

UNIVERZITET U BEOGRADU  
FAKULTET ZA FIZIČKU HEMIJU

Jasna LJ. Simonović Radosavljević

**Ispitivanje orijentacije strukturnih  
polimera ćelijskog zida kod tvrdog drveta  
(*Acer platanoides* L.), mekog drveta  
(*Picea omorika* (Pančić) Purkyně) i  
povijuše (*Dioscorea balcanica* Košanin)**

doktorska disertacija

Beograd, 2018.

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF PHYSICAL CHEMISTRY

JASNA LJ. SIMONOVIĆ RADOSAVLJEVIĆ

**Examination of the structural polymers  
orientation in the cell wall of hardwood  
(*Acer platanoides* L.), softwood (*Picea  
omorika* (Pančić) Purkyně) and liana plant  
(*Dioscorea balcanica* Košanin)**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2018.

**Mentori:**

---

dr Miloš Mojović, vanredni profesor  
Fakultet za fizičku hemiju, Univerzitet u Beogradu

---

dr Ksenija Radotić Hadži-Manić, naučni savetnik  
Institut za multidisciplinarna istraživanja, Univerzitet u Beogradu

**Član komisije:**

---

dr Jasmina Dimitrić-Marković, redovni profesor  
Fakultet za fizičku hemiju, Univerzitet u Beogradu

**Datum odbrane:**

Ova doktorska disertacija rađena je na Odseku za nauku o živim sistemima Instituta za multidisciplinarna istraživanja u Beogradu, Fakultetu za fizičku hemiju u Beogradu, u institutu Innventia u Stokholmu, kao i u Biološkom istraživačkom centru Mađarske akademije nauka.

Zahvaljujem se mentorima van. prof. dr Milošu Mojoviću na dugogodišnjoj saradnji, pomoći i savetima i dr Kseniji Radotić Hadži-Manić na pomoći, mnogobrojnim savetima, dugogodišnjoj podršci i idejama.

Zahvaljujem se prof dr Jasmini Dimitrić-Marković na poverenju.

Zahvaljujem se dr Aleksandri Mitrović za rukovođenje ispitivanjem promena strukture ćelijskih zidova parenhimskih i sklerenhimskih ćelija, kao posledica uvijanja stabla, na primeru povijuše *Dioscorea balcanica* Košanin. Takođe joj se zahvaljujem na brojnim savetima, pomoći i podršci.

Veliko hvala dr Jeleni Bogdanović Pristov na pomoći, podršci i savetima. Zahvaljujem se dr Ivanu Spasojeviću na podstreku, kao i dr Danieli Đikanović Golubović na pomoći koju mi je pružila.

Zahvaljujem se dr Jasni Stevanić Srndović, dr Lennartu Salmen-u, dr Gabor Steinbach-u i dr Gyozo Garab-u na divnoj saradnji i ukazanom poverenju.

Zahvaljujem se dr Dragosavu Mutavdžiću na statističkoj obradi podataka.

Zahvaljujem se dr Dušici Janošević i dr Marini Vuković za mikroskopske histohemijske i ultrastrukturne analize ćeliskih zidova parenhimskih i sklerenhimskih ćelija stabla povijuše *D. balcanica* Košanin.

Zahvaljujem se dr Gregory Mouille za snimanje FTIR spektara stabljike povijuše *D. balcanica* Košanin.

Zahvaljujem se svim kolegama iz kancelarije 95 na pomoći i druženju.

Hvala mojim roditeljima, Stevi i Urošu na razumevanju, podršci i ljubavi.

**Ispitivanje orijentacije strukturnih polimernih ćelijskog zida kod tvrdog drveta (*Acer platanoides* L.), mekog drveta (*Picea omorika* (Pančić) Purkyně) i povijuše (*Dioscorea balcanica* Košanin)**

IZVOD

Ćelijski zid vlakana drveta može se smatrati kao nano-kompozit, u kojem su celuloza, lignin i hemiceluloze kompleksno povezani. Organizacija i svojstva polimera drveta u velikoj meri određuju svojstva vlakana i drveta, pa je i razumevanje interakcija između ovih polimera ključ za genetski razvoj poboljšanog drveta i kvaliteta vlakana.

U ovoj doktorskoj disertaciji ispitivane su strukturne razlike između tvrdog i mekog drveta na primeru grana javora (*Acer platanoides*) i Pančićeve omorike (*Picea omorika* (Pančić) Purkyně). Pokazano je da su hemiceluloze orijentisane paralelno u odnosu na vlakna celuloze, tj u odnosu na osu ćelijskog zida. Takođe, kao važan rezultat je dobijeno da je lignin i kod javora i kod Pančićeve omorike paralelno orijentisan u odnosu na osu, kao i na celulozu. I pored različitih prekursora lignina i različitih hemiceluloza kod ove dve vrste drveta lignin ima sličnu orijentaciju.

Takođe, ispitivane su strukturne razlike između kompresionog i normalnog drveta na primeru Pančićeve omorike (*Picea omorika* (Pančić) Purkyně) starosti tri godine (juvenilno drvo) u toku jedne godine. Pokazano je da kod juvenilnog normalnog drveta dolazi do smanjenja mikrofibrilarnog ugla, dok kod kompresionog drveta dolazi do povećanja mikrofibrilarnog ugla.

Ispitivano je i da li dolazi do pojave strukturnih razlika prilikom formiranja reakcionog drveta kod drvenastih vrsta, ali je ispitivana i uloga parenhima u savijanju povijuša na primeru pravih i savijenih delova stabla povijuše *Dioscorea balcanica*. Pokazano je da ćelijski zidovi parenhima uvijenih delova stabljike imaju manju količinu celuloze sa drugačijom mikrofibrilnom orijentacijom, ali da ne dolazi do promene

uređenosti celuloznih vlakana. Takođe, prisutna je manja količina ksiloglukana, veća količina ksilana, kao i veća količina lignina čiji je sastav modifikovan.

EPR spektroskopijom je utvrđeno da je prisutna veća količina lignina u reakcionom drvetu nego u normalnom drvetu.

Ključne reči: ćelijski zid, tvrdo drvo, meko drvo, kompresiono drvo, normalno drvo, orijentacija, celuloza, hemiceluloza, lignin, parenhim

Naučna oblast: Fizička hemija

Uža naučna oblast: Biofizička hemija

UDK: 577.35

**Examination of the structural polymers orientation in the cell wall of hardwood (*Acer platanoides* L.), softwood (*Picea omorika* (Pančić) Purkyně) and liana plant (*Dioscorea balcanica* Košanin)**

ABSTRACT

A wood fibre cell wall can be considered as a nano-composite, in which cellulose, lignin and hemicelluloses (xylan and glucomannan) are interconnected in an intricate manner. Structural organisation of the cell wall and related polymers is important for both mechanical properties of the plants and chemical reactions occurring in the wall space, especially in the response to stress.

Structural differences between hardwood [maple (*Acer platanoides*)] and softwood [spruce (*Picea omorika* (Pančić) Purkyně)] were analyzed. The hemicelluloses, glucomannan and xylan appeared to have a close link to the orientation of the cellulose and, thus, an orientation more parallel to the axis of the cell wall. An important result is that, in both maple and spruce samples, lignin was found to be organised in a parallel way in relation to the longitudinal cell wall axis, as well as to the cellulose. The results show that lignin has a similar orientation, despite the different lignin precursors and the different types of hemicelluloses in these two kinds of wood.

