

GDK: 812:813.11(045)

Prispelo / *Received*: 28. 4. 2004
Sprejeto / *Accepted*: 1. 6. 2004

Pregledni znanstveni članek
Scientific review paper

UPORABA TRANSMISIJSKE ELEKTRONSKE MIKROSKOPIJE TER UV-MIKROSPEKTROFOTOMETRIJE ZA DOLOČANJE LIGNINA V CELIČNI STENI IGLAVCEV

Jožica GRIČAR*, Katarina ČUFAR**

Izvleček:

Kalijev permanganat je kot reagent v transmisijski elektronski mikroskopiji (TEM) zelo uporaben za ugotavljanje prisotnosti lignina v različnih morfoloških področjih lesa. Ker je metoda le kvalitativna, je priporočljivo rezultate, ugotovljene s TEM, potrditi še s kakšno drugo kvantitativno metodo, kot je npr. UV-mikrospektrofotometrija (UMSP). Metoda UMSP je zelo primerna za določanje vsebnosti lignina in njegove porazdelitve v lesnem tkivu. V članku je predstavljena metodologija in uporabnost TEM ter UMSP pri proučevanju porazdelitve lignina v celični steni.

Ključne besede: UV-mikrospektrofotometrija, transmisijska elektronska mikroskopija, kalijev permanganat, svetlobna mikroskopija, lignin, celična stena, les, iglavci

APPLICATION OF TRANSMISSION ELECTRON MICROSCOPY AND UV-MICROSPECTROPHOTOMETRY FOR DETECTION OF LIGNIN IN CELL WALL OF CONIFERS

Abstract:

Potassium permanganate represents a useful tool in transmission electron microscopy (TEM) for the localization of lignin in various morphological regions of wood. Since this method only provides qualitative estimation, another quantitative method is recommended to verify the results obtained by TEM, such as UV-microspectrophotometry (UMSP). The UMSP method was found to be suited for the determination of lignin content and its distribution in woody tissue. The present paper provides a methodical description and presents the applicability of TEM and UMSP for studies in the topochemistry of lignin distribution within cell walls.

Key words: UV-microspectrophotometry, transmission electron microscopy, potassium permanganate, light microscopy, lignin, cell wall, wood, conifers

* univ.dipl.inž.les., Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo, Rožna dolina c.VIII/34, 1000 Ljubljana, SLO

**prof. dr., Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo, Rožna dolina c.VIII/34, 1000 Ljubljana, SLO

VSEBINA
CONTENTS

1	UVOD.....	91
	INTRODUCTION	
2	TRANSMISIJSKA ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA	
	(TEM).....	92
	TRANSMISSION ELECTRON MICROSCOPY (TEM)	
3	UV-MIKROSPEKTROFOTOMETRIJA (UMSP).....	94
	UV-MICROSPECTROPHOTOMETRY	
4	PRIMER UPORABE.....	97
	EXAMPLE OF APPLICATION	
5	ZAKLJUČKI.....	100
	CONCLUSIONS	
6	SUMMARY.....	100
7	VIRI.....	102
	REFERENCES	

1 UVOD

INTRODUCTION

Lignin skupaj s celulozo in hemicelulozami predstavlja eno od treh glavnih komponent celičnih sten ksilemskih elementov. Je amorfen polifenolni polimer, ki nastane iz treh hidroksi cinamil alkoholov: koniferil, sinapil ter p-kumaril alkoholov. Tridimenzionalni ligninski polimer nima pravilno razvrščenih in ponavljajočih se enot, kot je značilno za druge naravne polimere, npr. celulozo in proteine, zato je mogoče njegovo kompleksno strukturo predstaviti le z modeli. Lignin se v celično steno vgradi po predhodni odložitvi polisaharidov (TERASHIMA 2000). V procesu lignifikacije hidrofobne ligninske molekule zapolnijo prazne prostore v polisaharidnem matriksu, kar vpliva na trdnost, higroskopnost 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 od adultnega lesa, rani les večji delež od kasnega lesa in kompresijski les večji delež od normalnega lesa (KOLLMAN / CÔTÉ 1968, FENGEL / WEGENER 1989, SAKAKIBARA 1991, DENCE / LIN 1992, LEWIS 1999, TERASHIMA 2000, TORELLI 2000, DONALDSON 1985, 2001, HATFIELD / VERMERRIS 2001, ROUHI 2001).

Olesenela celična stena se oblikuje z zaporedno odložitvijo strukturnih polimerov, pektinskih substanc, hemiceluloz, celuloze in nazadnje lignina. Poleg glavnih komponent so v celični steni lahko prisotni še ekstraktivi. V celično steno se v različnem obsegu vključijo tri različne fenilpropanske enote nastale iz cinamil alkoholov, ki se med seboj razlikujejo po številu metoksilnih skupin (FENGEL / WEGENER 1989). Lignifikacija celične stene poteka postopoma. Najprej se prične v celičnih vogalih ter srednji lameli, kamor se odložijo predvsem p-hidroksifenilne enote. Kasneje se lignificira sekundarna celična stena. Pri iglavcih se tedaj odložijo predvsem gvajacilne enote. Siringilne enote se v zadnji fazi lignifikacije pojavijo v manjših količinah ob lumnu sekundarne celične stene. Vsebnost lignina je največja v združeni srednji lameli in proti lumnu postopoma upada. Sekundarna celična stena zajema največji volumski delež celotne celične stene, zato je v njej vsaj 70% lignina (TERASHIMA / FUKUSHIMA 1988, FENGEL / WEGENER 1989, FUKUSHIMA / TERASHIMA 1991, DENCE / LIN 1992, FUKAZAWA 1992, TERASHIMA 2000).

