

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA LESARSTVO

Marcel PIRNAT

**NASTANEK POVRŠINSKEGA KALUSA PRI NAVADNEM DIVJEM
KOSTANJU (*Aesculus hippocastanum*)**

DIPLOMSKO DELO
Visokošolski strokovni študij

**FORMATION OF SURFACE CALLUS IN HORSE CHESTNUT
(*Aesculus hippocastanum*)**

GRADUATION THESIS
Higher professional studies

Ljubljana, 2009

Diplomsko delo je zaključek Visokošolskega strokovnega študija lesarstva. Opravljeno je bilo na Katedri za tehnologijo lesa Oddelka za lesarstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Senat Oddelka za lesarstvo je za mentorja diplomske naloge imenoval prof. dr. Primoža Ovna in za recenzentko prof. dr. Katarino Čufar.

Mentor: prof. dr. Primož Oven

Recenzentka: prof. dr. Katarina Čufar

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Marcel Pirnat

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Vs
DK	630*416.4:630*176.1
KG	navadni divji kostanj/ <i>Aesculus hippocastanum</i> /les/skorja/poškodba/kalus/ligno-suberinski sloj
AV	PIRNAT, Marcel
SA	OVEN, Primož (mentor)/ČUFAR, Katarina (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Rožna dolina, c. VIII/34
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo
LI	2009
IN	NASTANEK POVRŠINSKEGA KALUSA PRI NAVADNEM DIVJEM KOSTANJU (<i>Aesculus hippocastanum</i>)
TD	Diplomsko delo (visokošolski strokovni študij)
OP	XI, 36 str., 1 pregl., 24 sl., 9 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Pri navadnem divjem kostanju (<i>Aesculus hippocastanum</i> L.) smo z lesnega cilindra odstranili skorjo v izmeri 30 x 30 mm. Na deblu smo naredili 8 poškodb 10. 8. 2006, vzorce pa odvezemali tedensko, vse do 28. 9. 2006. Z mikroskopom Nikon Eclipse E800 smo preiskovali histološki odziv na poškodbe v svetlem polju in v UV svetlobi. Zaporedja dogajanj smo analizirali kronološko. 7. dan po poškodbi na površini ranitve ni bilo moč opaziti nikakršne spremembe. V 14 dneh po poškodbi se je na površini razvila kalusna blazina. V njej je bilo mogoče anatomsko razlikovati 3 plasti: 1. tik ob eksponiranem lesu; 2. na površini kalusne blazine; 3. v osrednjem delu kalusne blazine. Na površini kalusa je bil že prisoten suberin v celičnih stenah. 21. dan po poškodbi so bile celice v notranjem delu kalusne blazine urejene v pravilnih radialnih nizih, na površini kalusne blazine pa so bile prisotne tudi debelejšje celične stene. V osrednjem sloju kalusne blazine je bila zaznavna hiperplazija in hipertrofija celic. 28. dan po poškodbi je nastal nov plutni kambij, tik pod sklenjenim ligno-suberinskim slojem v tangencialni smeri. Na površini kalusne blazine so se pojavili tudi depoziti v lumnih celic, ki imajo, kakor tudi ligno-suberinski sloj, zaščitno funkcijo. 35. dan po poškodbi je bilo mogoče videti izrazitejši ligno-suberinski sloj. V osrednjem sloju kalusne blazine so se celice lignificirale v gnezdih. 42. dan po ranitvi se je pojavil vaskularni kambij, celične stene v kalusni blazini pa so se odebelile. Na 49. dan ni bilo delitvenih aktivnosti vaskularnega kambija. Pod ligno-suberinskim slojem so nastale nove, prav tako suberizirane plutne celice. Napredovala je tudi lignifikacija celic v tkivu pod in nad kambijem. Spremembe v ranitvenih tkivih so se odvijale vse do 28. 9. 2006. Aktivnost meristemov v normalnih rastnih pogojih se v tem času, na tej geografski širini, že konča. Ključna posledica poranitvenih aktivnosti je bil nastanek ligno-suberinskega sloja, ki zaščiti poškodovano območje pred izsuševanjem in okužbo z glivami.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Vs
DC 630*416.4:630*176.1
CX horse chestnut/*Aesculus hippocastanum*/wood/bark/damage/callus/ligno-suberin layer
AU PIRNAT, Marcel
AA OVEN, Primož (supervisor)/ČUFAR, Katarina (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Rožna dolina, c. VIII/34
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Wood Science and Technology
PY 2009
TI FORMATION OF SURFACE CALLUS IN HORSE CHESTNUT (*Aesculus hippocastanum*)
DT Graduation Thesis (Higher professional studies)
NO XI, 36 p., 1 tab., 24 fig., 9 ref.
LA sl
AL sl/en
AB A 30 x 30 mm segment of bark was removed from the wooden cylinder of a horse chestnut (*Aesculus hippocastanum* L.). On August 10, 2006, 8 wounds were inflicted upon the trunk and samples were taken weekly until September 28, 2006. Histological changes were examined in the bright field and UV light, using a Nikon Eclipse E800 microscope. The progression of occurrences was analyzed chronologically. On the 7th day after the wound infliction, there was no change on the wound surface. 14 days after the infliction, the callus tissue started to develop on the wound surface. This tissue consisted of 3 anatomical layers: 1st directly on the exposed wood, 2nd on the surface of the callus tissue, and 3rd in the middle part of callus tissue. The presence of suberin could already be observed. On the 21st day after the infliction, the cells in the middle part of the callus tissue were arranged in proper radial rows; thick cell walls started to form on the surface. In the middle layer, there was evidence of cell hyperplasia and hypertrophy. On the 28th day after the infliction, formation of new cork cambium could be observed right under the ligno-suberin layer in the tangential direction. On the surface of the callus tissue, some deposits of lumen cells were found, which together with the ligno-suberin layer, act as protection. On the 35th day after the infliction, the ligno-suberin layer was clearly visible. In the middle layer of the callus tissue, the cells started to lignificate in nests. On the 42nd day after the infliction, formation of vascular cambium and thickening of cell walls in the callus tissue was observed. On the 49th day, the process of division in the vascular cambium was no longer observed. Under the ligno-suberin layer, new cork cells were formed that were also suberized. The lignification of tissue cells over and under the cambium progressed as well. Changes in wounded tissues had been occurring until September 28, 2006. At that time period the phytological activity of meristems under normal growth conditions at this latitude already ends. The key event in the post-wound reaction was the formation of ligno-suberin layer that protects the wounded area from drying out and from fungus infection.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija	III
Key words documentation	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VIII
Kazalo slik	VIII
1 UVOD	1
2 DOSEDANJE RAZISKAVE	2
2.1 OPIS NAVADNEGA DIVJEGA KOSTANJA (<i>Aesculus hippocastanum</i> L.)	2
2.2 ZGRADBA LESA NAVADNEGA DIVJEGA KOSTANJA (<i>Aesculus Hippocastanum</i> L.)	4
2.2.1 Makroskopski opis	4
2.2.2 Mikroskopski opis lesa navadnega divjega kostanja	4
2.3 ODZIV DREVJA NA MEHANSKA POŠKODOVANJA MODEL CODIT	5
2.4 ODZIV SKORJE NA MEHANSKA POŠKODOVANJA	6
2.5 NASTANEK KALUSA PO MEHANSKEM POŠKODOVANJU DREVESNIH TKIV	7
3 MATERIAL IN METODE	8
3.1 IZBOR TESTNIH DREVES, ZASTAVITEV POSKUSOV IN ODVZEM VZORCEV	8
3.2 OPIS POSTOPKA PRIPRAVE ODVZETIH VZORCEV ZA VKLOP V PARAFINU	9
3.3 PRIPRAVA VZORCEV ZA ANATOMSKE PREISKAVE	10
3.4 BARVILA ZA HISTOKEMIČNE TESTE	10
3.4.1 Akridin krisoidin astra modro (ACA)	10
3.4.2 Floroglucinol + HCl	11
3.4.3 Sudan črno	11
3.4.4 Safranin in astra modro	12
3.5 METODOLOGIJA MIKROSKOPIRANJA	12
4 REZULTATI	13

4.1	HISTOLOŠKE SPREMEMBE PO MEHANSKEM POŠKODOVANJU	13
5	SKLEPI	32
6	POVZETEK	34
7	VIRI	36
	ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Datumi in nazivi odvzetih vzorcev. Prvi odvzem (oznaka 1) je bil opravljen na dan poškodovanja drevesa. Datum poškodovanja 10. 8. 2006.	9

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Poškodba na deblu navadnega divjega kostanja (<i>Aesculus hippocastanum</i> L.). Vidno je mesto, kjer je bil odvzet vzorec, prav tako pa tudi odziv drevesa na poškodbo.	9
Slika 2: Navadni divji kostanj (<i>Aesculus hippocastanum</i> L.), prečni prerez, datum poškodbe 10. 8. 2006, na dan poškodovanja. Slika prikazuje floem, spodaj vidimo kambijevo cono, kjer je bil vzorec odtrgan. Svetlo polje, akridin krizoidin astramodro (ACA), merilna črtica 100 µm.	13
Slika 3: Navadni divji kostanj (<i>Aesculus hippocastanum</i> L.), prečni prerez, datum poškodbe 10. 8. 2006, sedem dni po poškodovanju. Svetlo polje, ACA, merilna črtica 100 µm.	14
Slika 4: a) Navadni divji kostanj (<i>Aesculus hippocastanum</i> L.), prečni prerez, datum poškodbe 10. 8. 2006, štirinajst dni po poškodovanju. Na lesu debla se je razvila razločna kalusna blazina, na kateri se anatomsko ločijo tri plasti. Svetlo polje, floroglucinol+HCl merilna črtica 100 µm. b) V zunanjem sloju so se nekatere celične stene pri uporabi floroglucinola obarvale rdeče, kar kaže na to, da so celične stene lignificirane. Svetlo polje, floroglucinol+HCl, merilna črtica 100 µm. c) Isti detajl, slikan z UV. Floroglucinol je zakril sekundarno fluorescenco lignina. UV filter UV-2A, floroglucinol+HCl, merilna črtica 100 µm.	15
Slika 5: a) Navadni divji kostanj (<i>Aesculus hippocastanum</i> L.), prečni prerez, datum poškodbe 10. 8. 2006, štirinajst dni po poškodovanju. Posamezne celične stene tkiv, ki se nahajajo na površini kalusa, izkazujejo pozitivno reakcijo s sudan črnim, kar dokazuje prisotnost suberina. Svetlo polje, sudan črno, merilna črtica 100 µm. b) UV svetloba, UV filter UV-2A, sudan črno, isti detajl, kot ga kaže slika a). Merilna črtica 100 µm.	16
Slika 6: Navadni divji kostanj (<i>Aesculus hippocastanum</i> L.), prečni prerez, datum poškodbe 10. 8. 2006, enaindvajset dni po poškodovanju. a) Tkiva, ki so se pojavila na lesu debla. Najbolj očitne spremembe so bile vidne v površinskih celicah. Svetlo polje, ACA, merilna črtica 100 µm. b) Detajl površinskih tkiv, safranin in astra modro, merilna črtica 50 µm.	18

- Slika 7:** Navadni divji kostanj (*Aesculus hippocastanum* L.), prečni prerez, datum poškodbe 10. 8. 2006, enaindvajset dni po poškodovanju. Histokemična analiza površinskih tkiv. Iz slike je razvidna rumenkasto zelena sekundarna fluorescenca lignina, obarvanega z ACA. UV svetloba, filter UV-2A, merilna črtica 50 µm. 19
- Slika 8:** Navadni divji kostanj (*Aesculus hippocastanum* L.), prečni prerez, datum poškodbe 10. 8. 2006, enaindvajset dni po poškodovanju. Dokaz za suberizacijo celic. **a)** Svetlo polje, sudan črno, merilna črtica 50 µm. **b)** Isti detajl, kot na sliki a). UV svetloba, filter UV-2A, sudan črno, merilna črtica 50 µm. 20
- Slika 9:** Navadni divji kostanj (*Aesculus hippocastanum* L.), prečni prerez, datum poškodbe 10. 8. 2006, enaindvajset dni po poškodovanju. **a)** Pod lignosuberinskim slojem so vidne nove celične stene, ki nakazujejo nastanek novega felogena. Svetlo polje, safranin astromodro, merilna črtica 50 µm. **b)** Nove celične stene v osrednjem delu kalusa potrjujejo delitveno aktivnost teh celic. Svetlo polje, safranin astra modro, merilna črtica 50 µm. 21
- Slika 10:** Navadni divji kostanj (*Aesculus hippocastanum* L.), prečni prerez, datum poškodbe 10. 8. 2006, osemindvajset dni po poškodovanju. Na sliki so označena naslednja tkiva: RL – ranitveni ksilem, KC – domneven položaj kambijeve cone, RF – ranitveni floem, K – kalus. Svetlo polje, ACA, merilna črtica 100 µm. 22
- Slika 11:** Navadni divji kostanj (*Aesculus hippocastanum* L.), prečni prerez, datum poškodbe 10. 8. 2006, osemindvajset dni po poškodovanju. **a)** Intenzivna reakcija celičnih sten s sudan črnim nakazuje prisotnost suberina. Svetlo polje, sudan črno, merilna črtica 100 µm. **b)** V UV svetlobi je sudan črno zakril avtofluorescenco, fluorescirajo samo lignificirane celične stene. UV svetloba, filter UV-2A, sudan črno, merilna črtica 100 µm. 23
- Slika 12:** Navadni divji kostanj (*Aesculus hippocastanum* L.), prečni prerez, datum poškodbe 10. 8. 2006, osemindvajset dni po poškodovanju. Detajla s slike 9. **a)** Svetlo polje, sudan črno, merilna črtica 50 µm. **b)** UV svetloba, filter UV-2A, merilna črtica 50 µm. 23