Also, structural differences between compression and normal wood were analysed in the case of spruce (*Picea omorika* (Pančić) Purkyně) at the age of three years (juvenile wood) during one year. It has been shown that in the juvenile normal tree there is a decrease in the microfibrillar angle, while in the compression wood there is an increase in the microfibrillar angle.

It was examined whether there were structural differences in the formation of the reaction tree in woody species, but also, the contribution of parenchyma cells to stem twining in liana plants (*Dioscorea balcanica* Košanin). Parenchyma cell walls of twisted *D. balcanica* internodes are characterized by lower amount of cellulose with no changes in

cellulose fibril order, lower amount of xyloglucan, higher amount of xylan and higher amount of lignin with modified organization, less condensed lignin.

EPR spectroscopy found that a larger amount of lignin is present in the reaction tree than in a normal tree.

Key words: cell wall, hardwood, softwood, compression wood, normal wood, orientation, cellulose, hemicellulose, lignin, parenchyma

Academic Expertise: Physical chemistry

Field of Academic Expertise: Biochemistry

UDK: 577.35



## LISTA SKRAĆENICA

P - primarni zid

S<sub>1</sub> - spoljašnji sekundarni zid

S<sub>2</sub> - srednji sekundarni zid

S<sub>3</sub> - unutrašnji sekundarni zida

G sloj – želatinozni sloj

*D. balcanica* - *Dioscorea balcanica* Košanin

XyGs - ksiloglukani

GGMs - galaktoglukomanani

AGXs – arabinoglukuronoksilani

β-D-Glcp - β-D-glukopiranozne jedinice

DP - stepen polimerizacije

RSA - rendgenske strukturne analize

NMR - nuklearne magnetne rezonance

MFA - mikrofibrilni ugao

β-D-Glcp - β-D-glukopiranoza

α-D-Xylp - α-D-ksilopiranoza

β-D-Xylp - β-D-ksilopiranoza

β-D-Manp - β-D-manopiranoza

α-D-Galp - α-D-galaktopiranoza

β-D-Galp - β-D-galaktopiranoza

α-L-Rhap - α-L-ramnopiranoza

$\alpha$ -L-Araf -  $\alpha$ -L-arabinofuranoza

$\beta$ -L-Araf -  $\beta$ -L-arabinofuranoza

$\alpha$ -D-GlcpA -  $\alpha$ -D-glukopiranuronska kiselina

4-O-Me- $\alpha$ -D-GlcpA - 4-O-metil- $\alpha$ -D-glukopiranuronska kiselina

$\alpha$ -D-GalpA -  $\alpha$ -D-galaktopiranuronska kiselina

XyGs - ksiloglukani

GGMs - galaktoglukomanani

AGXs - arabinoglukoronksilani

HGA - homogalakturonan

RG-I - ramnogalagturonan I

RG-II - ramnogalagturonan II

XGA - ksilogalakturonan

AG-I - arabinogalaktan I

AG-II - arabinogalaktan II

NW - normalno drvo

CW – kompresiono drvo

OW – opozitno drvo

*S. amara* - *Simarouba amara*

XET - ksiloglukan-endo-transglikolaze

S jedinice – jedinice siringila

UV - ultraljubičasto

FTIR – Furijeova transformacijska infracrvena

DP-LSM - diferencijalno polarizovani lasersko skenirajući mikroskop

LD - linearnog dihroizma

LB - linearnog dvostrukog prelamanja

FULD - fluorescentno detektovan linearni dihroizam

FDCD - fluorescentno detektovan cirkularni dihroizam

DP - diferencijalna polarizacija

DHP – dehidrogenatni polimer

SEM - skenirajuća elektronska mikroskopija

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. PREGLED LITERATURE</b> .....	3
<b>2.1 Građa i struktura tvrdog i mekog drveta i povijuša</b> .....	3
2.1.1 Primeri mekog i tvrdog drveta .....	9
<b>2.2 Ćelijski zid</b> .....	12
2.2.1 Struktura i hemijski sastav ćelijskog zida .....	13
<b>2.3 Gradivni polimeri drveta</b> .....	15
2.3.1 Celuloza ( $\beta$ -1,4-D-glukan) .....	16
2.3.2 Hemiceluloze .....	18
2.3.3 Pektin .....	19
2.3.4 Lignin .....	20
2.3.5 Proteini .....	22
<b>2.4 Juvenilno i zrelo drvo</b> .....	22
<b>2.5 Reakciono drvo: tenziona i kompresiona</b> .....	24
2.5.1 Tenziona drvo .....	25
2.5.2 Kompresiona drvo .....	28
<b>2.6 Drvo kao građevinski materijal</b> .....	31
<b>3. CILJ ISTRAŽIVANJA</b> .....	32

<b>4. MATERIJAL I METODE</b> .....	33
<b>4.1 Biljni materijal</b> .....	33
<b>4.2 Uzorkovanje stabljika Pančičevih omorika</b> .....	33
<b>4.3 Uzorkovanje stabljika povijuše <i>Dioscorea balcanica</i></b> .....	35
<b>4.4 Izolacija ćelijskog zida</b> .....	36
<b>4.5 FTIR spektroskopija</b> .....	36
<b>4.6 FTIR mikro-spektroskopija</b> .....	37
<b>4.7 FTIR spektroskopija i mikroskopija za javor i Pančičevu omoriku</b> .....	39
<b>4.8 FTIR spektroskopija za prave i savijene Pančičeve omorike</b> .....	39
<b>4.9 FTIR spektroskopija za <i>D. balcanica</i></b> .....	39
<b>4.10 Ekstrakcija fenola vezanih za ćelijski zid</b> .....	40
<b>4.11 Određivanje koncentracije lignina</b> .....	40
<b>4.12 Diferencijalno-polarizaciona laserska skanirajuća mikroskopija (DP-LSM)</b> ...	41
<b>4.13 EPR spektroskopija</b> .....	43
<b>4.14 Svetlosna mikroskopija</b> .....	44
<b>4.15 Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM)</b> .....	44
<b>4.16 Statistička analiza</b> .....	45
<b>5. REZULTATI I DISKUSIJA</b> .....	46
<b>5.1 Utvrđivanje strukturnih razlika između tvrdog (listopadnog) drveta i mekog (četinar) drveta, na primeru javora (<i>Acer platanoides</i> L.) i Pančičeve omorike (<i>Picea omorika</i> (Pančić) Purkyně)</b> .....	46
<b>5.2 Utvrđivanje strukturne razlike između ćelijskog zida kompresionog i normalnog drveta, na primeru Pančičeve omorike kao odgovor na mehanički stres kod četinara</b> .....	51