Zaradi opisanih lastnosti lignina, ki so posledica njegove molekularne zgradbe in porazdelitve v celični steni, je njegovo proučevanje oteženo. Za določanje lignina v lesu so na razpolago številne metode, kot npr. NMR (nuklearna magnetna resonanca), autoradio-

grafija, fluorescenčna mikroskopija, interferenčna mikroskopija, masna spektroskopija, FTIR (infrardeča spektroskopija), EPR (elektronska paramagnetna resonanca), SEM (vrstična elektronska mikroskopija) itd. (FENGEL / WEGENER 1989, DONALDSON 1991, 2001, DENCE / LIN 1992, TERASHIMA 2000). Med njimi sta tudi presečna oziroma transmisijska elektronska mikroskopija (TEM) ter UV–mikrospektrofotometrija (UMSP), katerih metodologijo in uporabnost za topokemijske raziskave lignina v celični steni bomo v nadaljevanju podrobneje predstavili.

2 TRANSMISIJSKA ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA (TEM) TRANSMISSION ELECTRON MICROSCOPY (TEM)

Eden najstarejših postopkov za ugotavljanje prisotnosti lignina po celični steni so barvne reakcije lignificiranega tkiva z različnimi anorganskimi in organskimi barvili, ki jim sledijo opazovanja s presevnim svetlobnim mikroskopom. Za proučevanje ultrastrukture celične stene se uporablja TEM, ker ima veliko večjo ločljivost od svetlobnega mikroskopa. Slika preparata pri TEM nastane s pomočjo curka elektronov, ki imajo pri veliki hitrosti zelo kratko valovno dolžino. Pri prehodu skozi raziskovani objekt prihaja do različnega sipanja elektronov na atomih z različnimi atomskimi števili. Zaradi sipanja elektronov na različno gostih predelih preparata, se ta območja različno kontrastirajo. 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, na katerih prihaja do velikega sipanja elektronov, imajo visoko atomsko število in veliko gostoto. Z ustrezno fiksacijo oziroma selektivnim obarvanjem različnih struktur je torej mogoče kontrast povečati. Barv v elektronski mikroskopiji ni, ker je vir iluminacije ene valovne dolžine določene s pospeševalno hitrostjo med katodo in anodo. Ko govorimo o barvah oziroma obarvanju pri TEM, mislimo na povečanje kontrasta. Temnejša področja imajo večjo gostoto in obratno. Zaradi prehajanja elektronskega žarka skozi preparat, mora slednji biti čim tanjši, med 50-100 nm (ROBINSON *et al.* 1987, GOODHEW / HUMPREYS / BEANLAND 2001).

Na ultrastrukturnem nivoju se kalijev permanganat (KMnO_4) poleg osmijevega tetroksida (OsO_4) pogosto uporablja v TEM kot fiksativ ali barvilo v citoloških študijah tako na rastlinskih kot živalskih tkivih. Kalijev permanganat se uporablja za kvalitativno dokazovanje prisotnosti lignina po celičnih steni (BLAND / FOSTER / LOGAN 1971, PARHAM 1974, KUTSCHA / SCHWARZMANN 1975, HOFFMANN / PARA-

MESWARAN 1976, COTÈ 1981, ROBINSON *et al.* 1987, SAKA 1991, 1992, DONALDSON 1991, 1992, 2001, SINGH / DANIEL 2001, CHAFFEY 2002, RENSING 2002, SCHMITT *et al.* 2003, SCHMITT / MECHER 2003, GRIČAR / ČUFAR / SCHMITT 2003). Je oksidant in reagira s komponentami lignina, zlasti z di-, tri- hidroksi fenoli, ki kalijev permanganat reducirajo v manganove okside (MnO_2 , Mn_2O_3), zato so elektronsko gostejša področja v slojih celične stene odvisna od prisotnosti fenolnih hidroksilnih skupin (BLAND / FOSTER / LOGAN 1971). Porazdelitev lignina v različnih slojih celične stene lahko s to metodo ocenimo le kvalitativno (SAKA 1992).

V raztopini KMnO_4 je manganatni(VII) ion močan oksidant v kislih, nevtralnih in bazičnih raztopinah. V kislih raztopinah poteka redukcija do manganovih(II) soli (LAZARINI / BRENČIČ 1992, SCHMITT / MECHER 2003):



Kadar v kislem dodajamo raztopinam manganovih(II) spojin kalijev manganat(VII), nastane manganov(IV) oksid.