- Slika 13:** Navadni divji kostanj (*Aesculus hippocastanum* L.), prečni prerez, datum poškodbe 10. 8. 2006, osemindvajset dni po poškodovanju. **a)** V celicah, ki ustrezajo ligno-suberinskemu sloju, so vidni modro obarvani depoziti. Pod ligno-suberinskim slojem se je razvil nov felogen v lokalno sklenjenih tangencialnih pasovih. **b)** Detajl ligno-suberinskega sloja, pod katerim novega felogena še ni. Svetlo polje, safranin in astra modro, merilna črtica 100 µm. 24
- Slika 14:** Navadni divji kostanj (*Aesculus hippocastanum* L.), prečni prerez, datum poškodbe 10. 8. 2006, petintrideset dni po poškodovanju. Na prečnem prerezu so tkiva vidna kot bradavičasta tvorba. Svetlo polje, floroglucinol, merilna črtica 100 µm. 25
- Slika 15:** Navadni divji kostanj (*Aesculus hippocastanum* L.), prečni prerez, datum poškodbe 10. 8. 2006, petintrideset dni po poškodovanju. Detajl stika med poranitvenimi tkivi in eksponiranim ksilemom debla v svetlem polju (slika a) in UV svetlobi (slika b). **a)** Svetlo polje, floroglucinol, merilna črtica 100 µm. **b)** UV svetloba, filter UV-2A, merilna črtica 100 µm. 25
- Slika 16:** Navadni divji kostanj (*Aesculus hippocastanum* L.), prečni prerez, datum poškodbe 10. 8. 2006, petintrideset dni po poškodovanju. Sklenjen ligno-suberinski sloj v svetlem polju (slika a) in UV svetlobi (slika b). Pod njim se razvija nov periderm. **a)** Svetlo polje, floroglucinol, merilna črtica 100 µm. **b)** UV svetloba, filter UV-2A, merilna črtica 100 µm. 26
- Slika 17:** Navadni divji kostanj (*Aesculus hippocastanum* L.), prečni prerez, datum poškodbe 10. 8. 2006, petintrideset dni po poškodovanju. Dva detajla delečih se celic pod ligno-suberinskim slojem. **b)** Puščica označuje novo nastalo celično steno. Svetlo polje, safranin in astra modro, merilna črtica 100 µm. 26
- Slika 18:** Navadni divji kostanj (*Aesculus hippocastanum* L.), prečni prerez, datum poškodbe 10. 8. 2006, dvainštirideset dni po poškodovanju. Struktura poranitvenih tkiv. Puščica nakazuje položaj vaskularnega kambija. Svetlo polje, ACA, merilna črtica 100 µm. 27

Slika 19: Navadni divji kostanj (*Aesculus hippocastanum* L.), radialni prerez, datum poškodbe 10. 8. 2006, dvainštirideset dni po poškodovanju. Detajl površinskega ligno-suberinskega sloja v svetlem polju (a) in UV svetlobi (b). **a)** Svetlo polje, sudan črno, merilna črtica 100 μm . **b)** UV svetloba, filter UV-2A, sudan črno, merilna črtica 100 μm . 28

Slika 20: Navadni divji kostanj (*Aesculus hippocastanum* L.), radialni prerez, datum poškodbe 10. 8. 2006, dvainštirideset dni po poškodovanju. Detajl površinskega tkiva, prikazan na sliki **a)** svetlo polje, floroglucinol, merilna črtica 100 μm in **b)** UV svetloba, filter UV-2A, floroglucinol, merilna črtica 100 μm . 28

Slika 21: Navadni divji kostanj (*Aesculus hippocastanum* L.), prečni prerez, datum poškodbe 10. 8. 2006, dvainštirideset dni po poškodovanju. Kombinacija barvil ACA jasno ilustrira lignificirane celične stene v svetlem polju (a) in UV svetlobi (b). **a)** ACA, merilna črtica 100 μm in **b)** UV svetloba, filter UV-2A, ACA, merilna črtica 100 μm . 29

Slika 22: Navadni divji kostanj (*Aesculus hippocastanum* L.), prečni prerez, datum poškodbe 10. 8. 2006, devetinštirideset dni po poškodovanju. V strukturi poranitvenih tkiv so bile opazne spremembe predvsem v površinskih celicah. Puščice kažejo na položaj vaskularnega kambija. **a)** Svetlo polje, sudan črno, merilna črtica 100 μm . **b)** UV svetloba, filter UV-2A, sudan črno, merilna črtica 100 μm . 30

Slika 23: Navadni divji kostanj (*Aesculus hippocastanum* L.), prečni prerez, datum poškodbe 10. 8. 2006, devetinštirideset dni po poškodovanju. Na površini se nahaja odmrlo tkivo. Pod njim je prisoten ligno-suberinski sloj, ki prehaja v plutne celice. Pod njim je felogen. Sledijo celice kalusa, kambij in notranji del kalusa. **a)** Svetlo polje, ACA, merilna črtica 100 μm . **b)** Svetlo polje, sudan črno, merilna črtica 100 μm . 30

Slika 24: Navadni divji kostanj (*Aesculus hippocastanum* L.), prečni prerez, datum poškodbe 10. 8. 2006, devetinštirideset dni po poškodovanju. Struktura ranitvenega periderma. **a)** Svetlo polje, floroglucinol, merilna črtica 100 μm . **b)** UV svetloba, filter UV-2A, floroglucinol, merilna črtica 100 μm , isti detajl, kot slika a). 31

1 UVOD

Mehanske poškodbe drevja so tako v gozdu kot tudi v mestih stalen pojav. Gre za ranitve drevesnih debel, ki so posledica človeških dejavnikov, divjadi, ali pa naravnih ujm.

Poranitvene aktivnosti drevesa je mogoče dobro opisati z modelom CODIT (Oven, 1997), odziv skorje na mehansko poškodovanje pa se najpogosteje razlaga z Mullick-Biggs-ovim modelom, ki predpostavlja nastanek ligno-suberinskega sloja in ranitvenega periderma (Kokolj, 2001). Ligno-suberinski sloj predstavlja začasno bariero, ki preprečuje izsuševanje tkiva in bakterijske okužbe, nadomesti pa jo trajnejši ranitveni periderm, ki se razvije pod njo.

Razvoj ligno-suberinskega sloja in ranitvenega periderma po mehanski poškodbi pri navadnem divjem kostanju (*Aesculus hippocastanum* L.) v različnih letnih časih je skromno raziskan. Namen naše raziskave je bil:

- raziskati razvoj tkiv v kalusu,
- preučiti nastanek kalusa.

2 DOSEDANJE RAZISKAVE

2.1 OPIS NAVADNEGA DIVJEGA KOSTANJA (*Aesculus hippocastanum* L.)

Poznamo približno petindvajset vrst divjega kostanja. Raste v zmerni klimi. Pri nas je najpogostejši navadni divji kostanj (*Aesculus hippocastanum*). Manj pogosti so še rdečecvetni divji kostanj (*Aescules x carnea*), ki je križanec med divjim kostanjem in ameriškim rdečecvetnim grmastim divjim kostanjem (*Aescules pavia*). Zraste le nekaj metrov v višino in je pri nas zelo redek (Brus, 1994).

Njegova prava domovina je severna Grčija, Albanija, del Makedonije in del Bolgarije. Čeprav glede tal ni pretirano zahteven, mu najbolj ustreza vlažno rastišče nižinskih gozdov na peščenih nanosih, ki so zelo pogosta v dolini Črnega Drima v Makedoniji. Tam divji kostanj raste za naše razmere v zelo nenavadni družbi – z orehom, vzhodno platano, jesenom, ostrolistim javorjem in jelšo. V Grčiji in Albaniji pogosto raste kar precej visoko v hribih in zlahka prenaša temperaturo do 30°C.

Že zelo zgodaj so navadni divji kostanj začeli saditi po vsej Evropi, zato ga danes najpogosteje srečujemo v parkih, drevoredih in ga vidimo kot okrasno drevo s široko, košato krošnjo z velikim premerom.

Navadni divji kostanj najdemo na več področjih. V gozdovih je pomemben kot meliorator tal, saj njegovi listi, ki padajo na tla, zelo hitro razpadajo in s tem bogatijo tla. Kostanjevo oglje se uporablja za smodnik za naboje. Plodovi divjega kostanja se po sušenju pripravijo za živalsko hrano in sicer tako, da lupino odstranimo ter seme zmeljemo in damo v vodo. V zimskem času je primeren kot kalorična hrana za divjad. Navadni divji kostanj se uporablja tudi v farmaciji, saj so že v času turških vojn Turki njegove plodove uporabljali za zdravljenje nekaterih konjskih bolezni. Od tod izhaja tudi ime kostanja *hippocastanum* (*hippo* – konj, *castanum* – kostanj) tudi ang. Horsechesnut (Brus, 1994).

Plodovi divjega kostanja pa so kljub neužitnosti zdravilni tudi za ljudi. Nekateri ljudje nosijo v žepu po tri kostanje, saj verjamejo, da jim to pomaga pri zdravju. Plodovi kostanja

naj bi nevtralizirali človeku škodljiva negativna zemeljska sevanja, vendar so ti učinki težko dokazljivi. Prav zdravilne učinke pa je konec 19. stoletja dokazal francoski zdravnik, ki je ugotovil, da je seme divjega kostanja izredno dobro in zdravi obolenje žil. Skorja vsebuje snov aesculin, ki ima sposobnost odbijanja UV žarkov in jo uporabljajo pri izdelavi krem za sončenje. Iz listov in cvetov pridobivajo različne snovi. Iz teh snovi izdelujejo tudi šampone za umivanje las. V ljudskem zdravstvu si pomagajo z namočenimi kostanjevimi cvetovi in listi v žitnem žganju pri težavah z venami, pri revmi in včasih proti črevesnim in želodčnim krčem.

Navadni divji kostanj (*Aesculus hippocastanum* L.) zraste v povprečju od 15 do 20 metrov, poredkoma tudi do 30 metrov v višino. Deblo navadnega divjega kostanja je ravno in relativno kratko ter doseže premer do 100 cm, tudi do 150 ali 200 cm. Lubje je temno rjave do sivo-rjave barve, je do 1 cm debelo in razvija tanke luske. Koreninski sistem navadnega divjega kostanja doseže v globino do 8 m in v horizontalni smeri od 10 do 15 m, včasih tudi do 20 m.

Zimski popki navadnega divjega kostanja so bleščeče rdeče-rjave barve, dolgi so do 23 mm in na dotik lepljivi. Stranski popki so nekoliko krajši (8 – 12 mm).

Listi navadnega divjega kostanja so dlanasti, sestavljeni iz pet do sedem lističev, ki so skupaj pritrjeni na dolg pecelj dolžine do 20 cm. Listič je do 20 cm dolg in 10 cm širok z nazobljenim robom. Spodnji del lista je nekoliko svetel in vzdolž lista rahlo dlakav.

Divji kostanj doseže popolno zrelost pri 10 do 15 letih, od takrat naprej vsako leto močno cveti med aprilom in majem. V socvetju najdemo kar tri različne vrste cvetov. V zgornjem delu socvetja so enospolni moški cvetovi z zakrnelim pestiščem, v osrednjem delu socvetja prevladujejo dvospolni cvetovi, v spodnjem delu pa se nahajajo cvetovi, ki jim prašniki zelo zgodaj odpadejo. Celoten cvet je visok do 30 cm in širok 12 cm. Posamezen cvet divjega kostanja meri okoli 15 mm v dolžino in 20 mm v širino in je zvončaste oblike z belkastno barvo. Rob cveta je valovit.