<b>5.3 Praćenje strukturnih razlika između pravih i krivih delova kod povijuše (<i>Dioscorea balcanica</i>) kao poređenje sa formiranjem reakcionog drveta kod drvenastih vrsta .....</b>	<b>57</b>
5.3.1 <i>Hemijska analiza .....</i>	59
5.3.2 <i>Anatomska i histohemijska analiza stabljike D. balcanica .....</i>	60
5.3.3 <i>Histohemijske i ultrastrukturne karakteristike ćelijskih zidova sklerenhima (identifikovanje prisutnosti želatinoznih vlakana u uvijenim internodijama) .....</i>	60
5.3.4 <i>Histohemijske i ultrastukturne karakteristike ćelijskih zidova parenhima koje se odnose na uvijanje stabljike .....</i>	62
5.3.5 <i>Strukturna organizacija ćelijskog zida parenhima ispitivana pomoću DP-LSM .....</i>	64
5.3.6 <i>Strukturna organizacija ćelijskog zida parenhima, dobijena pomoću FTIR mikrospektroskopije .....</i>	67
<b>5.4 Primena EPR spektroskopije za utvrđivanje razlike u količini lignina kod reakcionog i normalnog drveta na primeru Pančićeve omorike i povijuše <i>Dioscorea balcanica</i> .....</b>	<b>70</b>
<b>6. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>76</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>78</b>

## 1. UVOD

Ćelijski zid drveta može se smatrati kao nano-kompozit, u kojem su celuloza, lignin i hemiceluloze kompleksno povezani. Strukturna organizacija polimera u ćelijskom zidu drveta je veoma kompleksna i još uvek čeka svoj detaljan opis na ultrastrukturnom nivou. Organizacija i svojstva polimera drveta u velikoj meri određuju svojstva vlakana i drveta, pa je i razumevanje interakcija između ovih polimera ključ za genetski razvoj poboljšanog drveta i kvaliteta vlakana (Salmén 2004). Ćelijski zid se sastoji od nekoliko slojeva, od primarnog zida (P), spoljašnjeg sekundarnog zida ( $S_1$ ), srednjeg sekundarnog zida ( $S_2$ ) i unutrašnjeg sekundarnog zida ( $S_3$ ). Zbog svoje relativno veće debljine u odnosu na druge slojeve ćelijskog zida (80% težinski), osobine  $S_2$  sloja su dominantne u ćelijskom zidu. Celuloza je polimer u obliku pravog lanca koji ima proširene i dosta krute štapičaste konformacije (Salmon i Hadson 1997). Ona daje mehaničku snagu ćelijskom zidu, zbog svoje relativno paralelne orijentacije sa uzdužnom osom ćelijskog zida (Marchessault 1962; Åkerholm i Salmén 2001). Osnovna razlika između hemiceluloza tvrdog i mekog drveta je u sadržaju ksilana i glukomanana. U tvrdom drvetu je prisutna veća količina ksilana, dok je količina glukomanana veća u mekom drvetu (Aspinall 1980). Ksilani u mekom drvetu se takođe razlikuju od ksilana u tvrdom drvetu po nedostatku acetil grupa (Liang i dr. 1960). Spektroskopske i mikroskopske studije o ligninu pokazuju da ima uređenu strukturnu organizaciju (Atalla i Agarwal 1985; Radotić i dr. 1994; Micic i dr. 2000). Postoje razlike u ligninskim monomernim prekursorima u ćelijskim zidovima ove dve vrste drveta. Lignin u mekom drvetu sadrži jedinice gvajakola, dok lignin u tvrdom drvetu sadrži i gvajakol i siringil monomere (Sarkanen i Hergert 1971). Iako je poznato da su u osnovi ćelijskog zida celulozni mikrofibrili tesno ugrađeni u matriks lignina i hemiceluloze, sklop ovih komponenti u ćelijskom zidu, kao i strukturna organizacija nisu dovoljno proučene. Razumevanje rasporeda i orijentacije odnosno uređenosti polimera u ćelijskom zidu je važno za razumevanje mehaničkih svojstva drveta, kao odgovora biljke na stres, ali takođe i kao moguću primenu drveta kao izvora novih biomaterijala. Većina studija koje se odnose na orijentaciju su se fokusirale samo na orijentaciju celuloznih mikrofibrila. Međutim,

organizacija preostalih polimera drveta je od značaja kod razumevanja formiranja ćelijskog zida tokom rasta. Tokom procesa formiranja ćelijskog zida hemiceluloze se deponuju istovremeno sa organizacijom celuloznih mikrofibrila (Atalla i dr. 1993; Terashima i dr. 2009.). Prema literarnim podacima, orijentacija lignina u ćelijskom zidu nije jasno određena. To je razgranati polimer, za koga se uglavnom pretpostavlja da ima izotropnu (neuređenu) organizacija u ćelijskom zidu (Monties 1998; Hatfield i Vermeris 2001).

Anizotropija odnosno strukturna uređenost ćelijskog zida proučava se i primenom diferencijalno polarizovane fluorescentne mikroskopije. To je metoda koja procenjuje linearni dihiroizam odnosno uređenost ćelijskih zidova praćenjem orijentacije celuloze (Steinbach i dr. 2008). S druge strane, polarizovana FTIR mikro-spektroskopija se pokazala kao korisno sredstvo u proceni anizotropije, odnosno orijentacija polimera ćelijskog zida u strukturi vlakna (Stevanic i Salmén 2009). Orijetacija celuloze, glukomanana, ksilana i lignina, kao suštinskih komponenti drveta, tako može biti analizirana u odnosu na osu vlakana.

U istraživanjima su korišćene grane Pančičeve omorike (*Picea omorika* (Pančić) Purkyně) i javora (*Acer plantanoides* L), kao i stabla Pančičeve omorike (*Picea omorika* (Pančić) Purkyně) i povijuše *Dioscorea balcanica* Košanin kako bi se istražile interakcije između polimera u ćelijskom zidu različitih biljnih vrsti, sa fokusom na ispitivanju orijentacije polimera u ćelijskom zidu i u vezi toga njihove strukturne uređenosti i uređenosti zida kao celine.



## 2. PREGLED LITERATURE

### 2.1 Građa i struktura tvrdog i mekog drveta i povijuša

Drvo je najstariji i jedan od najčešće korišćenih inženjerskih materijala na svetu. Ono se toliko puno koristi zbog niske cene i visoke specifične snage. Drvo se odlikuje velikom krutošću, ali i velikom žilavošću. Kako je drvo obnovljivi izvor, on predstavlja dobar materijal iz perspektive zaštite životne sredine, jer njegova proizvodnja zahteva samo mali dodatak energije. Drvo je materijal satkan od vlakana (celulozna vlakna u ligninskom matriksu) kompleksne strukture. Osnovna jedinica strukture drveta je biljna ćelija, koja predstavlja najmanju jedinicu žive materije koja može funkcionisati samostalno. Ćelija ima mnoge funkcije, poput proizvodnje proteina, polisaharida i minerala. Veličina biljne ćelije varira u prečniku od 10-100  $\mu\text{m}$ . Osnovna razlika između biljne i životinjske ćelije je ta što biljne ćelije imaju ćelijski zid izvan plazma membrane, koji je debljine od 0,1 do 7  $\mu\text{m}$ . Ovo čini da ćelija bude kruta. Pored toga, sastojci drveta prolaze kroz kontinuirano obnavljanje, što čini drvo dinamičkim sistemom.