V nevtralnih in šibko bazičnih raztopinah poteka redukcija do manganovega(IV) oksida:



Pri večjih pH vrednostih (bazične raztopine) pa poteka redukcija do manganatov(VI):



Ker se za kontrastiranje navadno uporablja KMnO_4 v vodni raztopini natrijevega citrata, največkrat poteka reakcija po drugem načinu (za šibke alkalne raztopine) zaradi pH vrednosti dodanega citrata (LAZARINI / BRENČIČ 1992, SCHMITT / MECHER 2003).

Bland in sod. (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 aldehydne skupine ($-\text{CH}=\text{CH}-\text{CHO}$). Pozitivne reakcije so pokazali torej vsi aldehydi, pri čemer je nefenolni aromatski aldehyd (benzaldehyd) pokazal minimalno pozitivno reakcijo, kar kaže na veliko reaktivnost fenolnih $-\text{OH}$ skupin. 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 / FOSTER / LOGAN 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 vsebuje poleg manganatnega iona tudi kationski kalij (K), ki naj bi se vezal na te kislinske skupine. Ker razliki v atomskih masah med kalijem K (39,1) in manganom Mn (54,9) nista veliki in imata oba atoma enako število elektronskih lupin, bi lahko pričakovali, da prihaja do podobnega sipanja elektronov. Torej, vsaj nativne kislinske hemiceluloze ter pektini naj bi se kontrastirale, če njihovi anionski centri niso vnaprej blokirani. Vendar pa naj bi do reakcije prišlo le pri predolgi izpostavitvi rezin relativno visokim koncentracijam KMnO_4 pri povišani temperaturi. Pri normalnih pogojih holoceluloze niso kazale vidnih reakcij s kalijevim permanganatom (BLAND / FOSTER / LOGAN 1971, PARHAM 1974).

Pri barvanju s KMnO_4 se 1% vodni raztopini kalijevega permanganata navadno doda 0,1% natrijevega citrata (SPURR 1969, KUTSCHA / SCHWARZMANN 1975, DONALDSON 1992, SCHMITT / MECHEER 2003). To naj bi povečalo reaktivnost lignificiranih delov celične stene in preprečilo reakcije z drugimi komponentami celične stene. Natrijev citrat naj bi reagiral 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 / SCHWARZMANN 1975).

Za TEM je potrebno pripraviti na ultramikrotomu z diamantnim nožem ultra tanke rezine (80-100 nm) in jih položiti na mrežice ter kontrastirati s kalijevim permanganatom, pri čemer se lignificirana, elektronsko gostejša področja celične stene kontrastirajo temneje, nelignificirana pa ostanejo svetla. Pospeševalna hitrost pri opazovanju preparata s TEM je zaradi večjega kontrasta navadno 40-60 kV. Za rezanje trših tkiv se uporabljajo diamantni noži, ker so zelo ostri in se le počasi obrabijo. Brezhibna ostrina je nujna za kvalitetne rezine neenakomernih debelin brez raz, gub in raztrganin.

3 UV-MIKROSPEKTROFOTOMETRIJA (UMSP) UV-MICROSPECTROPHOTOMETRY

Zaradi 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 semikvantitativno določevanje po-

razdelitve 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 (SCOTT *et al.* 1969, FENGEL / WEGENER 1989). Nobena druga komponenta celične stene nima UV absorpcijskih lastnosti v istem spektralnem območju kot lignin. Intenziteta absorpcije je odvisna od koncentracije lignina v posameznih območjih celične stene. UV absorpcijski maksimum zavisi od strukturne zgradbe lignina. Zaradi različnih razmerij gvajacilnih in siringilpropanskih enot je mogoče ločevanje med ligninom pri listavcih in iglavcih. Lignin iglavcev je v glavnem sestavljen iz gvajacilnih enot z absorpcijskim maksimumom pri 280 nm, lignin listavcev pa iz gvajacilnih in siringilnih enot v različnih razmerjih z absorpcijskim maksimumom pri nekoliko nižjih valovnih dolžinah, in sicer v območju med 270-278 nm (FENGEL / WEGENER 1989, SAKAKIBARA 1991). Razlike naj bi bile posledica večje simetričnosti fenilpropanskih enot lignina listavcev zaradi večjega deleža siringilnih enot (SCOTT *et al.* 1969, FUKUZAWA / IMAGAWA 1981, SAKA *et al.* 1982, BOUTELJE / ERIKSSON 1984, FENGEL / WEGENER 1989, SAKA 1991, SAKAKIBARA 1991, FUKAZAWA 1992, OKUYAMA *et al.* 1998, KLEIST / KOCH / BAUCH 1999, KOCH / KLEIST 2001, TAKABE 2002, KOCH / GRÜNWARD 2003).

