same way as we did in the year 2004. Blocks of intact tissue were taken at the beginning of each of the treatments and thereafter at 21-day intervals. Sampling was performed at breast height (1.3 m above ground) from treated trees and the control tree. At the same time, we measured the temperature of the cambial tissue in the isolated stem portion, and below and above it using thermo-cables. After sampling, blocks of tissue were immediately fixed in FAA and, after one week, dehydrated in a graded series of ethanol and acetone and embedded in paraffin. For light microscopy, permanent cross sections of 13 µm in thickness were prepared on a Leica RM 2245 rotary microtome, stained with safranin and astra blue and mounted in Euparal. A Nikon Eclipse 800E light microscope was used for anatomical observations.

Our results showed that for investigations of the dynamics of the xylem growth ring formation in Norway spruce and silver fir, both the pinning and intact tissue sampling method proved to be appropriate. Pin induced desiccation of the xylem tissue, necrosis of cambial cells and undifferentiated tracheids, formation of the callus, traumatic resin canals and wound-wood. Wavy shape of the xylem growth ring above the callus was a result of locally increased xylem production after the injury. The border between cambial cells and cells in postcambial growth that were located inside the callus defined the xylem increment realized by the time of wounding. Traumatic resin canals were not reliable marker for xylem increment realized by the time of pinning. Intact tissue sampling method was found to be more suitable for investigations of the individual phases of xylogenesis due to well preserved cells, including cambial ones. This method was useful for studying the seasonal dynamics of the cell production on the phloem side, as well.

Cambial activity started first in investigated silver firs at Ravnik, at the end of April 2003. At that time, the number of cambial cells doubled. The onset of the cambial cell divisions occurred few days later in Norway spruce at Sorško polje, and approximately 2 weeks later in Norway spruce at Pokljuka. The delay in the resumption of the cell divisions at sub-Alpine site Pokljuka was presumably linked to lower air temperatures at the beginning of May. Time lags of successive phases of xylogenesis did not vary with regard to different species or growth sites. Synthesis of the secondary wall in early wood cells began 2 weeks after the postcambial growth. Initial early wood tracheids needed 4 weeks for full development and terminal late wood tracheids 6 to 8 weeks irrespective of the growth site or cessation of the cambial activity. At all 3 plots, around 70% of the total xylem growth ring 2003 was formed when transition from early to late wood took place. Divisions in the cambium first ceased at Sorško polje (end of June), than at Pokljuka (mid-August) and finally at Ravnik (end of August). Process of differentiation was at all 3 plots finished by mid-November. Duration of the cambial activity differed among sites. Duration of the radial growth of trees varied among sites. In Norway spruce trees at Sorško polje growth season 2003 lasted 2.5 months, in Norway spruce trees at Pokljuka 2 months and in silver

firs at Ravnik 4.5 months. Short growth period at Sorško polje in 2003 seems to be connected with high temperatures and lack of precipitation.

For all 3 plots, we prepared model curves describing radial growth of trees in the growth season 2003. We used Gompertz function for estimating the trend of xylem growth ring development of selected trees. At all 3 plots, fitting of the Gompertz curve to the averaged counted number of cells was above 95%. Higher deviation of the actual data from the calculated curve was detected at the end of vegetation when the rate of cell divisions in the cambium slowed down. At that time, variability in the number of xylem cells around the stem circumference of the individual tree was much expressed. The highest dynamics of cell divisions was recorded at Pokljuka, on average 0.68 cell/day, than at Ravnik 0.51 cells/day and the lowest at Sorško polje, 0.35 cells/day. Calculated total number of cells in the xylem growth ring 2003 was estimated to 70 cells at Ravnik, to 42 cells at Pokljuka and to 26 cells at Sorško polje. Maximum cell production was in experimental trees at Ravnik and Pokljuka around summer solstice (148th and 164th Julian day, respectively), but more than a month earlier at Sorško polje (136th Julian day). Julian day represents number of days from 1 January of the same year. In normal growing conditions, the period of maximum cell production is around summer solstice (21 June). However, in unfavourable conditions the period of the highest cell production could be shifted towards the beginning of the growing season.

According to calculated correlation coefficients between average weekly xylem increments and temperature variables using the linear regression equation, the early wood formation was in positive correlation with the temperatures irrespective of growth site. On the contrary, the late wood formation was negatively correlated with the temperature variables. It seems that high temperatures were not favourable for cell production in the second part of the growing season. Duration of the individual phases of differentiation was not directly related with changes in temperature. At all plots, no significant correlations were detected between weekly cumulative sum of precipitation and average weekly xylem increment.

We demonstrated that application of high or low temperatures caused alterations in regular cambial activity of Norway spruce. The heating of the stem portion of Norway spruce stimulated divisions in the cambium and cell differentiation in the final stages of dormancy at the end of March 2004. Cambial activity started first on the phloem side and later on the xylem side, as well. Heating of one month in 2004 did not influence the widths and the structure of the xylem and phloem growth rings. Late wood portion was comparable in control and heated sample, i.e. around 40%. Experimental heating of the stem portion of Norway spruce during the entire growing season 2005 increased cell production in the first part of the growing season, but did not considerably prolonged cambial activity. Divisions in the cambium stopped in the first part of August, a few days later than in the control tree. The number of cells of accomplished xylem growth ring 2005 was slightly higher in the heated sample (35 layers of cells) comparing to the control (27 layers of cells).

The response of the active cambium and its derivatives to the monthly cooling of the stem portion of Norway spruce in the year 2004 was less pronounced and was not visible on the xylem side until 30th day of the experiment. Cool treatment caused earlier formation of late wood. The number of cell in the cambium decreased to 4 or 5 cell layers, which was

typical of dormant cambium. The drop in temperatures presumably shortened cambial activity, resulting in a lower portion of late wood in the current xylem increment (20%). Cool treatment did not influence the widths and the structure of the phloem growth increment 2004. Cooling experiment during the entire growth season 2005 shortened regular cambial activity for approximately 3 weeks in comparison with the control tree. In addition, the rate of the divisions in the cambium was slowed down, peculiarly at the beginning of the growing season. Xylem increment was reduced for about one third (to 10 layers of cells). Narrow xylem growth rings are usual sign of trees for growing in stressful conditions. First fully developed tracheids of early wood were detected more than one month later than in control. Temperature treatment can cause alterations in regular cambial activity in Norway spruce, but its influence varies over the vegetation period. It seems that temperatures are crucial for cambial activity and cell development at the beginning of the growing season while in the second part prevail other factors.

Monthly cooling and heating of stem portion of Norway spruce in 2004 did not influence the widths and anatomical structure of the phloem increments. On the contrary, long-term experiments in the year 2005 affected the structure and the widths of the phloem growth increments. The structure of early phloem was comparable in cooled, heated and control samples. It was composed of 3 to 4 layers of early phloem sieve cells with wide radial dimensions and thin cell walls. The tangential band of axial parenchyma cells separating early and late phloem was not continuous in the cooled sample which is typical for trees growing under stressful conditions. The number of late phloem cells was in cool-treated sample reduced (2 to 3 layers) and in heat-treated sample increased (7 to 8 layers) comparing to the control sample (4 to 5 layers).

Locally heating or cooling of the stem portion did not influence the cambial activity and cell differentiation above the treated area. Earlier resumption of the cambial cell divisions or earlier late wood formation was restricted to the treated region. Measurements of the temperature in the cambial region of the isolated stem portion, and 10 cm below and above it in the year 2005 showed only negligible transfer of the temperature along the stem from the site of its application. The temperature above and below the treated stem portion deviated on average $\pm 2^{\circ}\text{C}$. The temperature in the cambial region oscillated proportionally to the air temperatures with certain delay in regard to oscillations of the air temperatures. In general, the temperature in the cambium was affected by long-term rise or drop in air temperatures.

At the ultrastructural and topochemical levels, we observed no alterations in the pattern of secondary cell wall formation, lignification or lignin structure within the cell wall regions of cooled, heated and control samples in the year 2004. Lignification started in the cell corners and compound middle lamellae, and then gradually spread into the layers of the secondary cell wall in the centripetal direction towards the cell lumina. The highest lignin content was detected in the cell corners and compound middle lamellae, but the lowest in the S2 layer of the secondary wall.

The doctoral thesis has been prepared to conclude the postgraduate study of wood science and technology. The sampling in the field, the sample and section preparation for light microscopy with rotary and sliding microtome, measurements with image analysis system

and statistical analysis were done at The Chair of Wood Science, Department of Wood Science and Technology, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana. Infiltration of samples with epoxy resin was performed in The Laboratory for Histology and Electron Microscopy, Department of Biology, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana. Preparation and staining of ultrathin sections for transmission electron microscopy and semi-thin sections for light and UV-microspectrophotometry with ultramicrotome and UMSP analyses were performed at The Federal Research Centre for Forestry and Forest Products in Hamburg and Department of Wood Biology and Wood Protection, University of Hamburg.