Plodovi, ki se razvijejo, so najprej bodeče zelene glavice, ki razpadejo na tri dele. V njih pa so ena do tri okroglasta, bleščeča kostanjeva rjava semena z značilno belo liso. Semena so nekoliko podobna semenom pravega kostanja (*Castanea sativa*), le da nimajo značilnega repka. Zaradi te podobnosti je dobil navadni divji kostanj tudi ime, čeprav si s pravim kostanjem nista v sorodu. (Brus, 1994)

2.2 ZGRADBA NAVADNEGA DIVJEGA KOSTANJA (*Aesculus hippocastanum* L.)

2.2.1 Makroskopski opis

Divji kostanj spada med difuzno (raztreseno) porozne listavce. Sekundarne spremembe v lesu navadnega divjega kostanja, zlasti ojedritev, še niso zadovoljivo pojasnjene. Grosser (1977) navaja navadni divji kostanj kot vrsto, pri kateri se beljava in jedrovina barvno ne ločita, in ga uvršča v skupino dreves, pri katerih se v osrednjem delu debla razvija zrelina. Vsekakor navadni divji kostanj nima obarvane jedrovine (črnjave), v osrednjem delu debla pa se pogosto razvije rjavkasto-rdeče obarvana diskoloracija. Les je svetel, rumenkasto bel, rahlo rdečkasto rjave barve. Letnice so v prečnem prerezu vidne kot svetle linije. Traheje so v prečnem prerezu komaj vidne, prav tako trakovi. Na vzdolžnih površinah ima les divjega kostanja fine reže in je rahlo progast zaradi nekoliko temnejšega kasnega lesa. Les je često zavite rasti, relativno lahek in mehak, ter srednje gost ($\rho_0=510 \text{ kg/m}^3$). V lesni industriji nima velikega pomena. Les se uporablja kot furnir v pohištveni industriji, v rezbarstvu in strugarstvu, za ortopedske pripomočke, škatle za cigare, risalne deske, teniške loparje, izdelavo lutk in kipov (Tsoumis, 1991). Prav tako se uporablja v parketarstvu.

2.2.2 Mikroskopski opis lesa navadnega divjega kostanja (povzeto po Kokalj, 2001)

Traheje: V prečnem prerezu so traheje razporejene difuzno, posamič in v radialnih skupinah tudi do 7 celic in v manjših gnezdih. So številne, 100 do 150 trahej na mm^2 oz. 60 do 105 trahej na mm^2 . V prečnem prerezu so lahko rahlo oglate in majhne, s tangencialnim premerom od 40 do 60 μm in redkeje tudi do 80 μm . V vzdolžnem prerezu so vidne enostavne perforacije in spiralne odebelitve. V trahejah zasledimo gumozne

depozite in priložnostno tile, ki so posamezne in se pojavljajo v diskoloraciji. V lesu divjega kostanja je 5,5 – 12,7 % trahej oz. por.

Aksialni parenhim: Razpored aksialnega parenhima je apotrahealen – difuzen.

Trakovi: Trakovi so v navadnem divjem kostanju izključno enoredni, v povprečju visoki 10 celic, maksimalna višina pa je od 25 – 30 celic (od 60 – 540 μm). Širina je 8 – 14 μm , tudi do 19 μm v tangencialni smeri. Trakovno tkivo je homogeno. V lesu divjega kostanja je od 13,1 do 16,8 % trakov in na 1 mm dolžine se običajno nahaja 12 – 16 trakov.

Vlakna: Osnovno tkivo divjega kostanja so libriformska vlakna, ki so razporejena v skoraj pravih radialnih nizih. Debelina stene libriformskega vlakna znaša 2,5 – 4,5 μm , tudi do 5,5 μm . Premer vlaken je od 4,5 – 13,0 μm . Dolžina libriformskega vlakna je od 640 – 1660 μm . V lesu divjega kostanja je od 74 – 78 % vlaken.

2.3 ODZIV DREVJA NA MEHANSKA POŠKODOVANJA MODEL CODIT (povzeto po Oven, 1997)

Shemo razvoja diskoloracij in razkroja po ranitvi pojasnjuje modelni koncept CODIT (Compartmentalization Of Decay in Trees = kompartmentalizacija razkroja v drevesih). Model temelji na štirih »stenah«, ki omejujejo oziroma preprečujejo širjenje učinkov poškodb, tj. diskoloracije in razkroja. Steno 1 predstavljajo tile (listavci), aspirirane obokane piknje (iglavci) in depoziti, ki blokirajo trahejne elemente in omejujejo širjenje neugodnih posledic poškodovalj v aksialni smeri. Zadnje debelostene celice kasnega lesa v braniki tvorijo steno 2, ki omejuje širjenje razkroja v radialni smeri. Stena 3 so trakovi in je vitalna komponenta, ki otežuje širjenje učinkov poškodb v tangencialni smeri, stena 4 ali barierna cona pa je diferenciacijska komponenta, ki loči tkivo, nastalo pred poškodovanjem in po njem. Barierna cona je razločen kolobar »bariernih celic«, ki jih producira kambij po mehanskih poškodbah. Shigo (1986) opisuje barierno cono kot tkivo z velikim deležem parenhima, z malo prevodnimi elementi, z nizko vsebnostjo lignina in vsaj pri nekaterih vrstah s suberiziranimi celičnimi stenami.

Stena 4 ali v literaturi uveljavljen izraz barierna cona je osrednji element modelnega koncepta CODIT (Compartmentalization Of Decay in Trees), ki poskuša pojasniti procese omejitve razkroja v drevesu z obstoječimi in novonastalimi zaščitnimi tkivi. Barierna cona je del poranitvenega lesa, ki ga tvori kambij po mehanskem poškodovanju, glivni okužbi ali obojem in zato predstavlja nespecifični obrambni mehanizem. Sestavlja jo tkivo z veliko osnega parenhima, z manj prevodnimi elementi, z manj lignina in vsaj pri nekaterih vrstah (hrast) s suberinom v celicah. Barierna cona je najučinkovitejša in najtrajnejša omejitvena stena.

2.4 ODZIV SKORJE NA MEHANSKA POŠKODOVANJA

Poleg rednih peridermov (površinski, globinski) se nov periderm razvije tudi po mehanskem poškodovanju ali infekciji žive skorje. Peridermi, ki se razvijejo po odmrtnju dela žive skorje (pri normalnem nastanku ritidoma ali po poškodovanju skorje), predstavljajo skupino ranitvenih peridermov, ki ščitijo živo tkivo pred neugodnimi posledicami odmiranja žive skorje. Ranitveni peridermi se vedno pojavljajo pod plastjo tkiva, ki je nepropustna za vodno raztopino železovih ionov. Kasnejše študije so pokazale, da je to tkivo suberizirano.

Nastanek ligno-suberinske plasti in ranitvenega periderma pod njim poteka pri večini golosemenk in kritosemenk v naslednjem zaporedju histoloških sprememb: (1) celice na površini poškodbe se izsušijo in odmrejo; (2) pod nekroznim tkivom se parenhimske celice osnega in trakovnega sistema povečajo (hipertrofija) in delijo (hiperplazija); (3) stene parenhima se odebelijo in olesenijo; (4) za tem še suberizirajo. (5) Pod tako nastalo ligno-suberinsko plastjo se z delitvami parenhimskih celic razvije nov felogen (6) in nato tudi nekrofilaktični periderm.

Mesto nastanka ligno-suberinske plasti je povezano s specifično anatomijo skorje posameznih drevesnih vrst (Oven, 1998).

2.5 NASTANEK KALUSA PO MEHANSKEM POŠKODOVANJU DREVESNIH TKIV

Pri vaskularnih rastlinah je kalus tkivo, ki nastane s profilacijo parenhimskih celic v procesu prekrivanja ran ali regeneracije.

Pri lesnatih rastlinah nastane kalusno tkivo predvsem iz nediferenciranih kambijevih derivatov in le v manjši meri tudi iz inicialne plasti kambija. Ne glede na njegov izvor se na površini kalusa najprej razvije nov felogen in kasneje že nov kambij globlje v kalusu. Predpogoj za nastanek felogena v kalusu je nastanek ligno-suberinskega sloja, ki se razvije iz živih parenhimskih celic, ki se v trenutku poškodovanja nahajajo v skorji. Ligno-suberinski sloj nudi začasno zaščito, ki jo nato relativno hitro nadomesti trajnejši periderm (Oven, 1999).

Tkiva, ki nastanejo po ranitvi drevesa, prerastejo poškodbe. Pri posebni obliki poškodb, ko pride do odstranitve skorje, sta pri procesu preraščanja rane lahko udeležena dva procesa; razvoj prevalitvenih tkiv na robovih poškodbe in nastanek t.i. površinskega kalusa na ekspaniranem lesu. V obeh primerih se proces prične z nastankom kalusa, kar omogoči razvoj obeh meristemov (kambija in felogena).

Vsa tkiva, ki nastanejo po ranitvi, označujemo tudi z izrazoma poranitvena ali ranitvena tkiva. Preraščanje se zaključi, ko je poškodba prekrita z novonastalimi tkivi in se obnovi krožna struktura obeh lateralnih meristemov, kambija in felogena ter kambij tvori normalen les.

Površinski kalus, ki nastane na površini lesa, s katerim je bila mehansko odstranjena skorja, lahko bistveno prispeva k hitrejšemu preraščanju poškodbe. Pod nastalim kalusom se lesna tkiva ne obarvajo in v njih izostanejo razkrojni procesi. Nemški raziskovalci so proučevali način sanacije mehanskih poškodb z uporabo različnih folij in premazov. Ugotovili so, da za svetlobo nepropustna zaščitna folija, nameščena preko poškodbe, zagotavlja višjo vlažnost pod njo in tako pozitivno vpliva na razvoj površinskega kalusa. Odziv na poškodbo je bolj intenziven, če je s premazom ali zaščitno folijo zaščitena sveža poškodba. Niso pa še ugotovili, zakaj se na nekaterih poškodbah kalus ne tvori, čeprav so bile zaščitene na isti način kot druge, na katerih je kalus nastal (Marion, 2007).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 IZBOR TESTNIH DREVES, ZASTAVITEV POSKUSOV IN ODVZEM VZORCEV

Izbrali smo zdravo drevo navadni divji kostanj (*Aesculus hippocastanum* L.) prsnega premera cca. 40 cm, in sicer v Ljubljani na Rožniku, v neposredni bližini Gozdarskega inštituta. Drevo v spodnjem delu debla, kjer smo želeli opraviti poskus, ni imelo vidnih mehanskih poškodb.

V deblo smo v prsni višini z olfa nožem zarezali obliko kvadrata dimenzij 30 x 30 mm, ter 15 mm globoko do kambija, nato pa z dletom in kladivom dobljeni košček dokončno izločili iz skorje. Na ta način smo eksponirali ksilemski cilinder. Takih izdolbin – poškodb je bilo osem, vse so bile enakih dimenzij, med seboj pa so bile odmaknjene od 3 – 5 cm. Vseh osem poškodb je bilo narejenih 10. 8. 2006. Iz teh poškodb smo nato tedensko, vsak teden z druge poškodbe, jemali vzorce, katere smo nadalje obdelovali, tako da smo dobili preparate za opazovanje pod mikroskopom. Na dan 10. 8. 2006 smo odvzeli prvi, referenčni vzorec. Postopek odvzema vzorca: najprej smo si ogledali poškodbo, nato smo na primernem mestu zarezali z olfa nožem od 8 – 12 mm globoko v vertikalni smeri, v horizontalni smeri pa smo z dletom in kladivom pazljivo izdoblili iz drevesa vzorec višine cca. 13 mm, širine cca. 8 mm in globine cca. 8 mm. (Slika 1)

Vsak odvzet vzorec je bil takoj po odvzemu shranjen v FAA (ocetna kislina, alkohol, formalin). Vzorci so bili vzeti v časovnem zaporedju, ki je razvidno iz tabele (Preglednica 1): ničti odvzem: 10. 8. 2006. Deblo smo na mestu poškodb prekrili s črno PVC folijo, tako da so bile rane ves čas zakrite. Odstranili smo jo enkrat tedensko, med postopkom jemanja vzorca. Vse vzorce smo jemali tako, da so bili pripravljeni za prečno usmerjene rezine.