Postopek priprave vzorcev za UMSP je podoben kot pri TEM. Kot fiksativ je mešanica formaldehida, očetne kisline in alkohola (FAA) za UV mikroskopijo boljša od glutaraldehida, ker 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. Včasih je potrebno vklonni medij odstraniti iz vzorca, zlasti pri določanju nizkih koncentracij lignina (FUKAZAWA 1992). Na ultramikrotomu je potrebno pripraviti z diamantnim ali steklenim nožem poltanke neobarvane rezine debeline 0,5-. Diamantni nož 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 (TAKABE 2002). Rezine je potrebno položiti na posebna kvarčna stekla. Kvarčna stekla nastanejo pri ohlajevanju taline SiO₂ 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. Rezinam se doda 1-3 kapljice imerzijskega glicerina, ki ne absorbira UV svetlobe, s čimer se poveča efektivna apertura objektivna in s tem lomni količnik ($n_D = 1,440$) (SCOTT *et al.* 1969). Ločljivost UV mikroskopa je boljša od svetlobnega mikroskopa, kljub temu pa še vedno dosti nižja od elektronskega mikroskopa. Študije navadno potekajo z UV mikroskopskim točkovnim merjenjem z velikostjo točke npr. 1 μm^2 (odvisno tudi od področja celične stene, v katerem se opravljajo meritve). V ustreznih pogojih lahko z UV mikroskopijo do-

bimo kvantitativne meritve koncentracije lignina po Beer – Lambertovem zakonu:

$$UV \text{ absorbanca} = \varepsilon \cdot C \cdot d \quad (5)$$

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 menili, je les iglavcev sestavljen predvsem iz gvajacilnih enot, zato je ε v različnih morfoloških območji celične stene konstanten (SCOTT *et al.* 1969, FUKAZAWA 1992, OKUYAMA *et al.* 1998, KLEIST / KOCH / BAUCH 1999, GINDL / GRABNER / WIMMER 2000, 2001, TAKABE 2002, KOCH / GRÜN WALD 2003).

Če domnevamo, da je debelina celične stene na prečnem prerezu poltankega preparata 1 μm , je vhodna intenziteta UV svetlobe I_o zmanjšana na intenziteto I_{cel} 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 *et al.* 1969, KOCH / GRUNWALD 2003):

$$UV \text{ absorbanca} = \log \frac{I_{lumen}}{I_{cel. stena}} \quad (6)$$

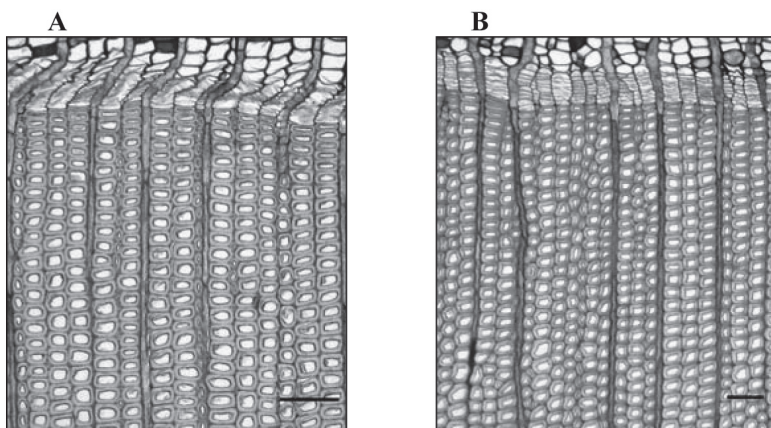
Z merjenjem UV absorpcije svetlobe v določenem območju valovnih dolžin, je mogoče pridobiti UV spekter določenega področja ksilemskega tkiva. Absorpcijski maksimumi UV spektrov so glede na monomerno sestavo lignina različni (FENGEL / WEGENER 1989, FUKAZAWA 1992, TAKABE 2002). Program LAMBDA SCAN® za Zeissov sistem UMPS je zelo primeren za spektralne analize. Intenzitete absorpcije UV-svetlobe v določenih območjih valovnih dolžin so merjene avtomatsko in prikazane v obliki spektrov.

Za podrobnejše raziskave porazdelitve lignina in fenolnih komponent v ksilemskem tkivu so pri Zeissu razvili UV spektrofotometrično skenirno napravo (UV spectrophotometric-scanning-device). Metoda omogoča neposreden vpogled v porazdelitev lignina v posameznih slojih celične stene, kakor tudi različne grafične in statistične analize z resolucijo 0,25 μm^2 . V primerjavi z UV mikroskopskim točkovnim merjenjem je v tem primeru topokemijska zgradba lignina lahko prikazana v dvodimenzijem ali tridimenzijem prerezu (KLEIST / KOCH / BAUCH 1999, KOCH / KLEIST 2001, KOCH / GRÜN WALD 2003).