The supervisor of the thesis was Prof. Dr. Katarina Čufar and the co-supervisor was Doc. Dr. Primož Oven.

Biotechnical Faculty appointed members of the commission for evaluation of the thesis and defence:

Prof. Dr. Marina Dermastia

Prof. Dr. Jasna Štrus

Prof. Dr. Dieter Eckstein

The doctoral work was funded by the Slovenian Research Agency (ARRS), and the Ministry of Higher Education, Science and Technology (MVŠZT), European Project Predicting Impacts on Natural Ecotones (PINE V. FP Contract No.: EVK2-CT-2002-00136), COST Action E 28 (Genosilva: European Forest Genomics Network) as STSM (Short-Term Scientific Missions), World Federation of Scientists (WFS) and the Slovenian Science Foundation (SFZ).

8 VIRI

1. Adler E. 1977. Lignin chemistry – past, present and future. *Wood Science and Technology*, 11: 169-218
2. Alpert P., Simms E.L. 2002. The relative advantages of plasticity and fixity in different environments: when is it good for a plant to adjust? *Evolutionary Ecology*, 16: 285-297
3. Aloni R., Feigenbaum P., Kalev N., Rozovsky S. 2000. Hormonal control of vascular differentiation in plants: the physiological basis of cambium ontogeny and xylem evolution. V: *Cell and Molecular Biology of Wood Formation*. Savidge R.A., Barnett J.R., Napier R. (eds.). BIOS Scientific Publishers Limited, Oxford, UK: 223-236
4. Antonova G.F., Stasova V.V. 1993. Effects of environmental factors on wood formation in Scots pine stems. *Trees*, 7: 214-219
5. Antonova G.F., Cherkashin V.P., Stasova V.V., Varaksina T.N. 1995. Daily dynamics in xylem cell radial growth of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) *Trees*, 10: 24-30
6. Antonova G.F., Stasova V.V. 1997. Effects of environmental factors on wood formation in larch (*Larix decidua* Ldb.) stems. *Trees*, 11: 462-468
7. Atalla U.P., Agarwal R.H. 1986. In-situ raman microprobe studies of plant cell walls: Macromolecular organisation and compositional variability in the secondary wall of *Picea mariana* (Mill.) B.S.P. *Planta*, 169: 325-332
8. 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
9. Barlow P.W., Brain P., Powers S.J. 2002. Estimation of directional division frequencies in vascular cambium and in marginal meristematic cell of plants. *Cell Proliferation*, 35: 49-68
10. Barnett J.R. 1971. Winter activity in the cambium of *Pinus radiata*. *New Zealand Journal of Forestry Science*, 1, 2: 208-222
11. Barnett J.R., Miller H. 1994. The effect of applied heat on graft union formation in dormant *Picea sitchensis* (Bong.) Carr. *Journal of Experimental Botany*, 45, 270: 135-143
12. Bauch J. 1986. Characteristics and response of wood in declining trees from forest affected by pollution. *IAWA Bulletin n.s.*, 7, 4: 269-276
13. Bäucker E., Bues, C., Vogel, M. 1998. Radial growth dynamics of spruce (*Picea abies*) measured by micro-cores. *IAWA Journal*, 3: 301-309
14. Bigler C., Bugmann H. 2004. Assessing the performance of theoretical and empirical tree mortality models using tree-ring series of Norway spruce. *Ecological Modelling*, 174: 225-239
15. Bigler C., Gričar J., Bugmann H., Čufar K. 2004. Growth patterns as indicators of impending tree death in silver fir. *Forest Ecology and Management*, 199: 183-190
16. Bland D.E., Foster R.C., Logan A.F. 1971. The mechanism of permanganate and osmium tetroxide fixation and the distribution of lignin in the cell wall of *Pinus radiata*. *Holzforschung*, 25, 5: 137-143
17. Boncina A., Diaci J., Cencic L. 2002. Comparison of the two main types of selection forests in Slovenia: distribution, site conditions, stand structure, regeneration and management. *Forestry*, 75, 4: 365-373
18. Boncina A., Gasperic F., Diaci J. 2003. Long-term changes in tree species composition in the Dinaric mountain forests of Slovenia. *The Forestry Chronicle*, 79, 2: 227-232
19. Boudet A.M. 2000. Lignins and lignification: Selected issues. *Plant Physiology and Biochemistry*, 38, 1-2: 81-96
20. Boutelje J., Eriksson I. 1984. Analysis of lignin in fragments from thermomechanical spruce pulp by ultraviolet microscopy. *Holzforschung*, 38: 249-252

21. Brändström J. 2001. Micro- and ultrastructural aspects of Norway spruce tracheids: a review. *IAWA Journal*, 22, 4: 333-353
22. Brus R. 2004. Drevesne vrste na Slovenskem. Mladinska knjiga Založba, Ljubljana: 399 str.
23. Burlat V., Kwon M., Davin L.B., Lewis N.G. 2001. Dirigent proteins and dirigent sites in lignifying tissues. *Phytochemistry*, 57: 883-897
24. Camarero J.J., Guerrero-Campo J., Gutiérrez E. 1998. Tree-ring growth and structure of *Pinus uncinata* and *Pinus sylvestris* in the Central Spanish Pyrenees. *Arctic and Alpine Research*, 30: 1-10
25. Cateson 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, 1: 91-101
26. Chaffey N., Barlow P., Barnett J. 1997. Cortical microtubules rearrange during differentiation of vascular cambial derivatives, microfilaments do not. *Trees*, 11: 333-341
27. Chaffey N.J., Barlow P.W., Barnett J.R. 1998. Seasonal cycle of cell wall structure is accompanied by cyclical rearrangement of cortical microtubules in fusiform cambial cells within taproots of *Aesculus hippocastaneum* (Hippocastanaceae). *New Phytologist*, 139: 623-635
28. Chaffey N. 1999. Cambium: old challenges – new opportunities. *Trees*, 13: 138-151
29. Chaffey N. 2002. Introduction. V: Wood formation in trees. Cell and molecular biology techniques. Chaffey N (ed.) Taylor & Francis, London and New York: 1-8
30. Clark N.A., Wynne R.H., Schmoldt D.L. 2000. A review of past research on dendrometers. *Forest Science*, 46, 4: 570-576
31. Coté W.A. 1981. Ultrastructure – critical domain for wood behaviour. *Wood Science and Technology*, 15: 1-29
32. Čuden A.R. 2005. Raziskave kambijeve aktivnosti in nastajanja lesa pri jelki (*Abies alba* Mill.) z metodo vzorčenja intaktnih tkiv. Diplomski naloga. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo: 44 str.
33. Čufar K. 1990. Električna upornost tkiv, prirastne značilnosti in odziv na poškodbe pri zdravih in prizadetih jelkah. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo: 167 str.
34. Čufar K. 1997. Umiranje jelke (*Abies alba* Mill.) v Sloveniji: pregled raziskav katedre za tehnologijo lesa. *Zbornik gozdarstva in lesarstva*, 52: 165-186
35. Čufar K. 2001. Opisi lesnih vrst. Študijsko gradivo. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo: 55 str.
36. Davin L.B., Lewis N.G. 2000. Dirigent proteins and dirigent sites explain the mystery of specificity of radical precursor coupling in lignan and lignin biosynthesis. *Plant Physiology*, 123: 453-461
37. Demšar B. 2004. Nastanek lesa pri smreki (*Picea abies* (L.) Karst.) iz avstrijskih Alp. Diplomski naloga. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo: 55 str.
38. Dence C.W., Lin S.Y. 1992. Introduction. V: Methods in lignin chemistry. Lin S.Y., Dence C.W. (eds.). Springer-Verlag, Berlin Heidelberg: 3-19
39. Dengler N.G. 2001. Regulation of vascular development. *Journal of Plant Growth Regulation*, 20: 1-13
40. Denne M.P., Dodd R.S. 1981. The environmental control of xylem differentiation. V: Barnett J.R. (ed.) *Xylem Cell Development*. Castle House Publications LTD: 236-255