Preglednica 1: Datumi in nazivi odvzetih vzorcev. Prvi odzem (oznaka I) je bil opravljen na dan poškodovanja drevesa. Datum poškodovanja 10.8.06.

datum odvzema	10. 8. 2006	17. 8. 2006	24. 8. 2006	31. 8. 2006	7. 9. 2006	14. 9. 2006	21. 9. 2006	28. 9. 2006
oznaka odvzema	0	I	II	III	IV	V	VI	VII
št. dni po poškodbi	0	7	14	21	28	35	42	49



Slika 1: Poškodba na deblu navadnega divjega kostanja (*Aesculus hippocastanum* L.). Vidno je mesto, kjer je bil odvzet vzorec, prav tako pa tudi odziv drevesa na poškodbo.

3.2 OPIS POSTOPKA PRIPRAVE ODVZETIH VZORCEV ZA VKLOP V PARAFINU (povzeto po Marion, 2007)

Namen postopka je s parafinom utrditi vzorce, da jih kasneje lažje mehansko obdelujemo - režemo na tanke rezine. Vzorce za raziskavo nastanka površinskega kalusa smo po sedmih dneh vzeli iz FAA in jih nato hranili v 50 %-nem etanolu. Pred postopkom prepajanja s parafinom smo s pomočjo britvice, mikrotomskih nožev in kladiva oblikovali vzorce na dimenzije 2 x 2 x 4 mm, katere smo nato položili v označene histološke kasete.

Prepajanje vzorcev v tkivnem procesorju

V košaro tkivnega procesorja Leica TP 1020 smo zložili vse kasete z vzorci. Postopek prepajanja vzorcev v tkivnem procesorju je trajal približno 20 ur. Po zaključenem postopku prepajanja smo kasete vzeli iz košare in jih položili na ploščo parafinskega dispenzerja

Leica EG 1120, ki je bila segreta na 60°C. Na plošči smo poleg kaset greli tudi kovinske kalupe, da se staljeni parafin ob stiku z njimi ni strdil. Posamezne kasete z vzorci smo odprli, pokrovčke zavrgli, spodnji del pa segrevali. V dno segrelih kalupov smo natočili staljeni parafin in s pomočjo ogrevane pincete Leica EG F vzeli vzorce iz kaset ter jih pravilno orientirane položili v dno kalupa. Kalup smo skupaj z orientiranim, ki smo ga še držali s pinceto, prenesli do posode s hladno vodo. Dno kalupa smo potopili v vodo za toliko časa, da se je parafin na dnu začel strjevati (postajal je bele barve) in da je vzorec ostal fiksiran in pravilno orientiran tudi, ko smo odmaknili pinceto. Kalup smo potem prekrili z ogretim spodnjim delom kasete z oznako vzorca in ga s parafinom zalili do vrha kasete. Kalupe z vzorci smo ohladili pri sobni temperaturi in jih nato v zmrzovalniku hladili približno pol ure. Nato smo parafinske bloke vzeli iz kalupov.

3.3 PRIPRAVA VZORCEV ZA ANATOMSKE PREISKAVE

Utrjene vzorce, prepojene s parafinom v postopku priprave vzorcev za anatomske preiskave, narežemo z drsnim mikrotomom Reichert v prečni ksilotomski ravnini. Rezina je debela 20 µm. Rezine so lahko v neprekinjenem nizu, tudi po šest rezin skupaj. Previdno jih s pomočjo paličic nesemo v toplo vodo. Voda mora biti topla zato, da se rezine s parafinom lepo razprostrejo in se vse gubice izravnavajo. Sledi lovljenje rezin na stekla. Pri tem smo pazili, da smo rezine zajeli na steklo, saj se le tako niso ponovno nagubale. Pri pripravljanju preparatov smo uporabili štiri različna barvila za barvanje.

3.4 BARVILA ZA HISTOKEMIČNE TESTE (povzeto po Oven, 1997)

3.4.1 Akridin krisoidin astra modro (ACA)

Tkiva smo obarvali s polikromatsko kombinacijo akridin rdeče/krisoidin + astra modro. Pripravili smo naslednje raztopine barvil: Akridin/krisoidin: 0,5 g akridina rdeče + 0,5 g krisoidina v 190 ml destilirane vode + 1 ml očetne kisline. Astra modro: 1 g barvila na 100 ml destilirane vode + 3 kapljice očetne kisline. Barvanje smo izvedli po naslednjem postopku: 5 min v raztopini akridin rdeče/krisoidin, sledi izpiranje v vodi, dokler v vodi ni več sledi barvila. Nato barvamo 5 min z astra modrim, in ponovno izpiramo v vodi. Kombinacija barvil akridin rdeče/krisoidin + astra modro reagira z ligninom. V

ultravijolični svetlobi je vidna rumena sekundarna fluorescenca lignina, zato pride do izraza svetlomodra avtofluorescenca suberina. Astra modro zatemni primarno fluorescenca celuloze. Kombinacija akridin rdeče/krisoidin + astra modro je primerna tudi za preiskave v svetlem polju in lahko nadomesti barvila safranin/fast green. Rezine smo vklopili v euparal (trajni preparati) ali v mešanico vode in glicerina (netrajni preparati).

3.4.2 Floroglucinol + HCl

Postopek barvanja s floroglucinolom je bil sledeč: 0,2 g floroglucinola smo raztopili v 1,6 ml HCl in v 8,2 ml 70 % alkohola. Barvanje je trajalo eno minuto, oziroma dokler se rezina ni obarvala rdeče.

2 % Fl v 17 % HCl oz. 0,2 g Fl + 1,6 ml HCl + 8,2 ml v 70 % alkoholu

Preparat smo opazovali pod UV svetlobo (filter UV-2A) in svetlem polju. V svetlem polju je lignin obarvan rdeče. Pod UV lignina ne opazimo, fluorescira pa suberin.

3.4.3 Sudan črno

Pripravili smo nasičeno raztopino sudana v 95 %-nem alkoholu, dodali enako količino glicerina, tako, da je bilo razmerje 1:1 (sudan:glicerin). Obe komponenti smo zmešali in filtrirali na rezino.

Rezino smo izpirali v glicerinu ali v mešanici glicerina in alkohola. Če se barva ni dobro prijela, smo ponovili postopek barvanja in izpiranja. Rezino je bilo potrebno res temeljito izprati. Vklopili smo jo v čisti glicerin.

Preparat smo najprej opazovali v svetlem polju, kjer se sudan veže na lipide in suberin obarva črno. Nato smo preklopili na UV svetlobo, pri čemer smo uporabili filter UV-2A, kjer suberina nismo opazili, ker nima sekundarne fluorescence, fluoresciral pa je lignin.

3.4.4 Safranin in astra modro

Narezane rezine smo previdno, da se ne bi poškodovale, položili na urno steklo. Rezine smo najprej obarvali v safraninu (0,5 % razredčen safranin v 70 %-nem alkoholu). Po 10 – 15 minutnem namakanju v barvilo smo odvečno barvilo temeljito sprali s 70 %-nim alkoholom. Rezine smo obarvali še z astra modro (0,5 g astra modre, 100 ml vode, 3 kapljice Thymol CH_3COOH). Prav tako smo po 10 – 15 minutah odvečno barvo temeljito sprali s 95 %-nim alkoholom. Tkiva, ki so bila lignificirana, je safranin obarval rdeče, astra modra pa nelignificirano tkivo (celulozo) v modro. Obarvane in dobro sprane rezine smo položili na objektivno steklo in vsako rezino prelili z eno kapljico vklopnega medija euparala, nato pa počasi, s pomočjo igle, pokrili s krovnim steklom. Pri tem smo pazili, da pod krovnim steklom nismo ujeli zračnih mehurčkov. Odvečni euparal smo odstranili s čopičem. Tako pripravljene preparate smo obtežili s svinčnimi utežmi in počakali, da so se osušili. S tem smo dobili trajne preparate. Vsak preparat smo označili z oznako, ki je ustrezala oznaki vzorca.

3.5 METODOLOGIJA MIKROSKOPIRANJA

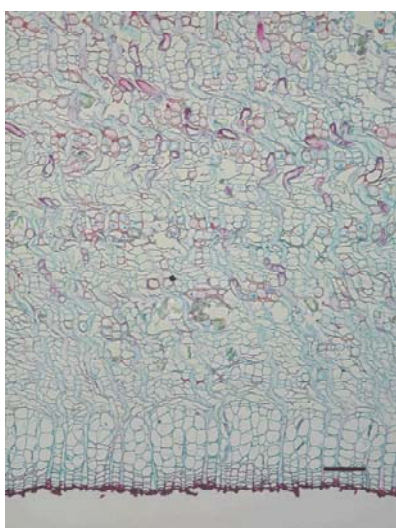
Za klasično anatomske opazovanje smo uporabili svetlo-poljsko mikroskopijo, za dokazovanje suberina pa fluorescentno tehniko. Vsa opazovanja smo opravili z raziskovalnim mikroskopom Nikon Eclipse E 800. Pri fluorescentni tehniki smo uporabili kombinacijo filtrov, ki so združeni v filternem bloku UV–2A. Blok vsebuje vzbujevalni filter (EX 330–380), dikroično zrcalo (DM 400) in barierni filter (BA 420). Za fotomikrofografijo smo uporabili digitalni fotoaparat Nikon Coolpix 995.

4 REZULTATI

4.1 HISTOLOŠKE SPREMEMBE PO MEHANSKEM POŠKODOVANJU

Stanje na dan poškodovanja

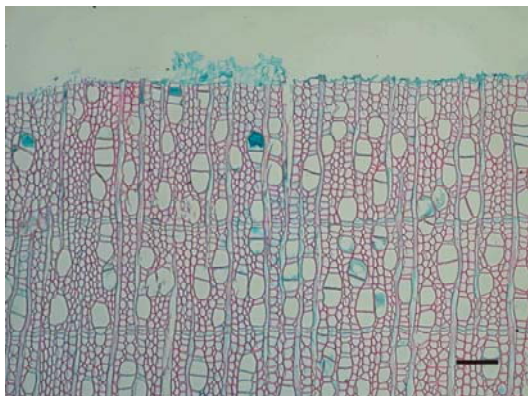
Peparat, ki ga opazujemo na sliki 2, prikazuje tisti kos skorje, ki smo ga na dan poškodovanja izdolbli iz drevesa. Namen opazovanja referenčnega vzorca je bil ugotoviti, kako smo dejansko poškodovali deblo. Naš cilj je bil poškodovati deblo po kambijevi coni. Kot kaže slika 2, nam je to dokaj dobro uspelo.



Slika 2): Navadni divji kostanj (*Aesculus hippocastanum* L.), prečni prerez, datum poškodbe 10. 8. 2006, na dan poškodovanja. Slika prikazuje floem, spodaj vidimo kambijevo cono, kjer je bil vzorec odtrgan. Svetlo polje, akridin krizoidin atsr modro (ACA), merilna črtica 100 μ m.

Sedem dni po poškodbi

Površinski kalus, ki je nastajal na površini ranitve, se je lokalno tvoril bolj intenzivno, medtem ko se na nekaterih mestih še ni pojavil. To bi utegnil biti razlog, da na preparatu na sliki 3 ni bilo videti niti ene prirasle poranitvene celice.



Slika 3): Navadni divji kostanj (*Aesculus hippocastanum* L.), prečni prerez, datum poškodbe 10. 8. 2006, sedem dni po poškodovanju. Svetlo polje, ACA, merilna črtica 100 μm.

Štirinajst dni po poškodbi

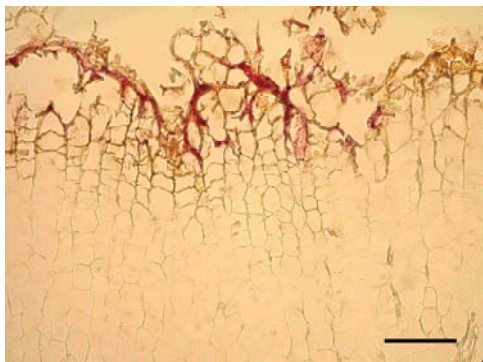
Na površini eksponiranega ksilema se je razvila jasno vidna kalusna blazina. Kalus so sestavljale bolj ali manj neurejene celice, pri čemer pa je bilo mogoče razlikovati tri plasti:

1. plast, ki se nahaja tik ob eksponiranem lesu,
2. plast, ki predstavlja celice na površini kalusne blazine,
3. plast, ki predstavlja celice v osrednjem delu kalusne blazine.