Drveće ima značajnu ulogu u smanjenju erozije i ublažavanju klime. Ono uklanja ugljen-dioksid iz atmosfere i zadržava veliku količinu ugljenika u svojim tkivima. Drveće i šume pružaju stanište za mnoge vrste životinja i biljaka, predstavljaju materijal za građenje, koriste se kao gorivo, ali ima i mnoge druge namene.

Primarna uloga stabla je da omogući lišću da bude što izloženije svetlosti i na taj način da opstane. Takođe, stablo omogućava transport vode i hranljivih materija iz korena do nadzemnih delova drveta, ali i transport hranljivih materija od listova ka korenu (Russell i Cutler 2003). Provodni sistem stabla omogućava da se voda, hranljive materije, kao i druge hemikalije distribuiraju kroz celu biljku, i bez njega drveće ne bi raslo. Tri glavna dela drveta su koren, stablo i list. Oni su sastavni deo vaskularnog sistema. Put vode ide od ksilema korena kroz stablo do listova (Hodson i Bryant 2012). Drvenasti deo daje snagu stablu i čini oslonac biljci u rastu.

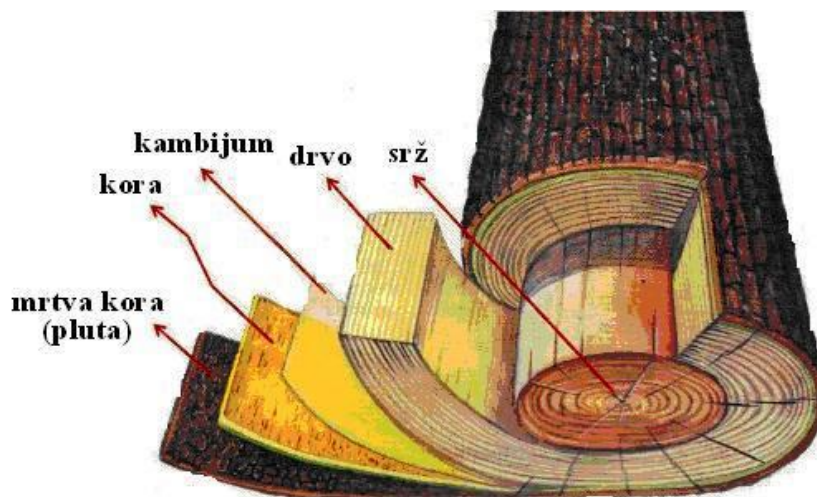
Na osnovu svojih strukturnih osobina, drvo se može podeliti u dve osnovne grupe: na tvrdo drvo i meko drvo. Meko drvo imaju golosemenice (uglavnom četinari), a tvrdo drvo karakteriše skrivenosemenice (cvetnice). Pančićeve omorika (*Picea omorika* (Pančić) Purkyně, *Gymnospermae*, drvenasta četinarska vrsta) spada u meko drvo, dok *Acer plantanoides* L (javor) spada u tvrdo drvo. Meko i tvrdo drvo se ne razlikuju samo po tome od kojih biljaka potiču, već i po tipu ćelija koje ih izgrađuju. Kao što samo ime sugeriša, drvo koje potiče od tvrdog drveta je generalno tvrđe nego meko drvo, ali postoje i izuzeci. Meko drvo ima jednostavniju strukturu od tvrdog drveta, jer ima samo dva tipa ćelija i relativno male varijacije u strukturi unutar njih. Tvrdo drvo je kompleksnije i ima veći broj tipova ćelija i mnogo veći stepen raznovrsnosti unutar njih (Wiedenhoeft i Miller 2005). ta kompleksna struktura često kao posledicu ima sporiji rast. Osnovne strukturne komponente obe vrste drveta su celuloza, hemiceluloze i lignin, zajedno sa malom količinom pektinskih supstanci (Fengel i Wegener 1989).

Stabla tvrdog i mekog drveta mogu imati primarnu i sekundarnu građu (Slika 1). Stabla sa primarnom građom su izgrađena samo od primarnih tkiva koja se javljaju u prvim stadijumima njihovog razvitka, pre obrazovanja kontinuiranog kambijalnog prstena, koji je uslov za sekundarnu građu.

Na površini mladog stabla se nalazi epidermis čije su ćelije izdužene u pravcu uzdužne ose stabla. Ispod epidermisa se nalazi primarna kora koja izgleda kao prsten na poprečnom preseku. Kora se sastoji od parenhimskih ćelija koje sadrže hloroplaste, dok dublje slojeve čine bezbojne parenhimske ćelije. Parenhim kore ima funkciju kore i magacioniranja. U primarnoj kori stabla se još nalaze i mehanička tkiva (sklerenhim) koja se javljaju u obliku izolovanih snopova. Fotosintetička i mehanička tkiva u primarnoj kori se najčešće naizmenično smenjuju. Mehanička tkiva se nalaze periferno u stablu što stablo čini otpornim na savijanje.

Centralni cilindar zauzima centar stabla. Ta oblast počinje jednim jednoslojnim ili višeslojnim omotačem koji se zove pericikl. Višeslojni pericikl je izgrađen ili samo od parenhimskih ćelija, ili od parenhimskih ćelija i sklerenhimskih vlakana. Sklerenhimska vlakna pericikla mogu biti u obliku kontinualnog prstena, ili u obliku traka koje su

postavljene prema provodnim snopišćima. U centralnom cilindru se nalaze i provodna tkiva, tj. provodni snopići.



Slika 1. Građa drvenastog stabla (prema <https://www.slideshare.net/biologijazaosnovnu/stablo-55503745>).

Debljanje stabla može biti primarno i sekundarno. Primarno debljanje se zasniva na uvećanju volumena ćelije, dok do umnožavanja ćelija ne dolazi. Kod sekundarnog debljanja dolazi do nastanka novih ćelija. Do sekundarnog debljanja dolazi formiranjem kontinuiranog kambijalnog prstena.

Kod tvrdog drveta postoji primarno i sekundarno debljanje. Sekundarno debljanje započinje posle završenog primarnog debljanja (Slika 2). Prokambijum je vrsta meristemskog tkiva koje ima oblik prstena i izgrađen je iz više slojeva ćelija. Kasnije od prokambijuma nastaju primarni floem, kambijum i primarni ksilem. Prema centru stabla nastaje prsten primarnog ksilema, dok sa spoljašnje strane, prema periferiji stabla, nastaje prsten primarnog floema. Između ta dva prstena nalazi se kambijalni prsten. Kambijalne ćelije su postavljene tako da njihova uzdužna osa ide paralelno sa uzdužnom osom stabla. Zidovi su celulozni i meki. Kada izrastu do normalne veličine, kambijalne ćelije se dele, i jedna od dve nastale ćelije ostaje kambijalna ćelija, a druga koja je odvojena prema centru ili prema periferiji stabla prelazi u elemente sekundarnog drveta ili u elemente sekundarne kore. Ćelije koje se odvajaju prema centru čine sekundarno drvo, a ćelije koje se odvajaju

prema periferiji sekundarnu koru. Odvajanje ćelija prema centru je češće, pa je zato drvo uvek razvijenije nego kora.