41. Deslauriers A. 2003. Dynamique de la croissance radiale et influence météorologique quotidienne chez le sapin baumier (*Abies balsamea* (L.) Mill.) en forêt boréale. Thèse présentée à l'université du Québec à Chicoutimi comme exigence partielle du doctorat en sciences de l'environnement (doktorska disertacija, v angleščini), Université du Québec à Chicoutimi, Chicoutimi, Canada: 142 str.
42. Deslauriers A., Morin H., Urbinati C., Carrer M. 2003a. Daily weather response of balsam fir (*Abies balsamea* (L.) Mill.) stem radius increment from denrometer analysis in the boreal forest of Quebec (Canada). *Trees*, 17, 6: 477-484
43. Deslauriers A., Morin H., Begin Y. 2003b. Cellular phenology of annual ring formation of *Abies balsamea* in the Quebec boreal forest (Canada). *Canadian Journal of Forest Research*, 33: 190-200
44. Deslauriers A., Morin H. 2005. Intra-annual tracheid production in balsam fir stems and the effect of meteorological variables. *Trees*, 19: 402-408
45. Deslauriers A., Rossi S., Anfodillo T. 2005. Monitoring of intra-annual tree growth with dendrometers: what do we really measure? V: Intra-annual analysis of wood formation: Workshop at the Centro studi per l'ambiente Alpino San Vito di Cadore, Belluno, 2-5 October 2005. San Vito di Cadore: Università degli studi di Padova, Dipartimento territorio e sistemi agro-forestali: 5-6
46. Dinwoodie J. M. 2000. Timber. Its nature and behavior. Second edition. E & FN SPON, London, New York: 257 str.
47. Dobbertin M. 2005. Tree growth as indicator of tree vitality and tree reaction to environmental stress: a review. *European Journal of Forest Research*, 124: 319-333
48. Donaldson L.A. 1985. Within- and between-tree variation in lignin concentration in the tracheid cell wall of *Pinus radiata*. *New Zealand Journal of Forestry Science*, 15, 3: 361-369
49. Donaldson, L.A., 1986. Between-tree variation in lignin concentration in *Pinus radiata* tracheids with growth rate, stem eccentricity, site and silvicultural treatment. *New Zealand Journal of Forestry Science*, 16: 118-123
50. Donaldson L.A. 1987. S3 lignin concentration in radiata pine tracheids. *Wood Science and Technology*, 21: 227-234
51. Donaldson L.A. 1991. Seasonal changes in lignin distribution during tracheid development in *Pinus radiata*. *Wood Science and Technology*, 25: 15-24
52. Donaldson L.A. 1992. Lignin distribution during latewood formation in *Pinus radiata*. *IAWA Bulletin n.s.*, 12, 4: 381-387
53. Donaldson L.A. 1993. Lignin distribution in wood from a progeny trial of genetically selected *Pinus radiata* D. Don. *Wood Science and Technology*, 27: 391-395
54. Donaldson L.A. 1994. Mechanical constraints on lignin deposition during lignification. *Wood Science and Technology*, 28: 111-118
55. Donaldson L.A., Croucher M., Uprichard J.M. 1997. Clonal variation of wood chemistry variables in radiata pine (*Pinus radiata* D. Don.) wood. *Holzforschung*, 51: 537-542
56. Donaldson L.A. 2001. Lignification and lignin topochemistry – an ultrastructural view. *Phytochemistry*, 57: 859-873
57. Dorado I., Gričar J., Čufar K., De Luis M., Raventós Bonvehi J. 2005. Annual radial growth rhythm of *Pinus halepensis* trees from dry-semiarid sites in Spain - first results. V: Eurodendro 2005: international conference of dendrochronology: September, 28th-October 2nd 2005, Viterbo, Italy. Viterbo, Sette citta: 16
58. Eckstein D., Greve U., Frühwald A. 1981. Anatomische und mechanisch-technologische Untersuchungen am Holz einer SO₂-geschädigten Fichte und Tanne. *Holz als Roh- und Werkstoff*, 39: 477-487

59. Eklund L., Klintborg A. 2000. Ethylene, oxygen and carbon dioxide in woody stems during growth and dormancy. V: Cell and Molecular Biology of Wood Formation. Savidge R.A., Barnett J.R., Napier R. (eds.). BIOS Scientific Publishers Limited, Oxford, UK: 43-56
60. Fengel D., Schutz H. 1986. Chemical studies on the wood of declining conifers. IAWA Bulletin n.s., 7, 4: 371-373
61. Fengel D., Wegener G. 1989. Wood: chemistry, ultrastructure, reactions. Berlin, Walter de Gruyter: 613 str.
62. Fergus B.J., Procter A.R., Scott J.A.N., Goring D.A.I. 1969. The distribution of lignin in Spruce wood as determined by ultraviolet microscopy. Wood Science and Technology, 3: 117-138
63. Fink S. 1986. Microscopical investigations on wood formation and function in diseased trees. IAWA Bulletin n.s., 7, 4: 351-355
64. Ford E.D., Robards A.W., Piney M.D. 1978. Influence of environmental factors on cell production and differentiation in the earlywood of *Picea sitchensis*. Annals of Botany, 42: 683-692
65. Forster T., Schweingruber F.H., Denneler B. 2000. Increment puncher: a tool for extracting small cores of wood and bark from living trees. IAWA Journal, 21: 169-180
66. Freudenberg K., Sudhu G.S. 1961. Zur Kenntnis des Lignins der Buche und der Fichte. Holzforschung, 15: 33-39
67. Frühwald A. 1986. Technological properties of wood from trees in polluted regions. IAWA Bulletin n.s., 7, 4: 389-398
68. Fukushima K., Terashima N. 1991. Heterogeneity in formation of lignin. XIV. Formation and structure of lignin in differentiating xylem of *Ginkgo biloba*. Holzforschung, 45: 87-94
69. Fukuzawa K., Imagawa H. 1981. Quantitative analysis of lignin using an UV microscopic image analyser. Variation within one growth increment. Wood Science and Technology, 15: 45-55
70. Fukuzawa K. 1992. Ultraviolet microscopy. V: Methods in lignin chemistry. Lin S.Y., Dence C.W. (eds.). Springer-Verlag, Berlin Heidelberg: 133-145
71. Fujita M., Harada H. 1991. Ultrastructure and formation of wood cell wall. V: David N.-S.Hon, Shiraishi N. (eds.) Wood and cellulosic chemistry. Marcel Dekker Inc., New York: 3-58
72. Gang D., Costa M.A., Fujita M., Dinkova-Kostova A.T., Wang H.-B., Burlat V., Martin W., Sarkanen S., Davin L.B., Lewis N.G. 1999. Regiochemical control of monolignol radical coupling: a new paradigm for lignin and lignan biosynthesis. Chemistry & Biology, 6, 3: 143-151
73. Gindl W., Grabner M. 2000. Characteristics of spruce (*Picea abies* (L.) Karst) latewood formed under abnormally low temperatures. Holzforschung, 54: 9-11
74. Gindl W., Grabner M., Wimmer R. 2000. The influence of temperature on latewood lignin content in treeline Norway spruce compared with maximum density and ring width. Trees, 14: 409-414
75. Gindl W., Grabner M., Wimmer R. 2001. Effects of altitude on tracheid differentiation and lignification of Norway spruce. Canadian Journal of Botany, 79: 815-821
76. Goodhew P.J., Humpreys J., Beanland R. 2001. Electron microscopy and analysis. Third edition. Taylor & Francis, London New York: 251 str.
77. Gregory R.A., Wilson B.F. 1968. A comparison of cambial activity of white spruce in Alaska and New England. Canadian Journal of Botany, 46: 733-734
78. Gričar J. 2001. Lignifikacija traheid zdravih in prizadetih jelk (*Abies alba*). Diplomsko naloga. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo: 69 str.
79. Gričar J., Straže A., Čufar K. 2003a. Differentiation of the last formed tracheids in wood of silver firs (*Abies alba*) having various cambial productivity. Zbornik gozdarstva in lesarstva, 70: 87-100