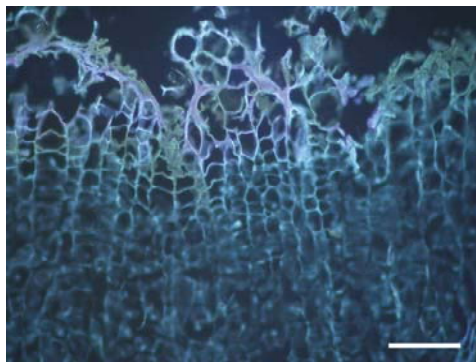
Celice v notranjem delu so urejene v pravilnih radialnih nizih. V tem območju je bilo mogoče brez težav razpoznati radialno usmerjeno trakovno tkivo.



a)



b)

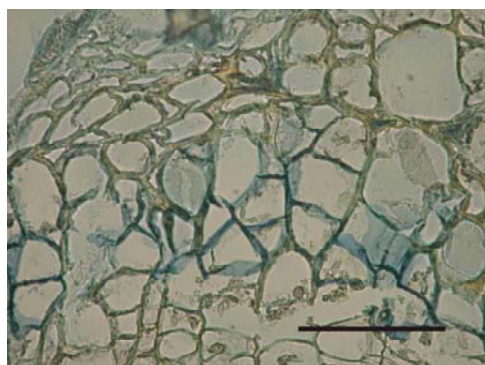


c)

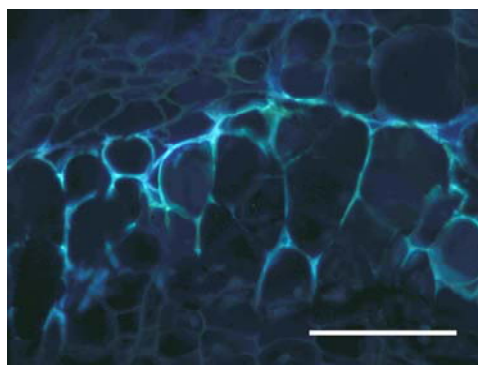
Slika 4: **a)** Navadni divji kostanj (*Aesculus hippocastanum* L.), prečni prerez, datum poškodbe 10. 8. 2006, štirinajst dni po poškodovanju. Na lesu debla se je razvila razločna kalusna blazina, na kateri se anatomske ločijo tri plasti. Svetlo polje, floroglucinol+HCl merilna črtica 100 μm . **b)** V zunanjem sloju so se nekatere celične stene pri uporabi floroglucinola obarvale rdeče, kar kaže na to, da so celične stene lignificirane. Svetlo polje, floroglucinol+HCl, merilna črtica 100 μm . **c)** Isti detajl, slikan z UV. Floroglucinol je zakril sekundarno fluorescenco lignina. UV filter UV-2A, floroglucinol+HCl, merilna črtica 100 μm .

Celice v osrednjem delu kalusne blazine so bile nepravilno urejene, hipertrofirane, celične stene so praviloma tanke, celice pa v prečnem prerezu ovalne ali izodiametrične. V posameznih celicah je bilo možno videti tudi jedra. Trakov v tem delu kalusne blazine ni bilo mogoče razpoznati.

V nadaljevanju smo tkiva preiskovali v svetlem polju in pri UV svetlobi, pri čemer smo uporabili barvilo floroglucinol+HCl in tudi sudan črno. Oba testa sta pokazala, da so imele posamezne celice oziroma celične stene že formiran intercelularni suberinski sloj. Pri prepratih, obarvanih z ACA (akridin krisoidin astra modro), pa na prisotnost suberina kaže modrikasta primarna fluorescenca, ko preparat opazujemo pod UV svetlobo. Pri obarvanju s sudan-črnim je bilo mogoče v svetlem polju jasno opaziti področja, kjer je barvilo reagiralo s celičnimi strukturami, pri opazovanju istega detajla v UV svetlobi pa primarne fluorescence nismo več opazili. Primarna fluorescenca, ki je vidna na sliki, je primarna fluorescenca lignina. Prisotnost lignina in suberizirane celične stene se je pojavila samo na posameznih delih površinskih tkiv, kar kaže na to, da se je na površini po štirinajstih dneh lokalno že razvil ligno-suberinski sloj.



a)



b)

Slika 5: a) Navadni divji kostanj (*Aesculus hippocastanum* L.), prečni prerez, datum poškodbe 10. 8. 2006, štirinajst dni po poškodovanju. Posamezne celične stene tkiv, ki se nahajajo na površini kalusa, izkazujejo pozitivno reakcijo s sudan črnim, kar dokazuje prisotnost suberina. Svetlo polje, sudan črno, merilna črtica 100 μm . b) UV svetloba, UV filter UV-2A, sudan črno, isti detajl, kot ga kaže slika a. Merilna črtica 100 μm .

Celice na površini kalusne blazine so odmrle. Imajo odebeljene, pogosto rjavo do rdeče obarvane celične stene. Preiskava zunanjskega sloja je na preparatih, obarvanih z ACA, razkrila, da čisto površinske celice skorajda nimajo fluorescence. Tik pod njimi pa smo zabeležili celice, ki izkazujejo sekundarno fluorescenco, ki je značilna za lignificirana tkiva. Očitno je, da se je pod površinsko odmrli celicami razvil sloj lignificiranih celic, ki bi utegnil imeti zaščitno funkcijo. Pod tem slojem so pozitivne reakcije barvila ACA z omenjenim tkivom.

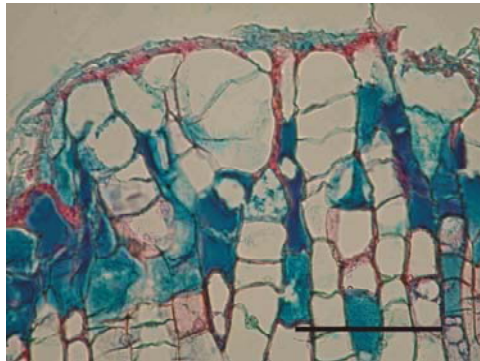
Enaindvajset dni po poškodbi

Preiskava tkiv na enaindvajseti dan po poškodbi je razkrila podobno anatomsko zgradbo, kot smo jo opazovali en teden prej.

Celice v notranjem delu kalusne blazine so bile urejene v pravilnih radialnih nizih. Opazne so bile debelejše celične stene kalusa. Najbolj očitne spremembe glede na štirinajsti dan pa so bile vidne na površini kalusa. Celice na površini kalusne blazine so imele vedno debelejše celične stene.



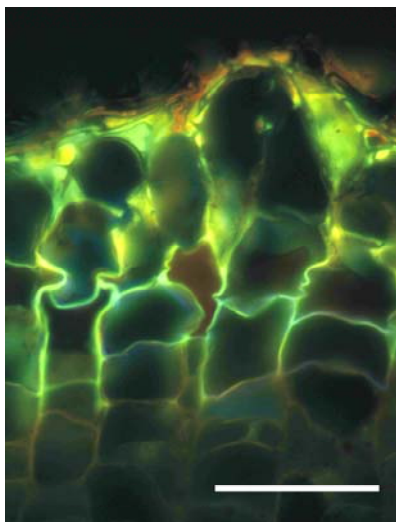
a)



b)

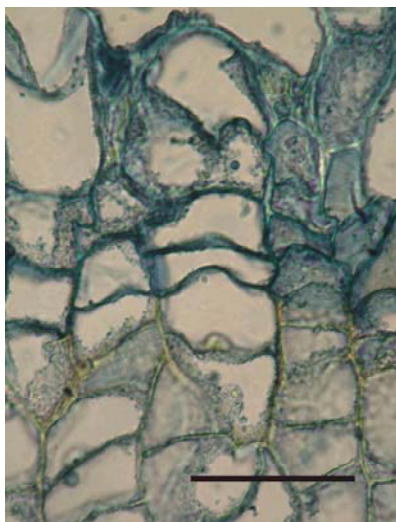
Slika 6: Navadni divji kostanj (*Aesculus hippocastanum* L.), prečni prerez, datum poškodbe 10. 8. 2006, enaindvajset dni po poškodovanju. **a)** Tkiva, ki so se pojavila na lesu debla. Najbolj očitne spremembe so bile vidne v površinskih celicah. Svetlo polje, ACA, merilna črtica 100 μm . **b)** Detajl površinskih tkiv, safranin in astra modro, merilna črtica 50 μm .

Nadaljnje preiskave zunanjega sloja in celic tik pod njim pri preparatih, obarvanih z ACA, so pokazale iste rezultate, kot štirinajst dni po poškodbi, le da je bila avtofluorescenca suberina in sekundarna fluorescenca lignina bolj intenzivna.

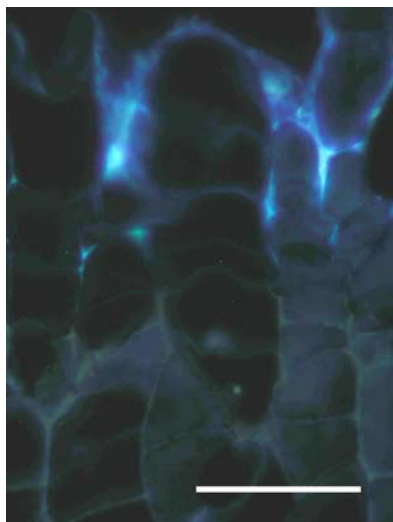


Slika 7: Navadni divji kostanj (*Aesculus hippocastanum* L.), prečni prerez, datum poškodbe 10. 8. 2006, enaindvajset dni po poškodovanju. Histokemična analiza površinskih tkiv. Iz slike je razvidna rumenkasto zelena sekundarna fluorescenca lignina, obarvanega z ACA. UV svetloba, filter UV- 2A, merilna črtica 50 μm .

Tudi test s sudan-črnim barvilom nam je dal iste rezultate. V svetlem polju je barvilo reagiralo s celičnimi strukturami, pri opazovanju istega detajla pri UV svetlobi pa primarne fluorescence ni bilo več moč zaznati, fluoresciral pa je lignin. Pod površinskim ligno-suberinskim slojem so bile celice urejene v dokaj pravilnih radialnih nizih. Pri večji povečavi je bilo mogoče v posameznih celicah že zaslediti nove celične stene, kar nakazuje, da je že začel nastajati nov plutni kambij, felogen.



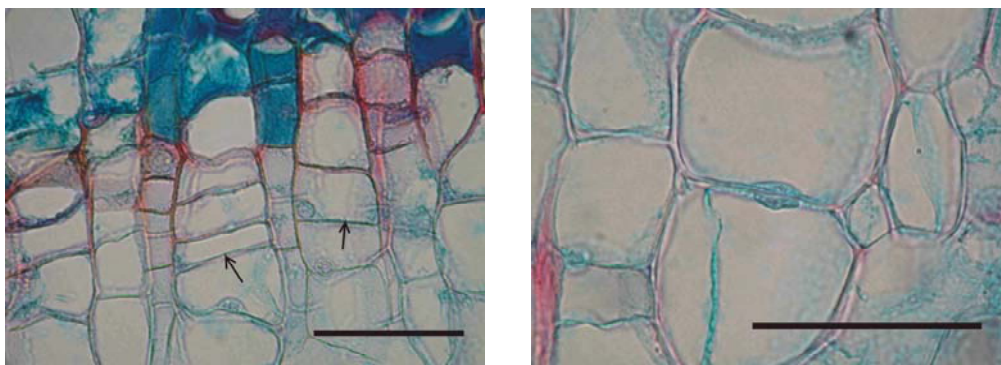
a)



b)

Slika 8: Navadni divji kostanj (*Aesculus hippocastanum* L.), prečni prerez, datum poškodbe 10. 8. 2006, enaindvajset dni po poškodovanju. Dokaz za suberizacijo celic. **a)** Svetlo polje, sudan črno, merilna črtica 50 μ m. **b)** Isti detajl, kot na sliki a. UV svetloba, filter UV-2A, sudan črno, merilna črtica 50 μ m.

V osrednjem delu kalusne blazine je bilo poleg hipertrofije in hiperplazije moč opaziti delitve celic, kar dokazuje slika 9. Razvidne so tudi oblike prvotne celice, ki so bile pred delitvijo napihnjene, sedaj pa so se že delile. Te delitve je potrebno interpretirati kot nadaljnje delitve kalusnih celic. Težko bi jih namreč označili kot delitve, ki kažejo na nastanek novega lateralnega meristema – vaskularnega kambija.