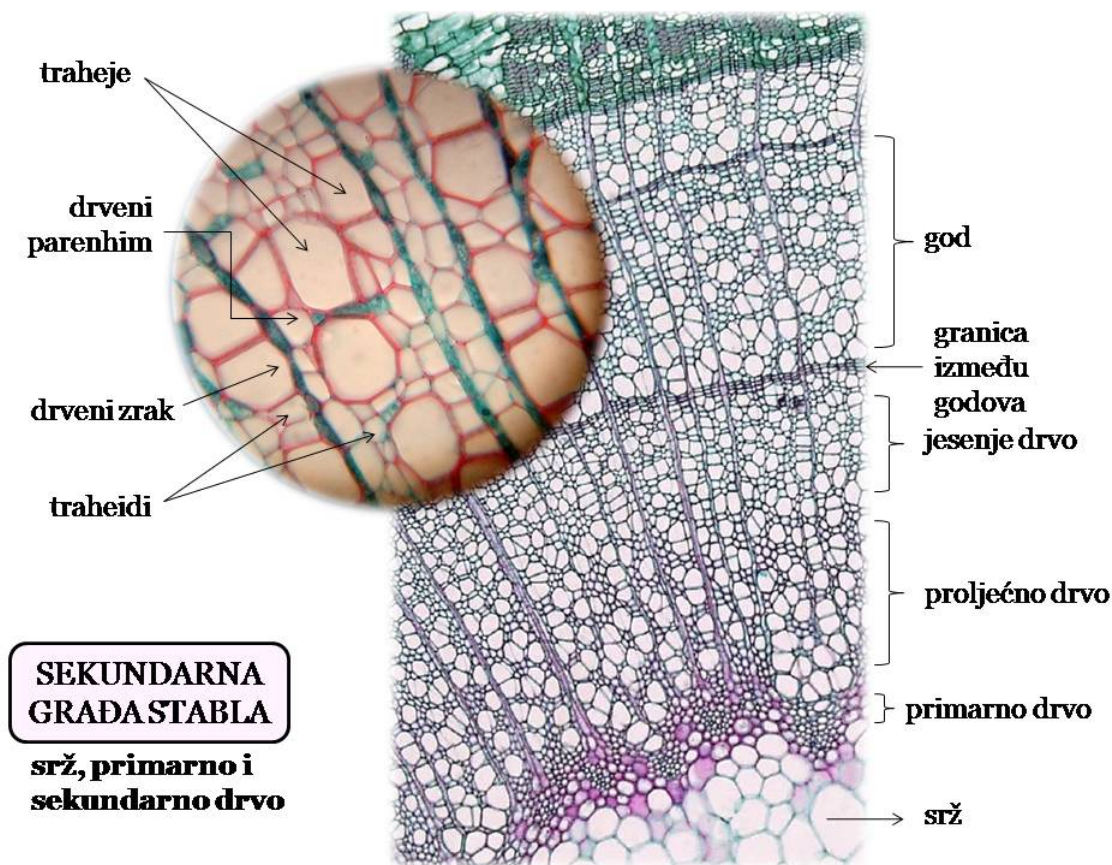
Kod drvenastih biljaka sekundarno drvo čini glavnu masu stabla. Po građi sekundarno drvo dikotila je složenije od primarnog drveta i izgrađeno je od više vrsta tkiva. Svi elementi sekundarnog drveta su lignifikovani. Sekundarno drvo se sastoji od provodnih tkiva, mehaničkih tkiva, tkiva za skladištenje i tkiva za izlučivanje. Njegova funkcija je da provodi materije od korena do listova, da daje čvrstinu stablu i da skladišti organske materije. U provodna tkiva spadaju traheje i traheide. Traheje se mogu razlikovati u veličini, obliku i strukturi ćelijskog zida. Traheje su dugačke cevi, do 10 cm dužine, nastale uzdužnim spajanjem ćelija. Uzdužni zidovi ćelija koje će obrazovati traheju odrvenjavaju, a njihovi poprečni zidovi delimično ili potpuno nestaju. Traheide sekundarnog drveta su uglavnom uske i pored provođenja vode imaju i mehaničku funkciju.

U mehanička tkiva sekundarnog drveta spadaju drvena vlakna koja su veoma uske i dugačke ćelije sa zašiljenim krajevima. Kada su potpuno formirana, vlakna su mrtva i ispunjena vazduhom.

Tkivo za skladištenje je predstavljeno drvenim parenhimom. Ćelije drvenog parenhima, kao i parenhim drvenih zrakova, su jedine žive ćelije sekundarnog drveta. Zato su one jedine pogodne za skladištenje organskih materija. Parenhimske ćelije su uzdužne i orjentisane duž ose stabla, a zidovi su lignifikovani. Položaj parenhimskih ćelija može biti različit. Parenhim se može naći oko traheja, pojedinačno ili po nekoliko između drugih ćelija, u obliku grupa ćelija između drugih ćelija drveta, kao i u obliku uzanih zona od jednog ili nekoliko slojevaćelije na kraju goda.

Između svih ovih elemenata sekundarnog drveta pružaju se drveni zraci, koji su izgrađeni od parenhimskih ćelija poređanih u nizu. Ćelije drvenih zrakova su povezane sa ćelijama drvenog parenhima, iz kojih se organske materije transportuju u radijalnom pravcu od drveta do kore i obrnuto. Drveni zraci imaju i ulogu u razmeni gasova između spoljašnje atmosfere i tkiva u drvetu.

Sekundarnu koru čine sva tkiva koja kambijum odvaja prema periferiji stabla. Sastoji se takođe od četiri vrste tkiva (provodnih, mehaničkih, tkiva za skladištenje i tkiva za izlučivanje). Sekundarna kora uglavnom služi za provođenje i magacioniranje organskih materija.