80. Gričar J., Čufar K., Schmitt U. 2003b. Diferenciacija terminalnih traheid kasnega lesa pri navadni jelki v dormantnem obdobju. *Les*, 55, 12: 412-415
81. Gričar J., Oven P., Zupančič M., Čufar K. 2004. Seasonal dynamics of annual xylem growth ring formation in silver fir (*Abies alba*). V: Abstracts : Eurodendro 2004. Rendsburg: Eurodendro, 2004: 19
82. Gričar J., Čufar K., Oven P., Schmitt U. 2005a. Differentiation of terminal latewood tracheids in silver fir during autumn. *Annals of Botany*, 95: 959-965
83. Gričar J., Oven P., Čufar K. 2005b. Seasonal dynamics of secondary phloem growth ring formation in Norway spruce (*Picea abies*) and silver fir (*Abies alba*). V: Eurodendro 2005: international conference of dendrochronology: September, 28th-October 2nd 2005, Viterbo, Italy. Viterbo, Sette citta: 20-21
84. Gričar J., Zupančič M., Čufar K., Oven P. 2005c. Xylem formation in Norway spruce at two growth sites in Slovenia in years 2002 and 2003. V: Eurodendro 2005: international conference of dendrochronology : September, 28th-October 2nd 2005, Viterbo, Italy. Viterbo, Sette citta: 51
85. Gričar J., Čufar K., Oven P. 2006a. Sezonska dinamika ksilogeneze in floemogeneze pri navadni jelki (*Abies alba* Mill), Zbornik gozdarstva in lesarstva, 78: 57-68
86. Gričar J., Zupančič M., Čufar K., Koch G., Schmitt U., Oven P. 2006b. Effect of local heating and cooling on cambial activity and cell differentiation in stem of Norway spruce. *Annals of Botany*, 97: 943-951
87. Grosser D. 1977. Die Hölzer Mitteleuropas. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York: 288 str.
88. Grünwald C., Ruel K., Schmitt U. 2002a. Differentiation of xylem cells in *rolC* transgenic aspen trees – a study of secondary wall development. *Annals of Forest Science*, 59: 679-685
89. Grünwald C., Ruel K., Kim Y.S., Schmitt U. 2002b. On the cytochemistry of cell wall formation in poplar trees. *Plant Biology*, 4: 13-21
90. Guan S.-Y., Mlynár J., Sarkanen S. 1997. Dehydrogenative polymerization of coniferyl alcohol on macromolecular lignin templates. *Phytochemistry*, 45, 5: 911-918
91. Harada H. 1965. Ultrastructure and organization of gymnosperm cell walls. 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: 215-234
92. Hatfield R., Vermerris W. 2001. Lignin formation in plants. The dilemma of linkage specificity. *Plant Physiology*, 126: 1351-1357
93. Hauch S., Magel E. 1998. Extractable activities and protein content of sucrose-phosphate synthase, sucrose synthase and neutral invertase in trunk tissues of *Robinia pseudoacacia* L. are related to cambial wood production nad heartwood formation. *Planta*, 207: 266-274
94. Hoffmann P., Parameswaran. 1976. On the ultrastructural localization of hemicelluloses within delignified tracheids of spruce. *Holzforschung*, 30, 2: 62-70
95. Holdheide W. 1951. Anatomie mitteleuropäischer Gehölzrinden (mit mikrophotographischem Atlas). V: Handbuch der Mikroskopie in der Technik. Freund H. (ed.). Umschau Verlag, Frankfurt am Main: 193-365
96. Horacek P., Slezingerova J., Gandelova. 1999. Effects of environment on the xylogenesis of Norway spruce (*Picea abies* [L.] Karst.). In: Wimmer R., Vetter R.E. (ed.). Tree – Ring Analysis. Biological, Methodological and Environmental Aspects. CABI Publishing: 33-54
97. Kalev N., Aloni R. 1998. Role of auxin and gibberellin in regenerative differentiation of tracheids in *Pinus pinea* seedling. *New Phytologist*, 138: 461-468
98. Kirdeyanov A., Hughes M., Vaganov E., Schweingruber F., Silkin P. 2003. The importance of early summer temperature and date of snow melt for tree growth in the Siberian Subarctic. *Trees*, 17: 61- 69

99. Kleist G., Koch G., Bauch J. 1999. UV – microspectrophotometry of lignin and accessory compounds in wood cell walls of conifers. Paper prepared for the 30th Annual meeting, Rosenheim, Germany, 6-11 June 1999. The International Research group on Wood Preservation: 2-9
100. Koch G., Kleist G. 2001. Application of scanning UV microspectrophotometry to localise lignins and phenolic extractives in plant cell walls. *Holzforschung*, 55: 563-567
101. Koch G., Grünwald 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*. Schmitt in sod. (eds.). Uppsala: Swedish University of Agricultural Sciences: 119-130
102. Kollmann F.F.P., Côté JR.W.A. 1968. Principles of wood science and technology I. Solid wood. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg: 592 str.
103. Kozlowsky T.T., Pallardy S.G. 1997. Growth control in woody plants. Academic Press, Inc: 641 str.
104. Krabel D. Influence of sucrose on cambial activity. 2000. V: *Cell and molecular biology of wood formation*. Savidge R.A., Barnett J.R., Napier R. (eds.). BIOS Scientific Publishers Limited, Oxford, UK: 113-125
105. Križaj B. 1997. Zveza med vsebnostjo kalija, magnezija, kalcija in mangana v živih tkivih ter prizadetostjo jelke (*Abies alba* Mill.) in anatomsko – fiziološka interpretacija električne upornosti. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo: 168 str.
106. Kuroda K., Itoh T., Shimaji K. 1981a. Studies on the improvement of the pinning method for marking xylem growth II. Pursuit of the time sequence of abnormal tissue formation in loblolly pine. *Mukuzai Gakkaishi*, 27, 11: 755-760
107. Kuroda K., Itoh T., Shimaji K. 1981b. Studies on the improvement of the pinning method for marking xylem growth II. Pursuit of the time sequence of abnormal tissue formation in loblolly pine. *Mukuzai Gakkaishi*, 27, 11: 755-760
108. Kuroda K., Shimaji K. 1983. Traumatic resin canal formation as a marker of xylem growth. *Forest Science*, 29, 3: 653-659
109. Kuroda K., Shimaji K. 1984a. Wound effects on xylem cell differentiation in a conifer. *IAWA Bulletin n. s.*, 5: 295-305
110. Kuroda K., Shimaji Y. 1984b. The pinning method for marking xylem growth in hardwood species. *Forest Science*, 30, 2: 548-554
111. Kuroda K., Shimaji Y. 1985. Wound effects on cytodifferentiation in hardwood xylem. *IAWA Bulletin*, 6, 2: 107-118
112. Kuroda K. 1986. Wound effects on cytodifferentiation in the secondary xylem of woody plants. *Wood Research*, 72: 67-118
113. Kuroda K., Kiyono Y. 1997. Seasonal rhythms of xylem growth measured by the wounding method and with a band-dendrometer: an instance of *Chamaecyparis obtusa*. *IAWA Journal*, 18, 3: 291-299.
114. Kutscha N.P., Schwarzmam J.M. 1975. The lignification sequence in normal wood of balsam fir. *Holzforschung*, 29, 3: 79-84
115. Kutscha N.P., Hyland F., Schwarzmam J.M. 1975. Certain seasonal changes in balsam fir and its derivatives. *Wood Science and Technology*, 9: 175-188
116. Lachaud S., Catesson A.M., Bonnemain J.L. 1999. Structure and functions of the vascular cambium. *Life Sciences*, 322: 633-650
117. Lang G.A., Early J.D., Arroyave N.J., Darnell R.L., Martin G.C., Stutte G.W. 1985. Dormancy: toward a reduced universal terminology. *HortScience*, 20: 809-812