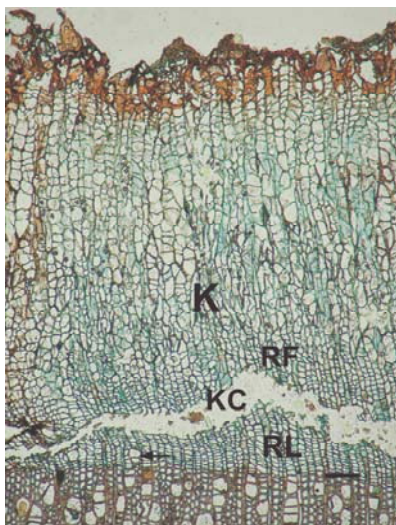
a)

b)

Slika 9: Navadni divji kostanj (*Aesculus hippocastanum* L.), prečni prerez, datum poškodbe 10. 8. 2006, enaindvajset dni po poškodovanju. **a)** Pod lignosuberinskim slojem so vidne nove celične stene, ki nakazujejo nastanek novega felogena. Svetlo polje, safranin in astra modro, merilna črtica 50 µm. **b)** Nove celične stene v osrednem delu kalusa potrjujejo delitveno aktivnost teh celic. Svetlo polje, safranin in astra modro, merilna črtica 50 µm.

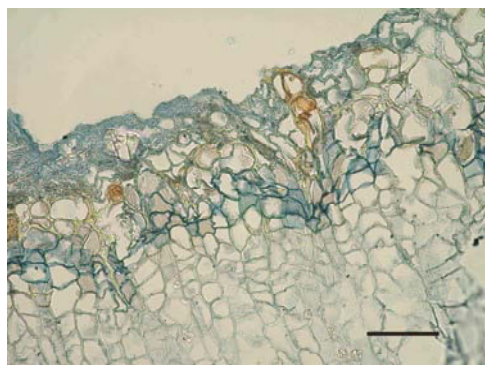
Osemindvajset dni po poškodbi

Opazovanje preparatov, odvzetih osemindvajset dni po poškodbi, je pokazalo nekoliko drugačno zgradbo tkiv, ki so se razvila na eksponiranem lesu debla. Celice tik ob ksilemskem tkivu debla so bile urejene v dokaj pravih radialnih nizih. Med temi celicami je bilo mogoče opaziti tudi posamezne celice z večjimi prečnimi dimenzijami, ki so bile podobne trahejam. Sestava te celične plasti pravzaprav kaže, da bi utegnile biti produkt novega vaskularnega kambija. Žal na anatomskem preparatu (slika 10) tega tkiva ni bilo mogoče videti, najverjetneje pa se je nahajalo na mestu raztrganine. Menimo tudi, da je tkivo, ki je nastalo na zunanji strani raztrganine/novega kambija, pravzaprav novo skorjino tkivo, ki ga je ta kambij proizvedel. Za domnevno skorjinim tkivom sledi kalus, kakršnega smo opazovali že enaindvajseti dan po poškodovanju. Za to tkivo so značilne celice nepravilnih oblik, praviloma z nelignificiranimi celičnimi stenami, podobno kot pri vzorcih iz prejšnjih odvzemov. Nadaljnje spremembe smo opazili tudi na površini kalusne blazine. Zaznali smo zelo intenzivno obarvanje z barvilom sudan črno (slika 11a), kar dokazuje prisotnost suberina. Pri opazovanju istega preparata v UV svetlobi se je izkazalo, da je ta celični sloj tudi močno lignificiran (slika 11b). Tako nastali ligno-suberinski sloj je bil praktično v celoti sklenjen.

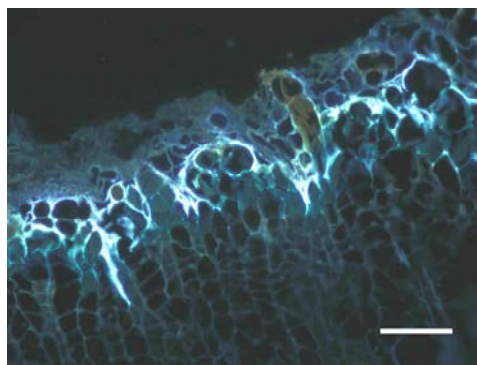


Slika 10: Navadni divji kostanj (*Aesculus hippocastanum* L.), prečni prerez, datum poškodbe 10. 8. 2006, osemindvajset dni po poškodovanju. Na sliki so označena naslednja tkiva: RL – ranitveni ksilem, KC – domneven položaj kambijeve cone, RF – ranitveni floem, K – kalus. Svetlo polje, ACA, merilna črtica 100 μ m.

Pri opazovanju s sudan črnim je bil jasno viden sklenjen ligno-suberinski sloj. Vse celice v verigi so bile namreč črno obarvane (v svetlem polju), kar pomeni suberizacijo celic. Pri opazovanju pod UV svetlobo je sudan zakril suberin, fluoresciral pa je lignin. Tako se na sliki 11b vidi prisotnost lignina v celičnih stenah tik pod površino kalusne blazine.

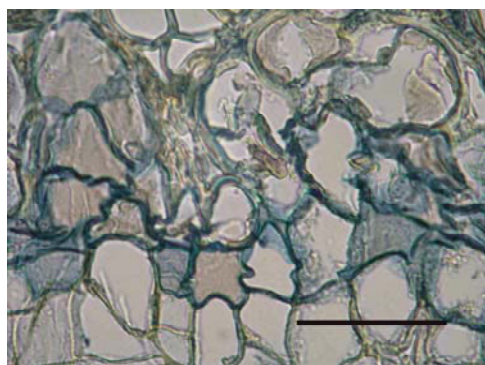


a)

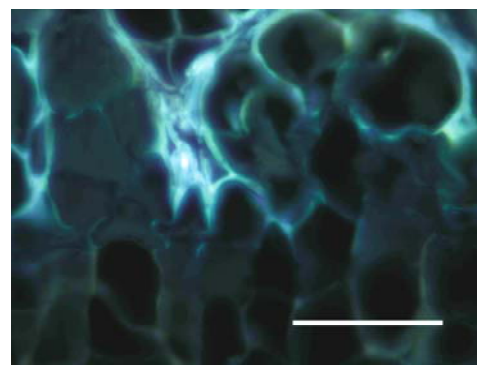


b)

Slika 11: Navadni divji kostanj (*Aesculus hippocastanum* L.), prečni prerez, datum poškodbe 10. 8. 2006, osemindvajset dni po poškodovanju. **a)** Intenzivna reakcija celičnih sten s sudan črnim nakazuje prisotnost suberina. Svetlo polje, sudan črno, merilna črtica 100 μm . **b)** V UV svetlobi je sudan črno zakril avtofluorescenca, fluorescirajo samo lignificirane celične stene. UV svetloba, filter UV-2A, sudan črno, merilna črtica 100 μm .



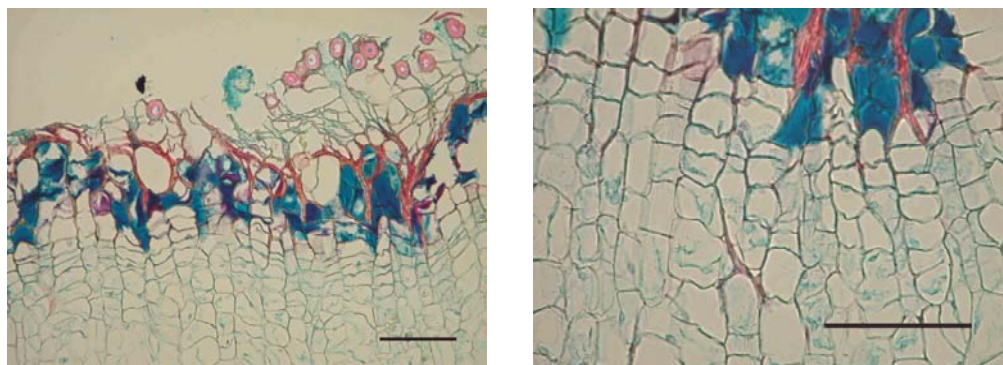
a)



b)

Slika 12: Navadni divji kostanj (*Aesculus hippocastanum* L.), prečni prerez, datum poškodbe 10. 8. 2006, osemindvajset dni po poškodovanju. Detajla s slike 9. **a)** Svetlo polje, sudan črno, merilna črtica 50 μm . **b)** UV svetloba, filter UV-2A, merilna črtica 50 μm .

Največji napredek glede na enaindvajseti dan po poškodovanju je zagotovo nastajanje novega plutnega kambija-felogena, ki se nahaja tik pod sklenjenim ligno-suberinskim slojem v tangencialni smeri (slika 13 a in b). Poleg lignina in suberina v tem celičnem sloju imajo zaščitno funkcijo tudi depoziti v celičnih lumnih (slika 13).



a)

b)

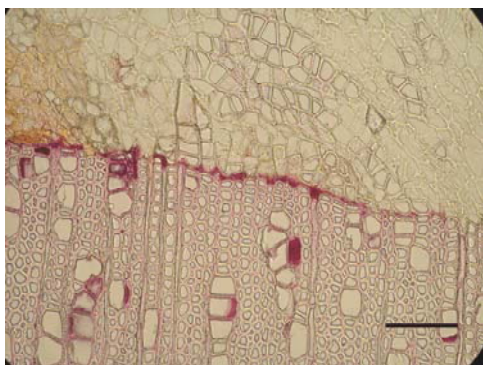
Slika 13: Navadni divji kostanj (*Aesculus hippocastanum* L.), prečni prerez, datum poškodbe 10. 8. 2006, osemindvajset dni po poškodovanju. **a)** V celicah, ki ustrezajo ligno-suberinskemu sloju, so vidni modro obarvani depoziti. Pod ligno-suberinskim slojem se je razvil nov felogen v lokalno sklenjenih tangencialnih pasovih. **b)** Detajl ligno-suberinskega sloja, pod katerim novega felogena še ni. Svetlo polje, safranin in astra modro, merilna črtica 100 µm.

Petintrideset dni po poškodbi

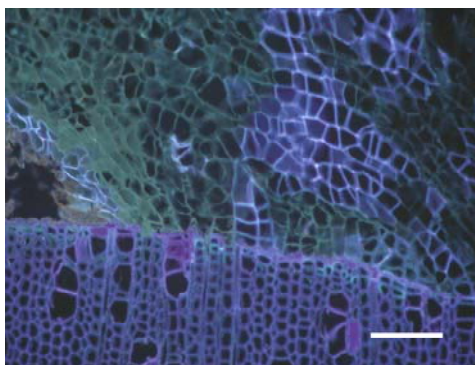
Za razliko od ranitvenega odziva, ki smo ga opazovali do osemindvajsetega dne, smo pri vzorcu, odvzetem na petintrideseti dan po poškodbi, zasledili bistveno drugačno strukturo oz. morfologijo poranitvenih tkiv. Na površini eksponiranega lesa je bilo tkivo videti kot nekakšna bradavičasta tvorba (slika 14), ki jo v celoti sestavljajo celice kalusa. V kalusnem tkivu so razločno vidna gnezda lignificiranih celic, kar dokazuje tudi slika 15. Celotna površina bradavičaste tvorbe je obdana s tkivom, ki po položaju in anatomiji ustreza ligno-suberinskemu sloju (sliki 16, 17).



Slika 14: Navadni divji kostanj (*Aesculus hippocastanum* L.), prečni prerez, datum poškodbe 10. 8. 2006, petintrideset dni po poškodovanju. Na prečnem prerezu so tkiva vidna kot bradavičasta tvorba. Svetlo polje, floroglucinol, merilna črtica 100 μ m.

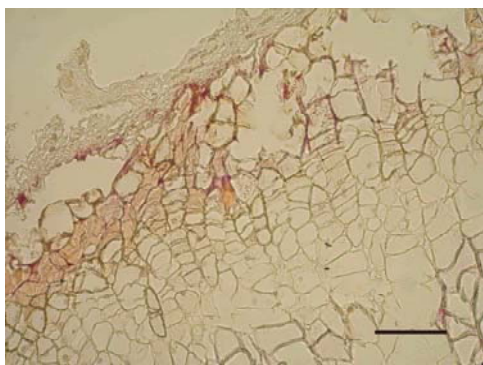


a)

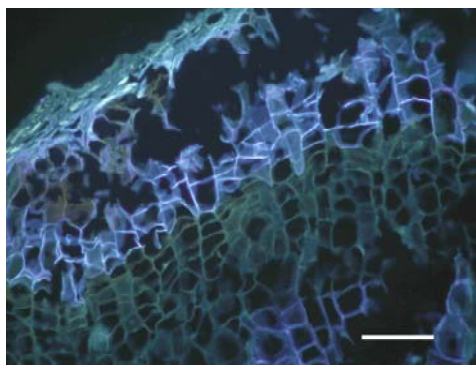


b)

Slika 15: Navadni divji kostanj (*Aesculus hippocastanum* L.), prečni prerez, datum poškodbe 10. 8. 2006, petintrideset dni po poškodovanju. Detajl stika med poranitvenimi tkivi in eksponiranim ksilemom debla v svetlem polju (slika a) in UV svetlobi (slika b). **a)** Svetlo polje, floroglucinol, merilna črtica 100 μ m. **b)** UV svetloba, filter UV-2A, merilna črtica 100 μ m.