4 PRIMER UPORABE EXAMPLE OF APPLICATION

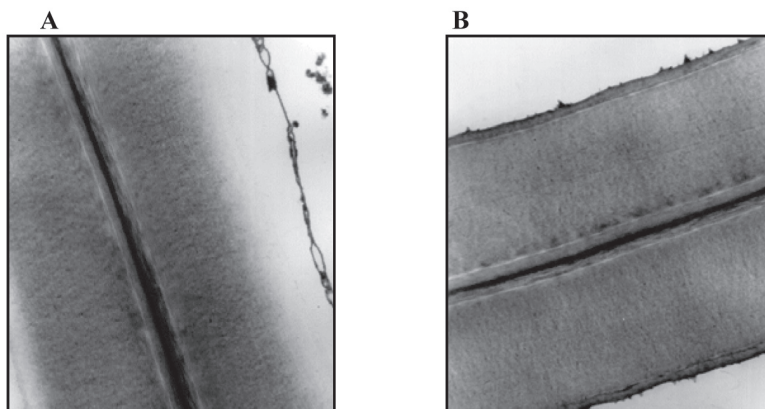
Metodi TEM in UMSP sta zelo uporabni pri proučevanju nastajanja celičnih sten elementov ksilemskega tkiva. Sliki 1A, 2A prikazujeta celične stene traheid kasnega lesa pri navadni jelki (*Abies alba*) v procesu njihovega oblikovanja, sliki 1B, 2B pa popolnoma diferencirane traheide kasnega lesa. Za proučevanje procesa diferenciacije lesnih celic smo uporabili različne metode. Za prvi vpogled v strukturo branik je najprimernejša klasična svetlobna mikroskopija. Preparati debeline 15-25 μm so obarvani s selektivnimi barvili (v našem primeru astra modro ter safranin) (slika 1). Modro se obarva celuloza, rdeče pa lignin. Iz teh preparatov lahko pridobimo zelo koristne informacije o stanju znotraj branike, saj preparati zajamejo velik del tkiva, navadno celotno ksilemsko braniko (pri ožjih tudi po več branik) in kambij. Na preparatih je mogoče opraviti tudi dodatne meritve z analizo slike in tako pridobiti kvantitativne podatke. Na osnovi teh opazovanj lahko v naslednjem koraku izberemo preparate in obenem tudi področja na preparatih za podrobnejše raziskave s pomočjo TEM in UMSP. Za TEM je potrebno pripraviti ultra tanke rezine (slika 2). Na sliki 2A je lepo razvidno, da proces lignifikacije celičnih sten vedno sledi odlaganju polisaharidov. Proces lignifikacije celičnih sten pri iglavcih in listavcih poteka podobno. Lignifikacija vedno sledi odlaganju polisaharidov in poteka v treh značilnih stopnjah. Najprej se prične v celičnih vogalih ter združeni srednji lameli, po tem ko se oblikuje S1 sloj sekundarne stene. Med oblikovanjem srednjega sloja S2 sekundarne celične stene poteka proces lignifikacije počasneje. Glavnina lignina se odloži po sintezi polisaharidov v sloju S3. Lignifikacija sekundarne stene se prične v zunanjem sloju S1 in se centripetalno širi proti lumnu. Lignifikacija srednjega sloja S2 ni zaključena pred pričetkom odlaganja notranjega sloja S3 sekundarne stene (WARDROP 1965, KUTSCHA / SCHWARZMANN 1975, SAKA / THOMAS 1982, DONALDSON 1991, 1992, 2001, TERASHIMA / FUKUSHIMA 1988, FUKUSHIMA / TERASHIMA 1991, TERASHIMA 2000, BRÄNDSTRÖM 2001, GRIČAR 2001, SCHMITT / MECHER 2003). Na sliki 2A sta celični steni traheid kasnega lesa v zadnji stopnji procesa diferenciacije. Združena srednja lamela, zunanji sloj S1 ter srednji sloj S2 sekundarne celične stene so oblikovani, medtem ko notranjega sloja S3 sekundarne celične stene ter bradavičastega sloja ni opaziti. Združena srednja lamela, sloj S1 sekundarne celične stene ter zunanje področje sloja S2 so se s kalijevim permanganatom temneje kontrastirali, medtem ko so notranja področja sloja S2 po kontrastiranju ostala svetla. V notranja področja sloja S2 se torej proces lignifikacije še ni razširil. Na sliki 2B je dobro vidna ultrastruktura večplastne celične stene. Celična stena je zgrajena iz srednje lamele, primarne stene ter slojevite sekundarne celične stene, ki jo sestavljajo zunanji sloj S1, srednji sloj S2 ter notranji sloj S3. Za navadno jelko

in tudi nekatere druge vrste iglavcev je značilen tudi bradavičasti sloj ob lumnu (WARDROP 1965, FENGEL / WEGENER 1989, FUJITA / HARADA 1991). Intenziteta kontrasta sovпада z vsebnostjo lignina v posameznem sloju celične stene (BLAND / FOSTER / LOGAN 1971, PARHAM 1974, KUTSCHA / SCHWARZMANN 1975, DONALDSON 1992, SCHMITT *et al.* 2003, SCHMITT / MECHER 2003). S KMnO_4 so se najintenzivneje obarvali združena srednja lamela, S3 sloj sekundarne celične stene ter bradavičasti sloj, najverjetneje zaradi večje vsebnosti lignina. Sloj S3 je bil v literaturi dostikrat omenjen kot visoko lignificiran, po splošnem mnenju naj bi bilo to odvisno od drevesne vrste (DONALDSON 1987, 2001). Meritve UV absorpcije v zunanjih področjih sekundarne celične stene so potrdile, da se proces lignifikacije v tem delu celične stene še ni pričel, saj je bila absorpcijska vrednost pri 280 nm okrog 0,0 (slika 3A). Pri popolnoma diferencirani traheidi je absorpcijski maksimum $\log \text{abs}_{280\text{nm}}$ v notranjem področju sekundarne celične stene znašal več kot 0,4 (slika 3B), kar je tipično za sekundarno steno traheid pri smreki (KOCH / KLEIST 2001).