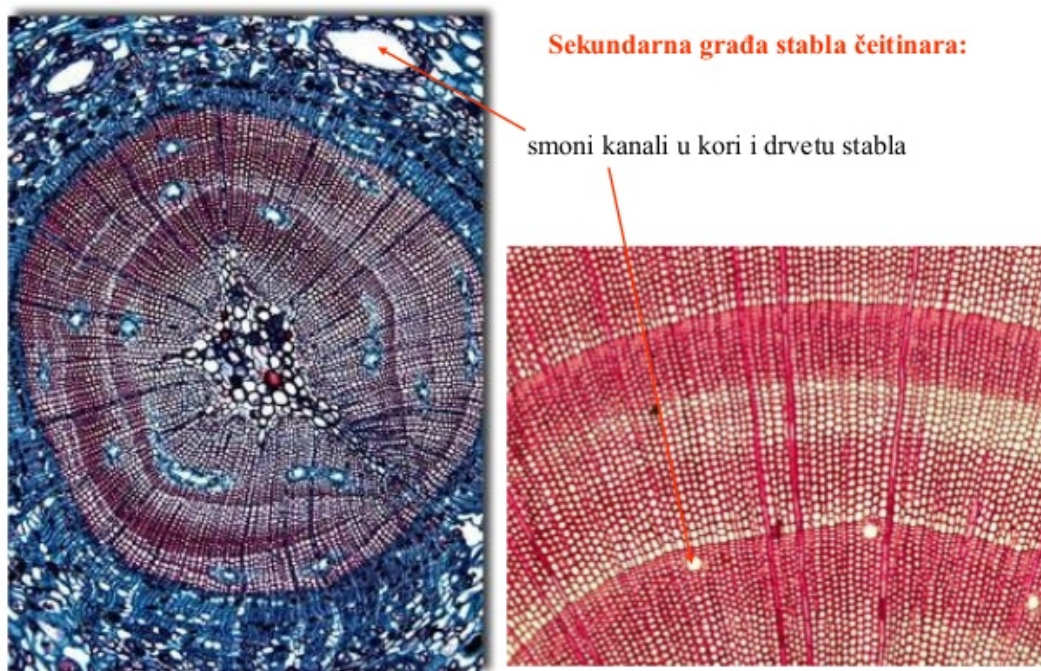


Slika 2. Sekundarna građa stabla tvrdog drveta (<http://3.bp.blogspot.com/-cEIXdvwLJSM/UTkk65PwM0I/AAAAAAAAAsA/6bS20kuSWPQ/s1600/sek.stablo2.jpg>)

Sekundarno debljanje golosemenica (mekog drveta) vrši se na isti način kao i kod drvenastih skrivenosemenica (tvrdog drveta). Čelije kambijalnog prstena se dele i odvajaju prema periferiji sekundarnu koru, a prema centru sekundarno drvo.



Sekundarno drvo golosemenica je po građi jednostavnije od sekundarnog drveta skrivenosemenica. Sastoji se samo iz traheida i drvenog parenhima. Traheide su raspoređene pravilno u radijalnim nizovima. Traheide su izdužene ćelije najčešće sa šiljastim vrhovima, imaju provodnu i mehaničku ulogu. Traheide mogu da variraju u prečniku u zavisnosti od vrste. Smoni kanali su jedinstveni za četinare (Slika 3). Imaju ulogu da zaštite oštećeno područje drveta. Drveni parenhim se nalazi oko smonih kanala. Između nizova traheida se nalaze drveni zraci, koji služe da transportuju materije od četina do živih ćelija drveta, kao i da vodu iz drveta provode u koru.



B. Lakušić – Građa stabla

Slika 3. Sekundarna građa mekog drveta

(<https://www.slideshare.net/tanjadavinicmihajlovic/gradja-stabla-2013>)

Tvrdo drveće je klasifikovano kao dikotiledone biljke (ili "dikotile") jer imaju dva kotiledona (embriona lišća). To znači da kada je dikotila iznikne iz svog semena, sadnica će imati dva lista.

Međutim, u okviru angiospermi (cvetnica), postoje i biljke koje imaju samo jedan rani list i takve biljke se zovu monokotiledone biljke, ili monokotile. Ovoj grupi pripadaju kukuruz, pšenica, pirinač, i sve trave, kao i povijuše (npr *Dioscorea balcanica* Košanin). Anatomski, razlikuju se i od mekog i od tvrdog drveta, i imaju relativno jednostavnu strukturu (kroz svetlije parenhimske ćelije prolaze tamnije obojene traheje) (Bold i dr. 1987, B. Tatić i dr. 1998).

Povijuše su razvile različite mehanizme kako bi popeli i fiksirali stabljiku za čvrstu podlogu (Carlquist 1985). Želatinozna vlakna, specijalne parenhimske ćelije i dobro poznate komponente tenzionog drveta, su odgovorne za uvijanje stabljika lijana (Bowling i Vaughn 2009). Većina fizioloških eksperimenata koji u obzir uzimaju mehanizme uvijanja povijuša, fokusirana su na vlakna, zbog njihove mehaničke važnosti, i na traheje i traheide koje su povezane sa provodnim funkcijama, dok su aksijalne parenhimske ćelije uglavnom ostale neistražene (Carlquist 2015). U skorije vreme povećalo se interesovanje za ulogom parenhima u uvijanju lijana (Spicer 2014).

Poznato je da neke anatomske adaptacije na mehaničko naprezanje, u povijušama, uključuju visoku fleksibilnost strukture tkiva. Na primer, distribucija parenhima, naročito kada parenhim okružuje provodne snopiće koji su obavijeni sklerenhimskim ćelijama, može doprineti mehaničkoj fleksibilnosti stabljike. Distribucija parenhima u povijušama upravo omogućava da se one uvijaju bez lomljenja. Ovo bi moglo biti od posebnog značaja za zeljaste višegodišnje biljke (Carlquist 1985), kao što je *Dioscorea Balcanica* Košanin.

### **2.1.1 Primeri mekog i tvrdog drveta**

#### **Pančićeve omorika (*Picea omorika* (Pančić) Purkyně)**

Pančićeve omorika (*Picea omorika* (Pančić) Purkyně), najlepší četinar Evrope, je endemska drvenasta vrsta. Ona je endem područja Podrinja, zapadne Srbije i istočne Bosne (okolina Višegrada). Ime je dobila po srpskom botaničaru Josifu Pančiću koji ju je otkrio na planini Tari 1875. godine, kod sela Zaovine i Rastišta.

Pančičeva omorika je četinarsko drvo iz roda smrča (Slika 4). Ima pravo i vitko stablo sa piramidalnom krošnjom. Dostiže visinu do 40 m, a u prečniku debljinu do 60 cm. Gornje grane na stablu omorike povijene su naviše, srednje su skoro horizontalne, a donje su povijene ka zemlji, ali su vrhovi okrenuti uvis. Četine na gornjoj strani su tamnozelenene, a sa donje strane imaju dve bele pruge kao kod jele, duge su oko 1–2 cm i ne bodu. Spada u meko drvo.

Naseljava otvorene staništa, kao što su litice i šumski proplanci. Stanište Pančičeve omorike na Tari se odlikuje jakim severnim vetrovima, pa je tako izložena ekstremnom mehaničkom stresu. Uprkos ograničenom prirodnom staništu, Pančičeva omorika se smatra za jednu od najprilagodljivih omorikama. Pripada sporo rastućim četinarskim vrstama, u kojima se obično javlja kompresiono drvo u jako izraženom obliku (Timell 1986, Donaldson i dr. 2004). Ove dve karakteristike čine Pančičevu omoriku izazovnim modelom za proučavanje strukture i organizacije ćelijskog zida.



Slika 4. Pančičeva omorika (*Picea omorika* (Pančić) Purkyně)



## **Javor (*Acer platanoides* L)**

*Acer platanoides* L (norveški javor) je rasprostranjen na području istočne i centralne Evrope, kao ina području jugozapadne Azije (Slika 5).

Javor je listopadno drvo. Jako brzo raste, a dosegne čak i visinu od 20 do 35 metara. Krošnja mu je jajolika i izdužena. Stablo je ravno i okruglo, prečnika oko 150 cm. Kora je sivkastosmeđe boje, debela je oko 1 cm, i na površini ima brojne plitke, uzdužne brazde. Spada u tvrdo drvo.