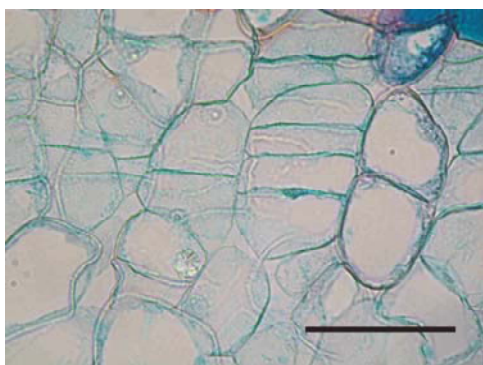


a)

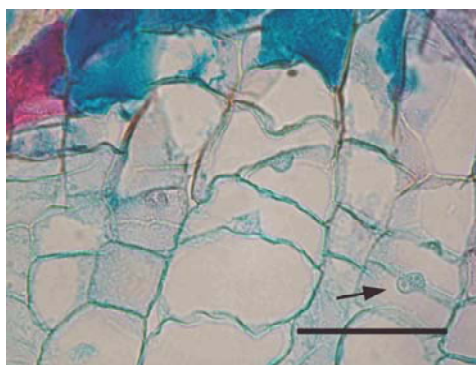


b)

Slika 16: Navadni divji kostanj (*Aesculus hippocastanum* L.), prečni prerez, datum poškodbe 10. 8. 2006, petintrideset dni po poškodovanju. Sklenjen ligno-suberinski sloj v svetlem polju (slika a) in UV svetlobi (slika b). Pod njim se razvija nov periderm. **a)** Svetlo polje, floroglucinol, merilna črtica 100 μm . **b)** UV svetloba, filter UV-2A, merilna črtica 100 μm .



a)

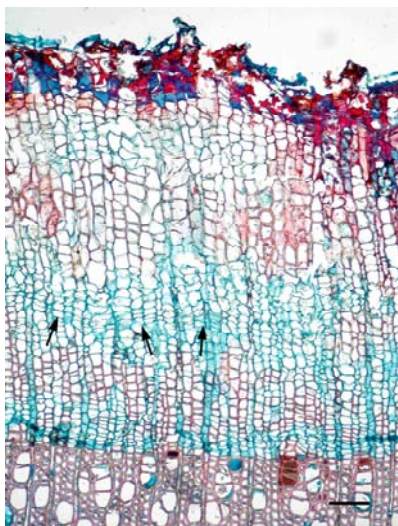


b)

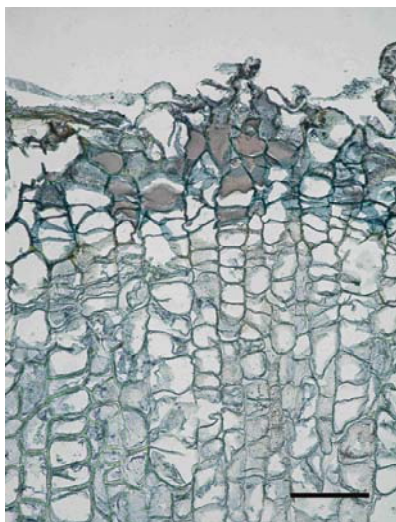
Slika 17: a) Navadni divji kostanj (*Aesculus hippocastanum* L.), prečni prerez, datum poškodbe 10. 8. 2006, petintrideset dni po poškodovanju. Dva detajla delečih se celic pod ligno-suberinskim slojem. **b)** Puščica označuje novo nastalo celično steno. Svetlo polje, safranin in astra modro, merilna črtica 100 μm .

Dvainštirideset dni po poškodbi

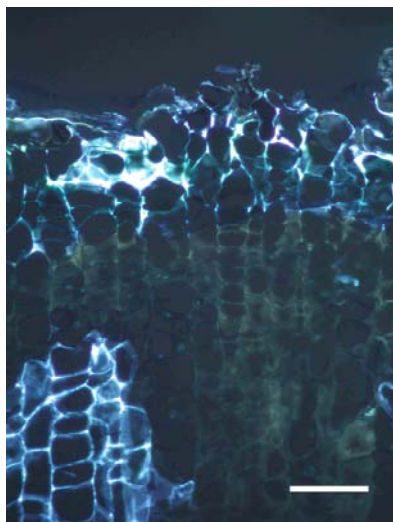
Stanje tkiv na dvainštirideseti dan po poškodbi ilustrira naslednjo razvojno stopnjo v strukturi takšnih poranitvenih tkiv, kot smo jih opazovali pri vzorcih, odvzetih na osemindvajseti dan po poškodbi. Sestava oziroma topografija teh tkiv odločilno določa pojav novega vaskularnega kambija v kalusnem tkivu (slika 18). Tik ob eksponiranem lesu debela je prisoten ranitveni les, ob katerem so nekatere celice lignificirane, nekatere pa ostajajo nelignificirane. Na posameznih mestih sledi vaskularni kambij in za njim nekaj celic skorje, nato pa kalusno tkivo. V kalusu se je povečal delež celic, ki imajo lignificirane stene. Posamezne celične stene so se tudi izrazito odebelile. Na površini bistvenih sprememb nismo več opazili.



Slika 18: Navadni divji kostanj (*Aesculus hippocastanum* L.), prečni prerez, datum poškodbe 10. 8. 2006, dvainštirideset dni po poškodovanju. Struktura poranitvenih tkiv. Puščica nakazuje položaj vaskularnega kambija. Svetlo polje, ACA, merilna črtica 100 μ m.

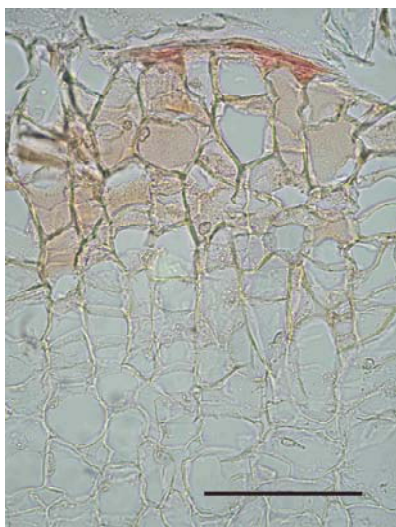


a)

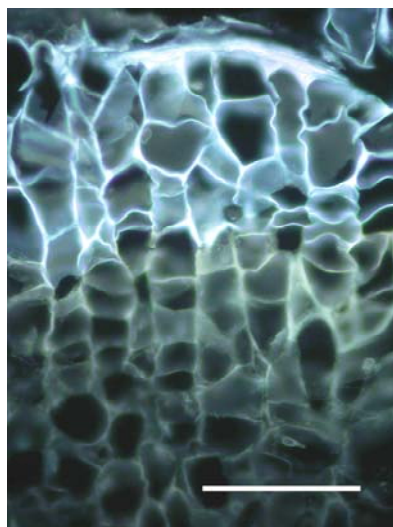


b)

Slika 19: Navadni divji kostanj (*Aesculus hippocastanum* L.), radialni prerez, datum poškodbe 10. 8. 2006, dvainštirideset dni po poškodovanju. Detajl površinskega ligno-suberinskega sloja v svetlem polju (a) in UV svetlobi (b). **a)** Svetlo polje, sudan črno, merilna črtica 100 μm . **b)** UV svetloba, filter UV-2A, sudan črno, merilna črtica 100 μm .



a)

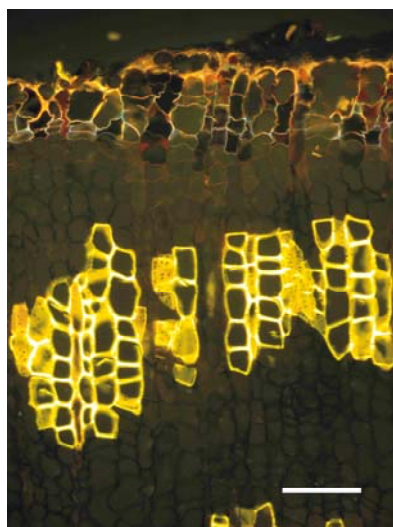


b)

Slika 20: Navadni divji kostanj (*Aesculus hippocastanum* L.), radialni prerez, datum poškodbe 10. 8. 2006, dvainštirideset dni po poškodovanju. Detajl površinskega tkiva, prikazan na sliki **a)** svetlo polje, floroglucinol, merilna črtica 100 μm in **b)** UV svetloba, filter UV-2A, floroglucinol, merilna črtica 100 μm .



a)

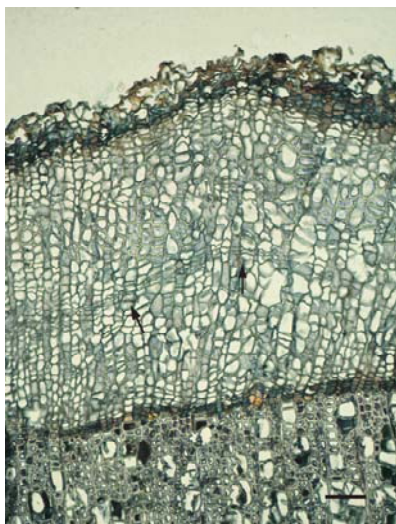


b)

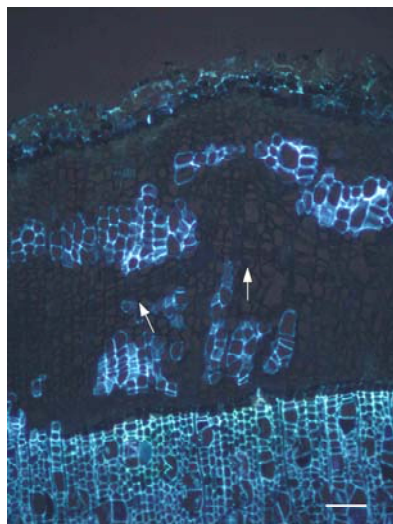
Slika 21: Navadni divji kostanj (*Aesculus hippocastanum* L.), prečni prerez, datum poškodbe 10. 8. 2006, dvainštirideset dni po poškodovanju. Kombinacija barvil ACA jasno ilustrira lignificirane celične stene v svetlem polju (a) in UV svetlobi (b). **a)** ACA, merilna črtica 100 μ m in **b)** UV svetloba, filter UV-2A, ACA, merilna črtica 100 μ m.

Devetinštirideset dni po poškodbi

Vzorci, vzeti devetinštirideseti dan po poškodbi, ilustrirajo razvojno fazo poranitvenih tkiv, ki so nastala do konca septembra. To je dejansko čas, ko se aktivnost meristemov v normalnih rastnih pogojih že konča. Menimo, da tudi anatomija poranitvenih tkiv odraža to stanje. Delitvenih aktivnosti vaskularnega kambija nismo več zasledili. Zdi pa se, da je nekoliko napredovala lignifikacija celic v tkivu pod kambijem, kot tudi v tkivu nad kambijem. Bistvene spremembe pa smo opazili v površinskih tkivih. Predpostavljati je mogoče, da so pod ligno-suberinskim slojem nastale tudi nove plutne celice, ki so prav tako suberizirane. Menimo, da jih je od ligno-suberinskega sloja možno razlikovati prav po radialni urejenosti celic. Slednja je značilna za tkivo, ki nastaja z delitvami felogena.

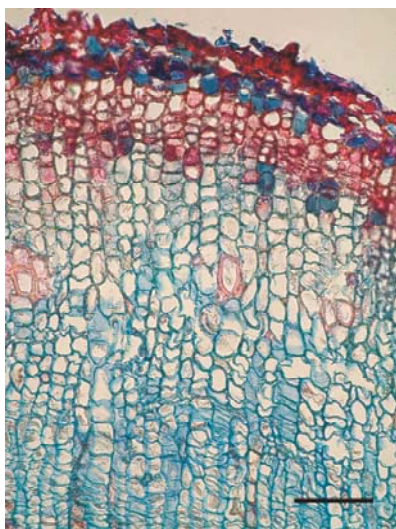


a)

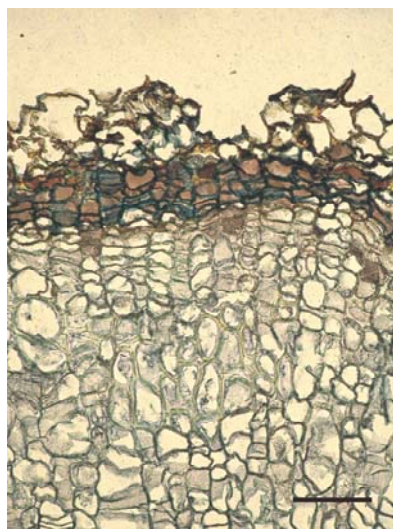


b)

Slika 22: Navadni divji kostanj (*Aesculus hippocastanum* L.), prečni prerez, datum poškodbe 10. 8. 2006, devetinštirideset dni po poškodovanju. V strukturi poranitnekih tkiv so bile opazne spremembe predvsem v površinskih celicah. Puščice kažejo na položaj vaskularnega kambija. **a)** Svetlo polje, sudan črno, merilna črtica 100 μm . **b)** UV svetloba, filter UV-2A, sudan črno, merilna črtica 100 μm .