118. Lang G.A., Early J.D., Martin G.C., Darnell R.L., Stutte G.W. 1987. Endo-, para- and ecodormancy: physiological terminology and classifications for dormancy research. *HortScience*, 22: 371-377
118. Larcher W. 2003. Physiological plant ecology. Ecophysiology and stress physiology of functional groups. Fourth edition. Springer – Verlag Berlin, Heidelberg: 513 str.
120. Larson P.R. 1994. The vascular cambium. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg: 725 str.
121. Laufs P., Jonak C., Traas J. 1998. Cells and domains: two views of the shoot meristem in *Arabidopsis*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 36, 1-2: 33-45
127. Lazarini F., Brenčič J. 1992. Splošna in anorganska kemija (visokošolski učbenik). Državna Založba Slovenije, Ljubljana: 557 str.
123. Levanič T. 1996. Dendrokronološka in dendroekološka analiza propadajočih vladajočih in sovladajočih jelk (*Abies alba* Mill.) v dinarski fitogeografski regiji. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo: 166 str.
124. Levanič T. 1997. Prirastna depresija pri jelki v dinarskem fitogeografskem območju med leti 1960 in 1995. *Zbornik gospodarstva in lesarstva*, 52: 137-164
125. Levanič T. 1999. Računalniško podprta analiza slike mikro- in makroobjektov. *Zbornik gospodarstva in lesarstva*, 59: 141-167
126. Lewis N.G. 1999. A 20th century roller coaster ride: a short account of lignification. *Current Opinion in Plant Biology*, 2: 153-162
127. 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
128. Liese W., Schneider M., Eckstein D. 1975. Histometrische Untersuchungen am Holz einer rauchgeschädigten Fichte. *European Journal of Forest Pathology*, 5, 3: 152-161
129. Lin S.Y. 1992. Ultraviolet spectrophotometry. V: Methods in lignin chemistry. Lin S.Y., Dence C.W. (eds.). Springer – Verlag, Berlin Heidelberg: 215-232
130. Little C.H.A., Bonga J.M. 1974. Rest in the cambium of *Abies balsamea*. *Canadian Journal of Botany*, 59: 342-348
131. Little C.H.A. 1981. Effect of cambial dormancy state on the transport of [1-¹⁴C] indol-3-ylacetic acid in *Abies balsamea* shoots. *Canadian Journal of Botany*, 59: 342-348
132. Lukan D. 2004. Raziskave sezonske aktivnosti kambijeve cone in nastajanja ksilemske branike pri navadni smreki s tehniko »pinning«. Diplomaska naloga. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo: 42 str.
133. Mäkinen H., Nöjd P., Saranpää P. 2003. Seasonal changes in stem radius and production of new tracheids in Norway spruce. *Tree Physiology*, 23: 959-968
134. Marion L., Gričar J., Oven P. 2005. Wood formation in deciduous urban trees analyzed by micro-cores. V: Intra-annual analysis of wood formation: Workshop at the Centro studi per l'ambiente Alpino San Vito di Cadore, Belluno, 2-5 October 2005. San Vito di Cadore: Università degli studi di Padova, Dipartimento territorio e sistemi agro-forestali: 14-15
135. Mauseth J.D. 1988. Plant anatomy. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. Menlo Park, California: 560 str.
136. Mellerowicz E.J., Coleman W.K., Riding R.T., Little C.H.A. 1992. Periodicity of cambial activity in *Abies balsamea*. I. Effects of temperature and photoperiod on cambial dormancy and frost hardiness. *Physiologia Plantarum* 85: 515-525
137. Mlakar J. 1985. Dendrologija – drevesa in grmi Slovenije. Zavod RS Slovenije za šolstvo: 164 str.
138. Moore R., Clark W.D., Vodopich D.S. 1998. Botany. Second edition. The McGraw – Hill Companies, Inc.: 919 str.

139. Mulder B.M., Emons A.M.C. 2001. A dynamical model for plant cell wall architecture formation. *Journal of Mathematical Biology*, 42: 261-289
140. Murmanis L., Sachs I. 1969. Seasonal development of secondary xylem in *Pinus strobus* L. *Wood Science and Technology*, 3: 177-193
141. Murmanis L., Sachs I. 1973. Cell wall formation in secondary xylem of *Pinus strobus* L. *Wood Science and Technology*, 7: 173-188
142. Nix L.E., Villiers K. 1985. Tracheid differentiation in southern pines during the dormant season. *Wood and Fibre Science*, 17, 3: 397-403
143. Okamura K. 1991. Structure of cellulose. V: David N.-S.Hon, Shiraishi N. (eds.) *Wood and cellulosic chemistry*. Marcel Dekker Inc., New York: 89-112
144. Okuyama T., Hiroshi T., Yamamoto H., Yoshida M. 1998. Relation between growth stress and lignin concentration in the cell wall: ultraviolet microscopic spectral analysis. *Journal of Wood Science*, 44: 83-89
145. Öennerud H., Zhang L., Gellerstedt G., Henriksson G. 2002. Polymerization of monolignols by redox shuttle – mediated enzymatic oxidation: a new model in lignin biosynthesis I. *The Plant Cell*, 14: 1953-1962
146. Oribe Y., Kubo T. 1997. Effect of heat on cambial reactivation during winter dormancy in evergreen and deciduous conifers. *Tree Physiology*, 17: 81-87
147. Oribe Y., Funada R., Shibagaki M., Kubo T. 2001. Cambial reactivation in locally heated stems of the evergreen conifer *Abies sachalinensis* (Schmidt) Masters. *Planta*, 212: 684-691
148. Oribe Y., Funada R., Kubo T. 2003. Relationships between cambial activity, cell differentiation and the localization of starch in storage tissues around the cambium in locally heated stems of *Abies sachalinensis* (Schmidt) Masters. *Trees*, 17: 185-192
149. Oribe Y., Funada R., Kubo T. 2004. Cambial activity in locally heated stems of evergreen and deciduous conifers during winter cambial dormancy. *International Symposium on Wood Sciences. Proceedings, October 24-29, 2004, Montpellier, France*: 47
150. Oven P. 1993. Anatomija skorje in njen odziv na mehanska poškodovanja pri zdravih in prizadetih jelkah (*Abies alba* Mill.). Magistrsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo: 97 str.
151. Oven P., Torelli N., Zupančič M. 1995. Anatomy of cambial zone and living bark as related to electrical resistance readings in healthy and affected silver fir (*Abies alba* Mill.). *Acta Pharmaceutica*, 45, 2: 375-377
152. Oven P. 1997. Odziv sekundarnega floema in ksilema ter kambija na mehanske poškodbe bele jelke (*Abies alba* Mill.), navadne smreke (*Picea abies* Karst.), rdečega bora (*Pinus sylvestris* L.) in evropskega macesna (*Larix decidua* Mill.). Doktorsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo: 167 str.
153. Oven P., Gričar J., Zupančič M., Levanič T., Straže A., Demšar B. 2004. Relevant anatomical markers for research of wood formation in Norway spruce with pinning technique. V: *Abstracts : Eurodendro 2004*. Rendsburg: Eurodendro: 36
154. Parham R.A., Côté W.A. 1971. Distribution of lignin in normal and compression wood of *Pinus taeda* L.. *Wood Science and Technology*, 5: 49-62
155. Parham R.A. 1974. Distribution of lignin in Kraft pulp as determined by electron microscopy. *Wood Science*, 6, 4: 305-315
156. Panshin A.J., de Zeeuw C. 1980. *Textbook of wood technology*. Fourth edition. New York, McGraw-Hill: 722 str.
157. Plomion C., Leprovost G., Stokes A. 2001. Wood formation in trees. *Plant Physiology*, 127: 1513-1523

158. Požgaj A., Kurjatko S. 1986. Wood properties of spruce from forests affected by pollution in Czechoslovakia. IAWA Bulletin n.s., 7, 4: 405-410
159. Raes J., Rohde A., Christensen J.H., Van de Peer Y., Boerjan W. 2003. Genome – wide characterization of the lignification toolbox in Arabidopsis. Plant Physiology, 133: 1051-1071
160. Ralph J., Hatfield R.D., Sederoff R.R., MacKay J.J. 1998. Order and randomness in lignin and lignification: is a new paradigm for lignification required? Research Summaries, US Dairy Forage Research Center: 39-41
161. Rao K.S., Catesson A.-M. 1985. Changes in the membrane components of nondividing cambial cells. Canadian Journal of Botany, 65: 246-254
162. Rensing K.H. 2002. Chemical and cryo-fixation for transmission electron microscopy of gymnosperm cambial cells. V: Wood formation in trees. Cell and molecular biology techniques. Chaffey N (ed.) Taylor & Francis, London and New York: 65-81
163. 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
164. Ribas M., Gutiérrez E. 2005. Measurement of *Pinus halepensis* girth growth using band-dendrometers. V: Intra-annual analysis of wood formation: Workshop at the Centro studi per l'ambiente Alpino San Vito di Cadore, Belluno, 2-5 October 2005. San Vito di Cadore: Università degli studi di Padova, Dipartimento territorio e sistemi agro-forestali: 18
165. Richardson S.D., Dinwoodie J.M. 1960. Studies on physiology of xylem development. Part I: The effect of night temperature on tracheid size and wood density in conifers. Journal of the Institute of Wood Science, 6: 3-13
166. Riding R.T., Little C.H.A. 1984. Anatomy and histochemistry of *Abies balsamea* cambial zone cells during the onset and breaking of dormancy. Canadian Journal of Botany, 62: 2570-2579
167. Riding R.T., Little C.H.A. 1986. Histochemistry of the dormant vascular cambium of *Abies balsamea*: changes associated with tree age and crown position. Canadian Journal of Botany, 64: 2082-2087
168. Roberts L.W., Gahan P.B., Aloni R. 1988. Vascular differentiation and plant growth regulators. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg: 152 str.
169. Robinson D.G., Ehlers U., Herken R., Herrmann B., Mayer F., Schürmann F.-W. 1987. Methods of preparation for electron microscopy. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg: 190 str.
170. Rossi S., Deslauriers A., Morin H. 2003. Application of the Gompertz equation for the study of xylem cell development. Dendrochronologia, 21, 1: 33-39
171. Rossi S., Anfodillo T., Menardi R. 2006a. Trephor: a new tool for sampling microcores from tree stems. IAWA Journal, 27, 1: 89-97
172. Rossi S., Deslauriers A., Anfodillo T., Morin H., Saracino A., Motta R., Borghetti M. 2006b. Conifers in cold environments synchronize maximum growth rate of tree-ring formation with day length. New Phytologist, 170, 2: 301-310
173. Rouhi A.M. 2001. Only facts will end lignin war. Data, not verbiage, will determine if new lignin biosynthesis model will prevail. Chemical and Engineering News, 2: 52-56
174. Ruel K., Burlat V., Joseleau. 1999. Relationship between ultrastructural topochemistry of lignin and wood properties. IAWA Journal, 20, 2: 203-211
175. Sachs I.B. 1965. Evidence of lignin in the 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
176. Saka S., Thomas R.J. 1982. A study of lignification in loblolly pine tracheids by SEM-EDXA technique. Wood Science and Technology, 16: 167-179