Slika 5. Javor (*Acer Platanoides* L)

## ***Dioscorea balcanica* Košanin**

*Dioscorea balcanica* je višegodišnja zeljasta monokotiledona biljka iz porodice *Dioscoreaceae* (Slika 6). To je endemska vrsta kakarakteristična za područje Balkana. Ime je dobila 1914. Od strane Nedeljka Košanina, tadašnjeg upravnika botaničke bašte Jevremovac u Beogradu. Visine je od 2-5 m i pripada porodici povijuša (Pulević 1973). Rod *Dioscorea* obuhvata 600 različitih vrsta (Isnard i Silk 2009).



Slika 6. *Dioscorea balcanica* Košanin u Botaničkoj bašti „Jevremovac“ u Beogradu: (a) cvetna ženska biljka; (b) stabljika koja se uvija oko podrške i zreli plodovi

## 2.2 Ćelijski zid

Ćelijski zid je čvrsti, jedinstven omotač koji opkoljava i štiti plazma membranu svake biljne ćelije, dok ga životinjske ćelije ne poseduju. Izgrađen je od polisaharida, ali je slojevit, vlaknast, elastičan, savitljiv i izuzetne čvrstine. Preko zidova se ćelije vezuju u složena tkiva, pri čemu je ostavljena mogućnost komunikacije među ćelijama preko kanalića nazvanih plazmodezme. Neke supstance ćelijski zid propušta, a drugima ne omogućava ulazak u ćeliju. Oblik i građa ćelijskog zida variraju kod različitih tipova biljnih ćelija.

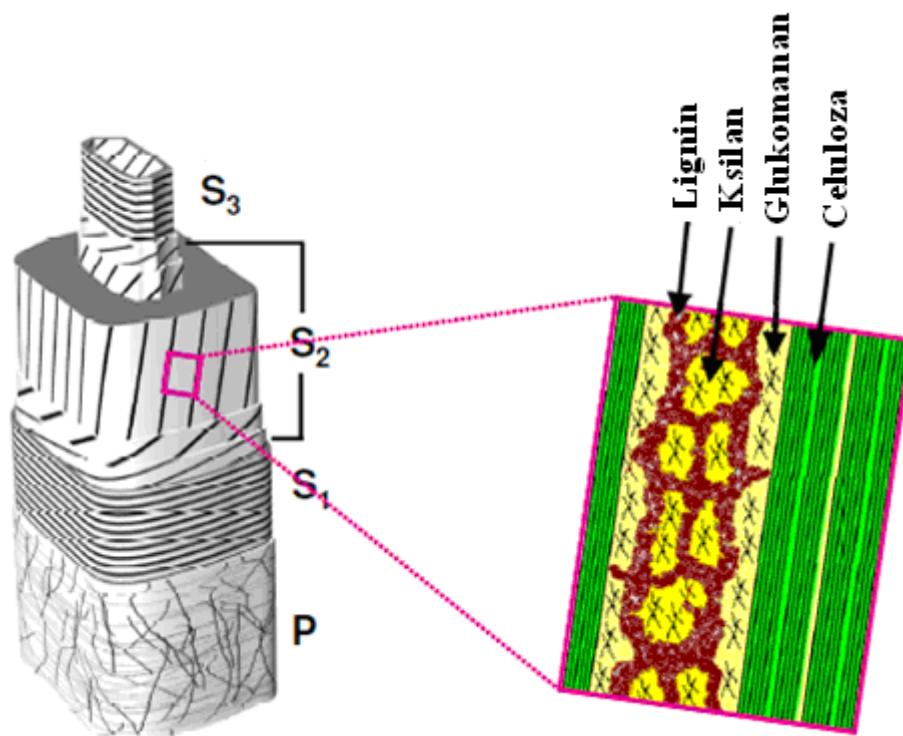
Ćelijski zid ima više funkcija. On obezbeđuje zaštitu protoplasta i obezbeđuje strukturu ćelija. Uključen je u rast ćelije i daje joj fleksibilnost (može se videti koliko je biljka fleksibilna kada se njiše na vetru). Ćelijski zid obezbeđuje i hidrataciju (obezbeđuje dovoljno vode za seme kada klija). Ćelijski zid je od koristi i za ljude i životinje. Od njega se pravi odeća, koristi se kao biogorivo, hrana je za ljude i životinje, koristi se i u farmaceutskoj industriji (Bačić i dr. 1988, O'Neill i dr. 1990, Carpita i Gibeaut 1993, Ridley i dr. 2001).

### **2.2.1 Struktura i hemijski sastav ćelijskog zida**

Ćelijski zidovi se sastoje od uređenog niza celuloznih mikrofibrila koji su uronjeni u matricu od polisaharida i glikoproteina. Ova konstrukcija podseća na čelične šipke u armiranom betonu (Ridley i dr. 2001). U njemu se po hemijskom sastavu i strukturi razlikuju tri sloja: središna lamela, primarni zid i sekundarni zid (Konjević i dr. 2010) (Slika 7). U svakom ovom regionu, ćelijski zid ima tri glavne komponente: celulozne mikrofibrile (sa karakterističnom distribucijom i organizacijom), hemiceluloze i druge matrične polimere, obično pektin u primarnim zidovima i lignin u sekundarnim zidovima (Salmén i Olsson 1998).

Zid biljne ćelije obrazuje se u toku ćelijske deobe. Obrazovanje novog ćelijskog zida počinje pri deobi ćelije nastankom fragmoplasta (grč. *phragma* = pregrada). Fragmoplast se formira u obliku plazmatičnih telašaca u predelu ekvatorijalne ploče tokom telofaze, kada su se hromozomi povukli ka polovima deobnog vretena. U izgradnji ćelijskog zida biljaka veliku ulogu ima Goldžijev aparat. Obrazovanje pregradnog zida između dve ćerke ćelije u toku deobe jedra počinje u telofazi, kada se formira ćelijska ploča. Ćelijsku ploču obrazuju vezikule Goldžijevog aparata koje se sakupljaju u ekvatorijalnoj ravni ćelije i spajaju. Vezikule sa Goldžijevog aparata nose pektinske materije neophodne za izgradnju začetka ćelijskog zida. Kretanje ovih vezikula regulišu mikrotubule deobnog vretena.