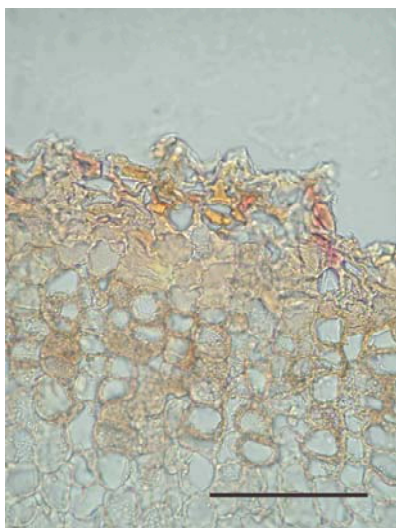


a)

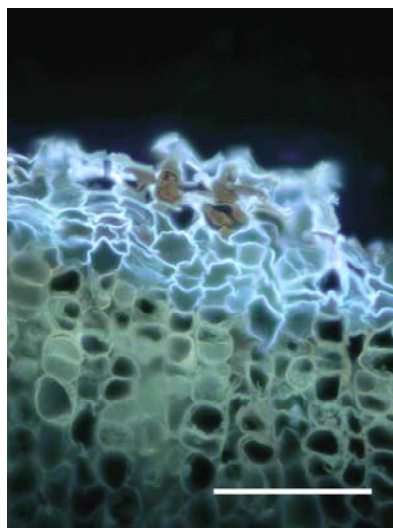


b)

Slika 23: Navadni divji kostanj (*Aesculus hippocastanum* L.), prečni prerez, datum poškodbe 10. 8. 2006, devetinštirideset dni po poškodovanju. Na površini se nahaja odmrlo tkivo. Pod njim je prisoten ligno-suberinski sloj, ki prehaja v plutne celice. Pod njim je felogen. Sledijo celice kalusa, kambij in notranji del kalusa. **a)** Svetlo polje, ACA, merilna črtica 100 μm . **b)** Svetlo polje, sudan črno, merilna črtica 100 μm .



a)



b)

Slika 24: Navadni divji kostanj (*Aesculus hippocastanum* L.), prečni prerez, datum poškodbe 10. 8. 2006, devetinštirideset dni po poškodovanju. Struktura ranitvenega periderma. **a)** Svetlo polje, floroglucinol, merilna črtica 100 μm . **b)** UV svetloba, filter UV-2A, floroglucinol, merilna črtica 100 μm , isti detajl, kot slika a.

5 SKLEPI

Proučevanje poranitvenih procesov na deblu navadnega divjega kosanja (*Aesculus hippocastanum*), je potekalo v obdobju od 10. 8. 2006 do 28. 9. 2006, ko se rastna sezona zaključuje.

Sedmi dan po poškodbi na površini rane ni bilo moč opaziti anatomskih sprememb.

V štirinajstih dneh po poškodbi se je na površini eksponiranega lesa razvila kalusna blazina. V kalusni blazini je bilo mogoče anatomsko razlikovati tri plasti: 1. plast se je nahajala tik ob eksponiranem lesu; 2. plast je predstavljala celice na površini kalusne blazine; 3. plast so predstavljale celice v osrednjem delu kalusne blazine. V nekaterih celicah na površini kalusa se je kot dodaten celični sloj pojavil suberin.

Enaindvajseti dan po poškodbi so bile celice v notranjem delu kalusne blazine urejene v pravih radialnih nizih, na površini kalusne blazine pa so bile prisotne tudi debelejšje celične stene. V osrednji plasti kalusne blazine se je odvijala hiperplazija in hipertrofija celic.

Osemindvajseti dan po poškodbi je v površinski plasti nastal nov plutni kambij, vedno tik pod sklenjenim ligno-suberinskim slojem v tangencialni smeri. Na površini kalusne blazine so se pojavili tudi depoziti v lumnih celic, ki imajo, podobno kot ligno-suberinski sloj, zaščitno funkcijo.

V petintridesetih dneh po poškodbi je postal ligno-suberinski sloj še bolj izrazit, zlasti pri opazovanjih v UV svetlobi. V srednjem delu kalusne blazine pa so se pojavila gnezda celic z lignificiranimi stenami.

Dvainštirideseti dan po ranitvi je zaznamoval pojav vaskularnega kambija in odebelitve celičnih sten v kalusni blazini.

Devetinštirideseti dan ni več bilo delitvenih aktivnosti vaskularnega kambija, pod ligno-suberinskim slojem pa so nastale nove plutne celice, ki so bile prav tako suberizirane. Napredovala je tudi lignifikacija celic v tkivu pod in nad kambijem.

Spremembe v ranitvenih tkivih so se odvijale vse do 28. 9. 2006. To je čas, ko se delitvena aktivnost meristemov v normalnih rastnih pogojih na tej geografski širini že konča.

Ključni dogodek v ranitvenem odzivu je bil nastanek ligno-suberinskega sloja, ki zaščiti poškodovano območje pred izsuševanjem in okužbo in tako omogoči nastanek obeh lateralnih meristemov, vaskularnega in plutnega kambija.

6 POVZETEK

V okviru te diplomske naloge smo raziskali zaporedje histoloških sprememb na površini eksponiranega lesa pri navadnem divjem kostanju (*Aesculus hippocastanum* L.). Proučevanje poranitvenih procesov na deblu navadnega divjega kostanja je potekalo v obdobju od 10. 8. 2006 do 28. 9. 2006. Za preiskave smo izbrali zdravo drevo v Ljubljani na Rožniku v neposredni bližini Gozdarskega inštituta. Drevo je imelo premer cca. 40 cm. Deblo smo poškodovali tako, da smo vanj zarezali z olfa nožem kvadrat dimenzij 30 x 30 mm približno 15 mm globoko. To ploskev smo nato z dletom odstranili z debla. Pri tem je bilo zelo pomembno, da smo zarezali do globine, kjer se nahaja kambijeva cona. Na dan poškodovanja smo opravili referenčni odvzem. Ta nam je služil za vpogled v tkiva, ki so bila odstranjena z debla (skorja z nekaj celicami kambija). Sledilo je tedensko jemanje vzorcev, vse do 28. 9. 2006. Vsakič smo v eno izmed poškodovanih mest zarezali z olfa nožem približno 8 – 12 mm globoko v vertikalni smeri, v horizontalni smeri pa smo z dletom in kladivom pazljivo izdolbili iz drevesa vzorec višine cca. 13 mm, širine cca. 8 mm in globine cca. 8 mm. Vzorec je vključeval les in morebitna poranitvena tkiva. Vsakič smo takoj za tem vzorec shranili v FAA (ocetna kislina, alkohol in formalin). Pri pripravi preparatov smo uporabili sledeča barvila: akridin krisoidin - astra modro (ACA), floriglucinol+HCl, sudan črno in safranin - astra modro. Vse preparate smo opazovali z raziskovalnim mikroskopom Nikon Eclipse E800; v svetlem polju in v UV svetlobi pri kombinaciji filtrov UV-2A.

Opazovanje poranitvenih tkiv, ki so nastala v sedemdnevni intervalih, je dalo sledeče rezultate.

Sedmi dan po poškodbi na površini rane ni bilo moč opaziti anatomskih sprememb. V štirinajstih dneh po poškodbi se je na površini eksponiranega lesa razvila kalusna blazina. V kalusni blazini je bilo mogoče anatomsko razlikovati tri plasti: 1. plast se je nahajala tik ob eksponiranem lesu; 2. plast je predstavljala celice na površini kalusne blazine; 3. plast so bile celice v osrednjem delu kalusne blazine. V nekaterih celicah na površini kalusa se je pojavil suberin. Enaindvajseti dan po poškodbi so bile celice v notranjem delu kalusne blazine urejene v pravih radialnih nizih, na površini kalusne blazine pa so imele celice debelejša celična stena. V osrednji plasti kalusne blazine se je odvijala hiperplazija in

hipertrofija celic. Osemindvajseti dan po poškodbi je v površinski plasti nastal nov plutni kambij, vedno tik pod sklenjenim ligno-suberinskim slojem v tangencialni smeri. Na površini kalusne blazine so se pojavili tudi depoziti v lumnih celic, ki imajo, podobno kot ligno-suberinski sloj, zaščitno funkcijo. V petintridesetih dneh po poškodbi je postal ligno-suberinski sloj še bolj izrazit, zlasti pri opazovanjih v UV svetlobi. V osrednjem delu kalusne blazine pa so se pojavila gnezda celic z lignificiranimi stenami. Dvainštirideseti dan po ranitvi je zaznamoval pojav vaskularnega kambija in odebelitve celičnih sten v kalusni blazini. Devetinštirideseti dan ni bilo več delitvenih aktivnosti vaskularnega kambija, pod ligno-suberinskim slojem pa so nastale nove plutne celice, ki so bile prav tako suberizirane. Napredovala je tudi lignifikacija celic v tkivu pod in nad kambijem. Spremembe v ranitvenih tkivih so se odvijale vse do 28. 9. 2006. To je čas, ko je delitvena aktivnost meristemov v normalnih rastnih pogojih na tej geografski širini že končana. Ključni dogodek v ranitvenem odzivu je bil nastanek ligno-suberinskega sloja, ki je zaščitil poškodovano območje pred izsuševanjem in okužbo in tako omogočil nastanek obeh lateralnih meristemov, vaskularnega in plutnega kambija.

7 VIRI

1. Brus R. 1994. Navadni divji kostanj. *Gea*, 6, 4: 54-55
2. Grosser D. 1977. Die Hölzer Mitteleuropas. Ein mikrophotografischer Lehratlas. Berlin, New York, Springer Verlag: 208 str.
3. Kokolj D. 2001. Zgradba lesa navidezno zdravih in različno prizadetih navadnih divjih kostanjev (*Aesculus hippocastanum*) v mestni občini Ljubljana: dipomska naloga. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo: 37 str.
4. Marion L. 2007. Sezonska aktivnost kambija in njegov odziv na mehanske poškodbe pri mestnem drevju: doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za gozdarstvo: 182 str.
5. Oven P. 1997. Odziv sekundarnega floema 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.): doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo: 167 str.
6. Oven P. 1998. Odziv drevesnih tkiv na poškodbe in infekcijo. 1, Živa skorja. Zbornik gozdarstva in lesarstva, 55: 113-133
7. Oven P. 1999. Odziv drevesnih tkiv na poškodbe in infekcijo. 2, Kambijeva cona. Zbornik gozdarstva in lesarstva, 58: 189-217
8. Shigo A. L. 1986. A new tree biology: Facts, photos and philosophies on trees and their problems and proper care. New Hampshire, Shigo and Tress Asociated: 595 str.
9. Tsoumis G. 1991. Science and technology of wood: Structure, properties, utilization. New York, Van Nostrand Reinhold: 461 str.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Primožu Ovnu za pomoč in vodenje pri izdelavi diplomske naloge in recenzentki prof. dr. Katarini Čufar. Prav tako se zahvaljujem tudi strokovnemu sodelavcu Martinu Zupančiču za požrtvovalno pomoč v laboratoriju.

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA LESARSTVO

Komentar [PB1]: -----
Platnica – samo ena stran

Komentar [PB2]: -----
ODDELEK BF

Marcel PIRNAT

Komentar [PB3]: ----- Ime
PRIIMEK

NASTANEK POVRŠINSKEGA KALUSA PRI
NAVADNEM DIVJEM KOSTANJU (*Aesculus*
hippocastanum)

Komentar [PB4]: -----
SLOVENSKI NASLOV DELA

DIPLOMSKO DELO

Komentar [PB5]: -----
VRSTA DELA

Visokošolski strokovni študij

Komentar [PB6]: ----- Vrsta
študija

Ljubljana, 2009

Komentar [PB7]: ----- Kraj,
Leto