177. Saka S., Whiting P., Fukazawa K., Goring D.A.I. 1982. Comparative studies on lignin distribution by UV microscopy and bromination combined with EDXA. *Wood Science and Technology*, 16: 269-277
178. Saka S. 1991. Chemical composition and distribution. V: David N.-S.Hon, Shiraishi N. (eds.) *Wood and cellulosic chemistry*. Marcel Dekker Inc., New York: 59-88
179. Saka S. 1992. Electron microscopy. V: *Methods in lignin chemistry*. Lin S.Y., Dence C.W. (eds.). Springer-Verlag, Berlin Heidelberg: 133-145
180. Sakakibara A. 1991. Chemistry of lignin. V: David N.-S.Hon, Shiraishi N. (eds.) *Wood and cellulosic chemistry*. Marcel Dekker Inc., New York: 113-175
181. Savidge R.A., Wareing P.F. 1981. A tracheid differentiation factor from pine needles. *Planta*, 153: 395-404
182. Savidge R.A., Barnett J.R. 1993. Protoplasmic changes in cambial cells induced by a tracheid-differentiation factor from pine needles. *Journal of Experimental Botany*, 44: 395-407
183. Savidge R.A. 1996. Xylogenesis, genetic and environmental regulation – a review. *IAWA Journal*, 17, 3: 269-310
184. Savidge R.A. 2000a. Intristic regulation of cambial growth. *Journal of Plant Growth Regulation*, 20: 52-77
185. 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 R.A., Barnett J.R., Napier R. (eds.). BIOS Scientific Publishers Limited, Oxford, UK: 1-30
186. Schmid R. 1976. The elusive cambium - another terminological contribution. *IAWA Bulletin*, 4: 51-59
187. Schmitt U., Möller R., Eckstein D. 2000. Seasonal wood formation dynamics of beech (*Fagus sylvatica* L.) and black locust (*Robinia pseudoacacia* L.) as determened by the "pinning" technique. *Journal of Applied Botany*, 74: 10-16
188. Schmitt U., Grünwald C., Gričar J., Koch G., Čufar K. 2003. Wall structure of terminal latewood tracheids of healthy and declining silver fir trees in the Dinaric region, Slovenia. *IAWA Journal*, 24, 1: 41-51
189. Schmitt U., Melcher E. 2004. 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*. Schmitt in sod. (eds.). Uppsala: Swedish University of Agricultural Sciences: 105-118
190. Schmitt U., Jalkanen R., Eckstein D. 2004. Cambium dynamics of *Pinus sylvestris* and *Betula spp.* in the northern boreal forest in Finland. *Silva Fennica*, 38, 2: 167-178
191. Scott J.A.N., Procter A.R., Fergus B.J., Goring D.A.I. 1969. The application of ultraviolet microscopy to the distribution of lignin in wood. Description and validity of the technique. *Wood Science and Technology*, 3: 73-92
193. Schweingruber F.H. 1986. Abrupt growth changes in conifers. *IAWA Bulletin n.s.*, 7, 4: 277-283
194. Schweingruber F.H. 1988. Tree rings. Basics and applications of dendrochronology. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holland: 276 str.
195. Schweingruber F.H. 1990. Mikroskopische Holzanatomie: Formenspektren mitteleuropäischer Stamm- und Zweighölzer zur Bestimmung von rezentem und subfossilem Material Birmensdorf: Eidgenössische Anstalt für das Forstliche Versuchswesen: 226 str.
196. Sederoff R.R., MacKay J.J., Ralph J., Hatfield R.D. 1999. Unexpected variation in lignin. *Current Opinion in Plant Biology*, 2: 145-152

197. Seo J.W., Schmitt U., Eckstein D., Jalkanen R. 2005. Wood formation of Scots pine in northern Finland during five consecutive vegetation periods. V: Eurodendro 2005: international conference of dendrochronology: September, 28th-October 2nd 2005, Viterbo, Italy. Viterbo, Sette citta: 36-37
198. Singh A.P., Daniel G. 2001. The S2 layer in the tracheid walls of *Picea abies* wood: Inhomogeneity in the lignin distribution and cell wall microstructure. *Holzforschung*, 55: 373-378
199. Shortle W.C., Bauch J. 1986. Wood characteristics of *Abies balsamea* in the New England States compared to *Abies alba* from sites in Europe with declining problems. *IAWA Bulletin n.s.*, 7, 4: 375-387
200. Skene D.S. 1972. The kinetics of tracheid development in *Tsuga canadensis* Carr. and its relation to tree vigour. *Annals of Botany*, 36: 179-187
201. Spurr A.R. 1969. A low viscosity embedding medium for electron microscopy. *Journal of Ultrastructural Research*, 26: 31-43
202. Sundberg B., Little C.H.A. 1990. Tracheid production in response to changes in the internal level of indole-3-acetic acid in 1-year-old shoots of scots pine. *Plant Physiology*, 94: 1721-1727
203. Sundberg B., Uggla C., Tuominen H. 2000. Cambial growth and auxin gradients. V: *Cell and Molecular Biology of Wood Formation*. Savidge R.A., Barnett J.R., Napier R. (eds.). BIOS Scientific Publishers Limited, Oxford, UK: 169-188
204. Taiz L., Zeiger E. 2002. *Plant physiology*. Third edition. Sinauer Associates, Inc., Publishers, Sunderland, Massachusetts: 690 str.
205. Takabe K., Fujita M., Harada H., Saiki H. 1981. Lignification process of Japanese black pine (*Pinus thunbergii* Parl.) tracheids. *Mokuzai Gakkaishi*, 27: 813-820
206. Takabe K. 2002. Cell walls of woody plants: autoradiography and ultraviolet microscopy. V: *Wood formation in trees. Cell and molecular biology techniques*. Chaffey N (ed.) Taylor & Francis, London and New York: 159-177
207. Terashima N., Fukushima K. 1988. Heterogeneity in formation of lignin. XI: An autographic study of heterogeneous formation and structure of pine lignin. *Wood Science and Technology*, 22: 259-270
208. Terashima N., Fukushima K., Sano Y. 1988. Heterogeneity in formation of lignin. X: Visualization of lignification process in differentiating xylem pine by microautoradiography. *Holzforschung*, 42, 6: 347-350
209. Terashima N. 2000. Formation and ultrastructure of lignified plant cell walls. V: *New horizons in wood anatomy*. Kim Y.S. (ed.). Proceedings of the 4th. Pacific Regional Wood Anatomy Conference. Chonnam National University Press, Kwangju, Korea South: 169-180
210. Tišler V. 1986. Kemija lesa. Študijsko gradivo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo: 32 str.
211. Torelli N., Čufar K., Robič D. 1986. Some wood anatomical, physiological and silvicultural aspects of silver fir dieback in Slovenia. *IAWA Bulletin n.s.*, 7, 4: 343-350
212. Torelli N. 1990. Les in skorja. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo: 70 str.
213. Torelli N., Oven P., Zupančič M. 1990. Nastanek in značilnosti barierne cone ter lesa nastalega po ranitvi. *Zbornik gozdarstva in lesarstva*, 36: 3-16
214. Torelli N., Čufar K., Oven P. 1996. Bioelectrical characterization of tree conditions and slime cells in the bark as possible symptoms of silver fir decline. *Phyton*, 36, 3: 35-38
215. Torelli N. 1998. Zunajkambijska rast celic v lesu dvokaličnic. *Les*, 50, 10: 293-298
216. Torelli N., Shortle W.C., Čufar K., Ferlin F., Smith K.T. 1999. Detecting changes in tree health and productivity of silver fir in Slovenia. *European Journal of Forest Pathology*, 29: 187-197