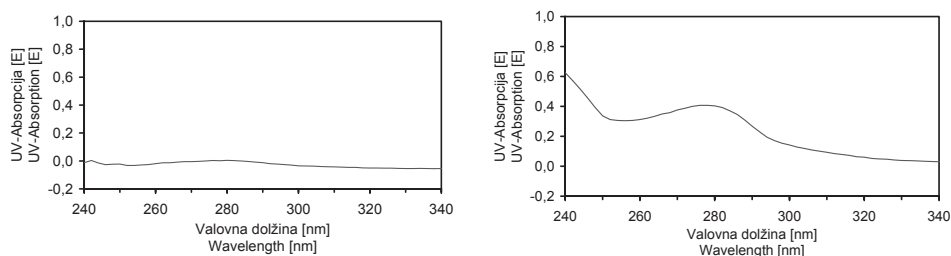
Slika 1: Prečni preparati traheid kasnega lesa pri navadni jelki pod svetlobnim mikroskopom. A – Nediferencirane celične stene traheid ob kambiju. Stene so modro obarvane, v lumnih traheid je prisotna protoplazma. B – Proces diferenciacije terminalnih traheid ob kambiju je zaključen. Celične stene so rdeče obarvane, lumni traheid so prazni. Daljica = 100 μm

Figure 1: Light micrographs of transverse sections of latewood tracheids in silver fir trees. A – Undifferentiated cell walls of tracheids near the cambium. Cell walls are stained blue. Protoplasmic content is visible in tracheid lumina. B – Process of differentiation of terminal tracheids near the cambium is completed. Cell walls are red stained, tracheid lumina are empty. Scale bars = 100 μm



Slika 2: TEM fotografiji prečnega prereza tangencialnih celičnih sten traheid pri navadni jelki, obarvanih s kalijevim permanganatom. A – Nediferencirani celični steni traheid. Razvoj sekundarne celične stene ni zaključen, notranji sloji so nelignificirani. V lumnu so vidni ostanki protoplazme. B – Vsi sloji celične stene so oblikovani in lignificirani. Povečava: 9300 x

Figure 2: TEM micrographs of transverse sections of tangential cell walls in silver fir stained with potassium permanganate. A – Undifferentiated cell walls of tracheids. Incompletely formed secondary cell walls, inner parts unlignified. In the cell lumina, protoplasm content is visible. B – Completely formed and lignified layers of cell walls. Magnification: 9300 x



Slika 3: UV-absorpcijska spektra, izmerjena v notranjem področju (ob lumnu) sekundarne celične stene traheid pri jelki. A – Absorpcijska vrednost pri 280 nm je nižja kot 0,1. Proces lignifikacije se v tem območju še ni pričel. B – Absorpcijska vrednost pri 280 nm je večja kot 0,4.

Figure 3: UV-absorption spectra measured in inner parts (near lumen) of secondary cell wall of tracheids in silver fir. A – Absorption value at 280 nm was lower than 0.1. Process of lignification has not started yet. B – Absorption value at 280 nm is above 0.4.

5 ZAKLJUČKI CONCLUSIONS

Kalijev permanganat je v transmisijski elektronski mikroskopiji zelo uporaben za proučevanje porazdelitve lignina v različnih morfoloških področjih celične stene, za proučevanje procesa lignifikacije pri nastajanju celičnih sten in za proučevanje njegove razgradnje. Elektronska gostota pri TEM v celični steni narašča z naraščajočo stopnjo lignifikacije. Ker je porazdelitev lignina odvisna od razporeditve celuloznih mikrofibril v posameznih slojih celične stene, je mogoče posredno sklepati tudi na njihovo usmerjenost (SAKA 1991, 1992, SINGH / DANIEL 2001, SCHMITT / MELCHER 2003). Kljub primernosti kalijevega permanganata v TEM za dokazovanje prisotnosti lignina v ksilemskem tkivu je metoda le kvalitativna. Zato je zaželeno, da so rezultati ugotovljeni s TEM, potrjeni še s kakšno drugo metodo, kot je npr. UMSP. Za kvantitativno določanje porazdelitve lignina po celični steni je UMSP pokazala dobre rezultate. Obe metodi se lepo dopolnjujeta. Elektronska gostota po obarvanju s KMnO_4 sovпада z naraščajočo UV absorpcijo (BLAND / FOSTER / LOGAN 1971, SCHMITT *et al.* 2003, SCHMITT / MECHER 2003, GRIČAR / ČUFAR / SCHMITT 2003). UV absorpcijski spektri se med seboj razlikujejo glede na tip lignina, zato je mogoče analizirati sestavo lignina v posameznih področjih lesnega tkiva. UMSP se pogosto uporablja za identifikacijo lignina, za ugotavljanje sprememb v njegovi strukturi ali lastnostih. Proučevati je mogoče porazdelitev lignina znotraj celične stene, znotraj ksilemske branike, nastajanje celične stene, razgradnjo lignina oziroma njegovo odstranjevanje iz celične stene itd.