217. Torelli N. 2000. Ksilogeneza. Les, 52, 10: 325- 335
218. Turcotte A., Morin H., Krause C. 2005. Spring changes in water relations and onset of cambial activity of black spruce (*Picea mariana* (Mill.) B.S.P): their relationship to environmental factors. V: Intra-annual analysis of wood formation: Workshop at the Centro studi per l'ambiente Alpino San Vito di Cadore, Belluno, 2-5 October 2005. San Vito di Cadore: Università degli studi di Padova, Dipartimento territorio e sistemi agro-forestali: 24-25
219. Uggla C., Moritz T., Sandberg G., Sundberg B. 1996. Auxin as a positional signal in pattern formation in plants. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 93: 9282-9286
220. Uggla C., Mellerowicz E.J., Sundberg B. 1998. Indole-3-acetic acid controls cambial growth in Scots pine by positional signaling. Plant Physiology, 117: 113-121
221. Uggla C., Magel E., Moritz T., Sundberg B. 2001. Function and dynamics of auxin and carbohydrates during earlywood/latewood transition in Scots pine. Plant Physiology, 125: 2029-2039
222. Uggla C., Sundberg B. 2002. Sampling of cambial region tissues for high resolution analysis. V: Wood formation in trees. Cell and molecular biology techniques. Chaffey N (ed.) Taylor & Francis, London and New York: 215-228
223. 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
224. Verheyden A., Kairo J.G., Beeckmann H., Koedman N. 2004. Growth rings, growth ring formation and age determination in the mangrove *Rhizophora mucronata*. Annals of Botany, 94: 89-66
225. Wagenführ R. 1996. Holzatlas. 4. neuarbeitete Auflage. Fachbuchverlag Leipzig. Carl Hanser Verlag, München Wien: 688 str.
226. Wardrop A. B. 1965. Cellular differentiation in xylem. V: Cellular ultrastructure of woody plants. Proceedings of the Advanced Science Seminar Pinebrook Conference Center Upper Saranac Lake, New York, september, 1964. Cote W.A. (ed.). Syracuse, New York, Syracuse University Press: 61-97
227. Werf van der G.W., Sass-Klaassen U. 2006. The impact of the summer drought in 2003 on the intra-annual growth pattern and vessel size of Beech (*Fagus sylvatica*) and Oak (*Quercus robur*) in The Netherlands. Dendrochronologia (v tisku)
228. Westermarck U. 1982. Calcium promoted phenolic coupling by superoxide radical – a possible lignification reaction in wood. Wood Science and Technology, 16: 71-78
229. Westermarck U., Lidbrandt O., Eriksson I. 1988. Lignin distribution in spruce (*Picea abies*) determined by mecurisation with SEM EDXA technique. Wood Science and Technology, 22: 243-250
230. Whitmore F.W., Zahner R. 1966. Development of the xylem ring in stems of young red pine trees. Forest Science, 12, 2: 198-210
231. Wilson B.F. 1966. Mitotic activity in the cambial zone of *Pinus strobus*. American Journal of Botany, 53: 364-372
232. Wimmer R. 2002. Wood anatomical features in tree-rings as indicators of environmental change. Dendrochronologia, 20, 1-2: 21-36
233. Wodzicki T.J. 1972. Mechanism of xylem differentiation in *Pinus sylvestris* L. Journal of Experimental Botany, 22, 72: 670-687
234. Wodzicki T.J. 2001. Natural factors affecting wood structure. Wood Science and Technology, 35: 5-26
235. Wolter K. E. 1968. A new method for marking xylem growth. Forest Science, 14: 102-104.
236. Yoshimura K., Itoh T., Shimaji K. 1981a. Studies on the improvement of the pinning method for marking xylem growth. Wood Research, 67: 1-16
237. Yoshimura K., Itoh T., Shimaji K. 1981b. Studies on the improvement of the pinning method for marking xylem growth II. Pursuit of the time sequence of abnormal tissue formation in loblolly pine. Mukuzai Gakkaishi, 27, 11: 755-760

- 238. Zeide B. 1993. Analysis of growth equations. Forest Science, 39: 591-616
- 239. Zeide B. 2004. Intristic units in growth modeling. Ecological Modelling, 175: 249-259
- 240. Zupan B. 2005. Nastanek ksilemske branike pri smrekah na Pokljuki v letu 2003. Diplomaska naloga. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo: 51 str.



ZAHVALA

Doktorsko delo je bilo opravljeno v okviru programa Programske skupine lesarstvo ter evropskega projekta Predicting Impacts on Natural Ecotones (PINE V. FP, št. pogodbe: EVK2-CT-2002-00136). Raziskave so bile financirane s strani Agencije za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije (Ministrstvo za visoko šolstvo, znanost in tehnologijo), evropskega projekta PINE, COST Akcije E 28 (Genosilva: European Forest Genomics Network) v okviru STSM (Short-Term Scientific Missions) ter štipendije iz nacionalnega štipendijskega sklada Svetovne federacije znanstvenikov WFS (World Federation of Scientists) in Slovenske znanstvene fundacije (SZF).

Raziskave v okviru disertacije so bile opravljene na Katedri za tehnologijo lesa Oddelka za lesarstvo Biotehniške fakultete UL, v Laboratoriju za histologijo in elektronsko mikroskopijo Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete UL in na Oddelku za lesno biologijo in zaščito lesa na Univerzi Hamburg v Hamburgu (Ordinariat für Holzbiologie und Holzschutz, Universität Hamburg).

Zahvaljujem se prof. dr. **Katarini Čufar** za sprejem mentorstva pri doktoratu in še prej pri diplomu. Posebej sem hvaležna za podporo in spodbudo pri delu in sodelovanju s tujimi institucijami, pri predstavitvah rezultatov na številnih mednarodnih konferencah tekom celotnega izobraževanja ter za svobodo pri raziskovalnem delu.

Zahvaljujem se doc. dr. **Primožu Ovnu** za sprejem somentorstva in za ponujeno možnost sodelovanja na evropskem projektu PINE. Hvala za vso pomoč pri načrtovanju eksperimentalnega dela, za nasvete in konstruktivne pripombe.

Zahvaljujem se recenzentom: prof. dr. **Jasni Štrus**, prof. dr. **Marini Dermastia**, in prof. dr. **Dietru Ecksteinu** za opravljeno recenzijo naloge, za kritične pripombe in strokovne nasvete.

Posebno se zahvaljujem dr. **Uwe Schmittu** iz hamburške univerze, ker mi je omogočil delo v tamkajšnjem laboratoriju. Hvala za izdatno pomoč, vodenje in usmerjanje pri pripravi ultra tankih preparatov za transmissijsko elektronsko mikroskopijo (TEM) in UV-mikrospektrofotometrijo (UMSP) ter pri analizi in interpretaciji rezultatov. Zahvaljujem se prof. dr. **Geraldu Kochu** iz hamburške univerze za vodenje pri delu z UV-mikroskopom ter za pomoč pri prenosu, obdelavi in interpretaciji rezultatov. Zahvaljujem se **Tanji Potsch** iz Univerze v Hamburgu za tehnično podporo ter za učenje priprave poltankih in ultra tankih rezin za UMSP in TEM.

Hvala **Martinu Zupančiču**, univ. dipl. inž. les. za izdatno in dragoceno pomoč tekom celotnega podiplomskega študija pri zastavitvi in načrtovanju eksperimentov, pri izbiri testnih dreves, pri odvzemu in pripravi vzorcev ter pri pripravi preparatov. Hvala **Leni Marion**, univ. dipl. inž. gozd., za strokovno in prijateljsko pomoč pri prepajanju in pripravi preparatov z rotacijskim mikrotomom, za pregled doktorske disertacije in za dobronamerne pripombe. Hvala **Petru Cundru**, inž. les., za vso pomoč pri zastavitvi eksperimentov in odvzemu vzorcev. Hvala mag. **Alešu Stražetu** za pomoč pri odvzemu vzorcev in za nasvete pri delu z računalnikom. Hvala **Maksu Mereli**, univ. dipl. inž. les. za pomoč pri zastavitvi eksperimentov.

Zahvaljujem se **Skladu kmetijskih zemljišč in gozdov Republike Slovenije**, **Zavodu za gozdove OE Ljubljana**, **Zavodu za gozdove Slovenije GGO Bled**, **GE Pokljuka**, **Tomažu Oblaku** ter **Gozdarskemu Inštitutu Slovenije**, da so mi omogočili delo na terenu. Zahvaljujem se doc. dr. **Tomu Levaniču** za meteorološke podatke za Ljubljano v letih 2004 in 2005 ter za pomoč pri izbiri dreves na terenu.

Zahvaljujem se mag. **Magdi Tušek** in **Luki Malenšku** iz Laboratorija za histologijo in elektronsko mikroskopijo Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete UL za vso pomoč pri prepajanju vzorcev z epoksi smolo.