6 SUMMARY

Lignin is a polymeric material composed of phenylpropanoid units derived from three cinamyl alcohols (monolignols): p-coumaryl, coniferyl and synapyl. From the functional point of view, lignin increases the strength of plant cell walls, makes them hydrophobic, which allows water transport in vascular cells and increases resistance to microbial attack. Unlike other abundant natural polymers, lignin structure is characterized by a low degree of order and a high degree of heterogeneity. The cell walls of wood are formed by successive deposition of cell wall polymers, pectic substances, hemicelluloses and cellulose, and finally lignin. Depending on the type, age and morphological region of the differentiating cell, different kinds of polysaccharides and lignols are incorporated to form lignin polysaccharides complexes. For investigations of lignin in woody cell walls, different methods are employed as useful tools.

Besides osmium tetroxide, potassium permanganate was originally used for plant tissues as both a fixative and staining agent in transmission electron microscopy (TEM). Recently, a number of studies have applied the potassium permanganate staining for enhancing the contrast in the visualization of lignin distribution in wood cell walls. Electron density increases in line with the degree of lignification. Di- and tri- hydroxyl phenols of lignin react strongly with potassium permanganate and reduce it to manganese oxides. Some authors have suggested that KMnO_4 may also interact with hemicelluloses containing acidic groups. Although doubts have been expressed as to its specificity for lignin, the KMnO_4 staining provides many details of lignin in wood at the ultrastructural level. TEM and potassium permanganate staining can be applied in the observation of lignin within mature woody cell walls to demonstrate lignin deposition during cell wall formation and its decomposition (e.g. during microbial degradation). As the distribution of lignin is considered to closely follow the pattern of microfibril orientation and distribution, it is possible to make predictions on the distribution of microfibrils in different layers of cell wall. Although this method is useful for elucidating the presence of lignin and its distribution in various morphological regions of wood, it only provides qualitative evaluation.

For quantitative assay, UV-microspectrophotometry (UMSP) provides a useful tool capable of determining the lignin content and distribution within individual layers of a cell wall. The UV absorbance properties are dependent on the ratio of the phenylpropanoid units leading to different absorbance maxima and intensities. Softwood lignin is mainly composed of guaiacyl units with an absorption maximum at 280 nm. The hardwood lignin consists of guaiacyl and syringyl units in varying ratios with absorption maximum in a range between 270-278 nm. For more detailed analyses of the distribution of lignin in woody tissue, an UV – spectrophotometric-scanning-device has been developed by Zeiss. UMSP is suitable for analyses of lignin distribution within cell walls and xylem growth rings, for cell wall formation studies, the deterioration of lignin during wood degradation, the localization and analyses of cell wall wood extractives, etc.

One example is presented to demonstrate the potential of potassium permanganate staining and UMSP for the visualization of lignin deposition during cell wall formation in latewood tracheids of silver fir (*Abies alba*) near the cambium.

7 VIRI REFERENCES

- 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
- BOUTELJE J. / ERIKSSON I. 1984. Analysis of lignin in fragments from thermomechanical spruce pulp by ultraviolet microscopy. *Holzforschung*, 38: 249-252
- BRÄNDSTRÖM J. 2001. Micro- and ultrastructural aspects of Norway spruce tracheids: a review. *IAWA Journal*, 22, 4: 333-353
- CHAFFEY N. 2002. Conventional (chemical fixation) transmission electron microscopy and cytochemistry of angiosperm trees. In: *Wood formation in trees. Cell and molecular biology techniques* (Chaffey N.J. ed.). Taylor & Francis: 41-64
- COTÉ W.A. 1981. Ultrastructure – critical domain for wood behaviour. *Wood science and Technology*, 15: 1-29
- 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
- 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
- DONALDSON L.A. 1987. S3 lignin concentration in radiata pine tracheids. *Wood Science and Technology*, 21: 227-234
- DONALDSON L.A. 1991. Seasonal changes in lignin distribution during tracheid development in *Pinus radiata*. *Wood Science and Technology*, 25: 15-24
- DONALDSON L.A. 1992. Lignin distribution during latewood formation in *Pinus radiata*. *IAWA Bulletin n.s.*, 12, 4: 381-387
- DONALDSON, L.A., 2001. Lignification and lignin topochemistry – an ultrastructural view. *Phytochemistry*, 57: 859-873
- FENGEL D. / WEGENER G. 1989. *Wood: chemistry, ultrastructure, reactions*. Berlin, Walter de Gruyter: 613 str.
- FUJITA M. / HARADA H. 1991. Ultrastructure and formation of wood cell wall. In: David N.-S.Hon, Shiraishi N. (ed.) *Wood and cellulosic chemistry*. Marcel Dekker Inc., New York: 3-58
- 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
- FUKAZAWA K. 1992. Ultraviolet microscopy. V: *Methods in lignin chemistry*. Lin S.Y., Dence C.W. (eds.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 133-145
- 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
- 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
- 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
- GOODHEW P.J. / HUMPREYS J. / BEANLAND R. 2001. *Electron microscopy and analysis*. Third edition. Taylor & Francis, London and New York: 251 str.
- GRIČAR J. 2001. Lignifikacija traheid zdravih in prizadetih jelk (*Abies alba*). *Diplomska naloga*. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo: 69 str.

- GRIČAR J. / ČUFAR K. / SCHMITT U. 2003. Differentiation of terminal latewood tracheids in silver fir during dormant period. Eurodendro 2003. Conference of the European working Group for Dendrochronology Oberegurgl, Austria, 10-14 September, 2003: 33
- HATFIELD R. / VERMERRIS W. 2001. Lignin formation in plants. The dilemma of linkage specificity. Plant Physiology, 126: 1351-1357
- HOFFMANN P. / PARAMESWARAN N. 1976. On the ultrastructural localization of hemicelluloses within delignified tracheids of spruce. *Holzforschung*, 30, 2: 62-70
- 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
- KOCH G. / KLEIST G. 2001. Application of scanning UV microspectrophotometry to localise lignins and phenolic extractives in plant cell walls. *Holzforschung*, 55: 563-567
- KOCH G. / GRÜNWALD C. 2003. Application of UV microspectrophotometry for the topochemical detection of lignin and phenolic extractives in wood fibre cell walls. EU COST E20 Book (in press).
- KOLLMANN F.F.P. / CÔTÉ JR.W.A. 1968. Principles of Wood Science and Technology I. Solid Wood. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg:592 s.
- KUTSCHA N.P. / SCHWARZMANN J.M. 1975. The lignification sequence in normal wood of balsam fir. *Holzforschung*, 29, 3: 79-84
- LAZARINI F. / BRENČIČ J. 1992. Splošna in anorganska kemija (visokošolski učbenik). Državna Založba Slovenije, Ljubljana: 557 s.
- LEWIS N.G. 1999. A 20th century roller coaster ride: a short account of lignification. *Current Opinion in Plant Biology*, 2: 153-162
- 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
- PARHAM R.A. 1974. Distribution of lignin in Kraft pulp as determined by electron microscopy. *Wood Science*, 6, 4: 305-315
- RENSING K.H. 2002. Chemical and cryo – fixation for transmission electron microscopy of gymnosperm cambial cells. In: *Wood formation in trees. Cell and molecular biology techniques* (Chaffey N.J. ed.). Taylor & Francis: 65-82
- ROBINSON D.G. / EHLERS U. / HERKEN R. / HERRMANN B. / MAYER F. / SCHÜRMAN F.-W. 1987. *Methods of preparation for electron microscopy*. Berlin, Springer: 190 str.
- 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
- SAKA S. 1991. Chemical composition and distribution. In: David N.-S.Hon, Shiraishi N. (ed.) *Wood and cellulosic chemistry*. Marcel Dekker Inc., New York: 59-88
- SAKA S. 1992. *Electron microscopy. V: Methods in lignin chemistry*. Lin S.Y., Dence C.W. (eds.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 133-145
- SAKA S. / THOMAS R.J. 1982. A study of lignification in loblolly pine tracheids by the SEM-EDXA technique. *Wood Science and Technology*, 16: 167-179
- SAKA S. / WHITING P. / FUKUZAWA 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
- SAKAKIBARA A. 1991. Chemistry of lignin. In: David N.-S.Hon, Shiraishi N. (ed.) *Wood and cellulosic chemistry*. Marcel Dekker Inc., New York: 113-175

- 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
- SCHMITT, U. / GRÜNWARD, 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
- SCHMITT U. / MECHER E. 2003. Section staining with potassium permanganate for transmission electron microscopy: a useful tool for lignin localisation. EU COST E20 Book (in press).
- 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
- SPURR A.R. 1969. A low viscosity embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastructural Research*, 26: 31-43
- TAKABE K. 2002. Cell walls of woody plants: autoradiography and ultraviolet microscopy. In: *Wood formation in trees. Cell and molecular biology techniques* (Chaffey N.J. ed.). Taylor & Francis: 159-178
- 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
- TERASHIMA N. 2000. Formation and ultrastructure of lignified plant cell walls. V: New horizons in wood anatomy. Proceedings of the 4th. Pacific Regional Wood Anatomy Conference. Kim Y.S. (ed.). Kwangju, Korea, Chonnam National University Press: 169-180
- TORELLI N. 2000. Ksilogeneza. *Les*, 52, 10: 325- 335
- WARDROPA. 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