Hvala dr. **Gregorju Božiču** za pomoč pri pridobitvi enomesečne štipendije STSM v okviru Cost Akcije E 28.

Hvala bivšim diplomantom **Domnu Lukanu**, **Barbari Zupan**, **Blažu Demšarju** in **Rožletu Čudnu** za pomoč pri analizah delnih rezultatov.

Hvala domačim, prijateljem in kolegom za vso podporo, vzpodbudo in pomoč v obdobju podiplomskega študija.

J. Gričar

PRILOGE

Priloga A: Preglednica povprečnega števila celic ksilemskega prirastka za posamezno drevo na dan vzorčenja z metodo pining in odvzemom intaktnih tkiv na Pokljuki v letu 2003. Smreke št. 1, 2, 3, 4, 5 – pining, smreke št. 7, 9, 10, 12 – odvzem intaktnih vzorcev

	POVPREČNO ŠTEVILO PREŠTETIH KSILEMSKIH CELIC ZA POSAMEZNO DREVO								
datum	drevo 1	drevo 2	drevo 3	drevo 4	drevo 5	drevo 7	drevo 9	drevo 10	drevo 12
9.5.03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
16.5.03	0,00	0,00	1,00	2,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
23.5.03	1,00	4,00	2,00	5,00	3,00	1,50	1,67	1,67	3,33
30.5.03	5,00	7,00	2,50	11,67	9,00	6,67	6,67	8,00	9,00
6.6.03	13,50	10,00	5,00	15,50	12,00	5,67	7,33	9,33	13,33
13.6.03	13,00	17,00	6,00	20,00	14,33	12,33	12,33	10,67	18,67
20.6.03	21,00	25,50	5,33	25,00	20,50	10,33	20,50	18,33	25,67
27.6.03	31,00	28,50	8,00	38,00	31,00	20,67	21,50	27,00	31,33
4.7.03	35,50	32,00	14,00	33,00	35,00	22,67	25,33	32,33	30,67
11.7.03	25,50	32,00	11,00	40,00	26,00	19,83	30,67	34,33	36,67
18.7.03	37,50	45,00	8,50	46,50	29,50	27,33	38,00	35,33	43,00
25.7.03	43,00	56,00	12,00	52,50	28,50	36,67	38,33	35,00	35,67
1.8.03	41,00	44,50	15,50	50,00	48,00	30,67	39,33	42,33	55,00
8.8.03	32,50	37,50	10,50	52,50	29,00	31,00	31,67	46,67	54,33
15.8.03	46,00	56,50	9,00	57,00	36,50	33,00	28,67	44,00	48,67
22.8.03	46,00	58,00	9,50	54,50	42,50	35,33	33,33	44,67	43,33
29.8.03	39,50	44,00	13,50	42,00	44,50	30,00	41,00	46,33	42,33
5.9.03	31,00	42,00	8,50	41,00	44,00	36,00	32,33	48,00	44,33
12.9.03	42,00	57,00	11,00	60,50	45,00	34,67	38,67	47,00	45,33
19.9.03	51,50	45,50	10,50	49,50	47,50	29,00	41,00	34,67	46,67
26.9.03	33,00	32,00	10,00	40,00	36,50	33,67	42,33	51,33	36,67
3.10.03	37,60	39,00	10,50	40,50	38,25	33,67	38,67	46,33	58,33

Priloga B: Preglednica povprečnega števila celic ksilemskega prirastka za posamezno drevo na dan vzorčenja z metodo pining in odvzemom intaktnih tkiv na Sorškem polju v letu 2003. Smreke št. 1, 3, 4, 5 – odvzem intaktnih vzorcev, smreke št. 11, 12, 13, 14, 15 – pining

	POVPREČNO ŠTEVILO PREŠTETIH KSILEMSKIH CELIC ZA POSAMEZNO DREVO								
datum	drevo 1	drevo 5	drevo 3	drevo 4	drevo 11	drevo 12	drevo 13	drevo 14	drevo 15
25.4.2003	0	0,00	0,00	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2.5.2003	2,33	1,67	1,33	2,33	0,00	3,50	3,50	4,50	3,00
9.5.2003	7,00	5,33	4,00	9,33	5,50	6,50	9,50	8,00	12,00
16.5.2003	10,67	11,33	10,00	15,33	10,00	10,50	13,00	13,00	16,33
23.5.2003	13,00	7,33	12,33	20,67	16,00	12,33	12,00	13,50	21,00
30.5.2003	18,67	17,00	13,67	33,33	20,00	15,50	19,00	19,00	20,50
6.6.2003	21,33	18,33	14,67	32,67	24,00	15,50	23,50	19,67	31,00
13.6.2003	22,33	20,33	18,00	41,00	27,00	21,00	27,50	21,50	34,50
20.6.2003	21,67	23,67	19,67	41,67	27,50	21,00	23,00	21,50	35,50
27.6.2003	21,00	27,33	24,00	40,33	30,500	23,33	16,00	25,00	40,00
4.7.2003	24,00	25,33	23,00	50,00	35,00	20,00	25,00	23,00	50,00
11.7.2003	24,67	25,33	20,33	52,00	43,00	23,00	28,00	24,50	54,00
18.7.2003	27,33	29,00	21,00	45,67	37,25	21,75	23,50	30,50	46,50
25.7.2003	20,67	28,67	20,00	42,67	38,33	33,50	38,50	31,00	58,00
1.8.2003	27,67	29,67	23,00	41,33	39,00	23,50	28,50	33,50	56,50
8.8.2003	23,33	26,00	22,33	48,67	37,50	23,00	36,50	35,00	61,00
15.8.2003	22,33	28,33	18,67	46,67	41,00	25,50	33,50	31,50	53,50
22.8.2003	18,33	31,67	18,00	45,67	36,00	32,50	41,50	31,50	50,00
29.8.2003	20,33	29,00	21,33	48,67	36,00	22,50	29,00	21,00	66,50
5.9.2003	24,33	31,00	17,33	40,00	36,00	23,50	23,50	27,00	46,50
12.9.2003	22,00	34,67	23,67	40,00	40,00	23,00	37,50	30,00	49,00
19.9.2003	25,33	28,00	20,00	44,67	41,50	23,00	32,50	25,50	58,50
26.9.2003	28,67	29,00	18,67	45,33	33,50	22,00	25,00	27,00	50,00

Priloga C: Preglednica povprečnega števila celic ksilemskega prirastka za posamezno drevo na dan vzorčenja z metodo odvzema intaktnih tkiv na Ravniku v letu 2003.

	POVPREČNO ŠTEVILO PREŠTETIH KSILEMSKIH CELIC ZA POSAMEZNO DREVO			
datum	drevo 191	drevo 193	drevo 199	drevo 208
23.4.2003	1,00	1,33	1,33	1,00
30.4.2003	5,75	7,00	7,33	6,33
7.5.2003	12,34	9,33	12,33	9,33
14.5.2003	24,00	17,00	18,33	15,00
21.5.2003	20,00	19,50	25,67	19,67
28.5.2003	20,33	30,50	29,00	25,67
4.6.2003	23,13	26,50	33,67	40,00
11.6.2003	32,08	34,83	45,33	36,33
18.6.2003	42,00	39,00	44,33	47,67
25.6.2003	40,00	41,00	48,00	51,67
2.7.2003	36,38	38,25	53,00	51,67
9.7.2003	43,30	43,50	54,00	45,33
16.7.2003	47,83	41,25	56,33	56,33
23.7.2003	61,38	58,42	56,33	69,67
30.7.2003	59,13	53,50	55,67	84,33
6.8.2003	57,30	59,25	72,67	76,00
13.8.2003	56,38	55,50	66,67	76,00
20.8.2003	49,75	51,50	50,67	89,33
27.8.2003	61,13	80,50	39,00	86,33
3.9.2003	57,75	54,25	51,67	94,33
10.9.2003	74,08	52,50	63,33	62,00
17.9.2003	55,50	61,75	65,33	67,67
24.9.2003	53,25	62,75	83,67	77,33
1.10.2003	67,00	73,25	79,00	89,67
8.10.2003	45,25	50,75	71,67	93,00
15.10.2003	56,71	48,08	93,00	93,33
22.10.2003	82,75	48,58	82,00	86,33
29.10.2003	57,88	82,00	65,00	60,33
5.11.2003	56,16	52,00	75,67	87,33

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA LESARSTVO

Jožica GRIČAR

**VPLIV TEMPERATURE IN PADAVIN
NA KSILOGENEZO PRI JELKI (*Abies alba*)
IN SMREKI (*Picea abies*)**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Doktorski študij

Ljubljana, 2006