Od ćelijske ploče nastaje srednja lamela budućeg zida. Srednja lamela se može shvatiti kao spojnica koja vezuje susedne ćelije i ona je izgrađena od pektina. Srednja lamela poseduje kanaliće, plazmodezme, preko kojih dve novonastale kćerke ćelije komuniciraju između sebe. Sa svake strane srednje lamele novonastale ćelije počinju da stvaraju primarni ćelijski zid i da rastu. Funkcija primarnog zida je da omogući rast ćelije i da joj u isto vreme obezbedi čvrstinu i potporu. Mladi, tek formirani ćelijski zid sadrži malu količinu celuloze. Primarni ćelijski zid se sastoji od nekoliko slojeva celuloznih mikrofibrila koji su nasumično raspoređeni u okviru ovog zida. Pektin, lignin i hemiceluloze mogu se naći između ovih celuloznih mikrofibrila. Kad ćelija prestane da raste, zid počinje da se uslojava, širi i ojačava. Tada se na već postojeći primarni zid dodaju novi slojevi, koji sadrže mnogo veći procenat celuloze. Takav zid se naziva sekundarni ćelijski zid. Granica između primarnog i sekundarnog zida nije oštra tako da je teško reći gde prestaje primarni, a gde počinje sekundarni zid. U primarnim zidovima ćelija koje rastu, zapaženo je da mikrofibrile obrazuju gust splet, pri čemu su fibrile raspoređene bez reda, ostavljajući između sebe dovoljno prostora za prolaz plazmodezmi. U sekundarnom zidu one se udružuju u deblje snopove, i uglavnom raspoređuju u paralelnim nizovima, gusto zbijenim. Osnovne razlike između ova dva zida su u tome što je sekundarni zid višeslojan (primarni je jednoslojan) i sadrži mnogo celuloze. Onaj sloj sekundarnog zida koji je najdalji od plazma membrane, a najbliži je primarnom zidu označen je kao  $S_1$ , zatim sledi  $S_2$ , pa  $S_3$  koji je dosta tanak i zatvara lumen ćelije, a nalazi se uz samu plazma membranu. Često je sloj  $S_2$  najdeblji i on određuje mehaničku čvrstoću. Svaki od ovih slojeva se sastoji od celuloznih mikrofibrila, poređanih u uredene, paralelne nizove koji se razlikuje od S sloja do S sloja. Hemiceluloze i lignin su takođe prisutni u svakom od ovih slojeva. Kod  $S_1$  ugao mikrofibrila je  $60^\circ$  do  $80^\circ$  u odnosu na osu ćelije. Ugao mikrofibrila u  $S_2$  sloju je  $5^\circ$  do  $30^\circ$  u odnosu na osu ćelije, a može biti i veći u zavisnosti od toga da li je ćelija izložena spoljašnjem mehaničkom stresu. Ugao celuloznih mikrofibrila u  $S_2$  sloju značajno utiče na fizička i mehanička svojstva ćelije, kao i stabla drveta u celini. Mikrofibrili u  $S_3$  sloju su poređani u paralelne nizove, ali manje uređeno nego u  $S_2$  sloju, a mikrofibrilarni ugao je  $60^\circ$  do  $90^\circ$  u odnosu na osu ćelije (Plomion i dr. 2001).



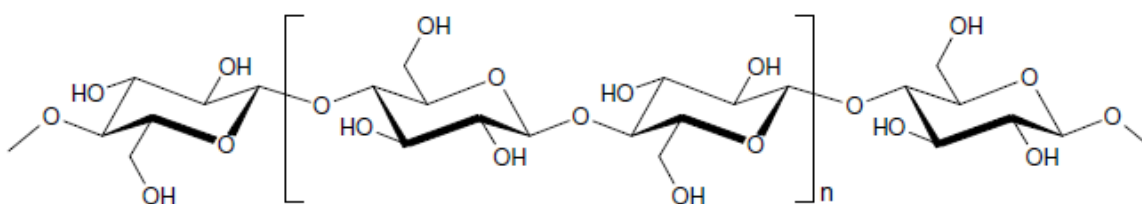
Slika 7. Šematski prikaz ćelijskog zida (prema Brändström 2002, Salmén i Olsson 1998)

### 2.3 Gradivni polimeri drveta

Glavni biopolimeri u vlaknima drveta su celuloza, hemiceluloze i lignin. Pektini, proteini i neka neorganska jedinjenja su takođe prisutni u vlaknima drveta, ali samo u manjem procentu. Vlakno drveta je izgrađeno od velikog broja različitih slojeva ćelijskog zida, kao što su primarni i sekundarni ćelijski zid. Sastav primarnog ćelijskog zida se donekle razlikuje od sastava sekundarnog ćelijskog zida. Suprotno od sekundarnog ćelijskog zida, primarni ćelijski zid mekog drveta sadrži pektin i protein, a najzastupljenija hemiceluloze su ksiloglukani (XyGs). Galaktoglukomanani (GGMs) i arabinoglukuronoksilani (AGXs), glavne hemiceluloze u sekundarnom ćelijskom zidu mekog drveta, se takođe javljaju u manjem udelu u primarnom ćelijskom zidu mekog drveta.

### 2.3.1 Celuloza ( $\beta$ -1,4-D-glukan)

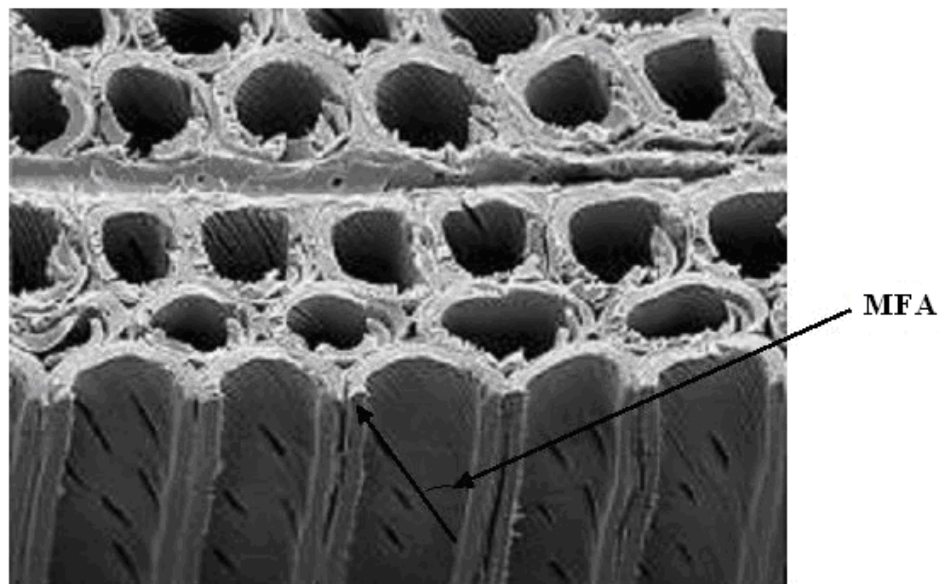
Celuloza je najzastupljeniji organski materijal na Zemlji i glavna komponenta u nastanku svih ćelijskih zidova biljaka. Celuloza čini oko 40% do 50% mase vlakna drveta, i najzastupljenija je u sekundarnom ćelijskom zidu (~50%), ali je prisutna i u primarnom ćelijskom zidu (~20%). Celuloza je linearni homopolisaharid, koji se sastoji od  $\beta$ -D-glukopiranoznih jedinica ( $\beta$ -D-Glcp), koje su međusobno povezane kovalentnim  $\beta$ -1,4-glikozidnim vezama. Ponavljajuća jedinica u celuloznom lancu je disaharidna jedinica, celobioza, koja je izgrađena od dve  $\beta$ -D-Glcp jedinice, koje su pod uglom od  $180^\circ$  jedna u odnosu na drugu (Slika 8).  $\beta$ -D-Glcp jedinice su u konformaciji stolice u molekulima celuloze i njihov stepen polimerizacije (DP, broj glukoznih ostataka u lancu) je oko 10,000 u drvetu (Sjöström 1981). Primenom rendgenske strukturne analize (RSA) i  $^{13}\text{C}$  nuklearne magnetne rezonance (NMR) utvrđeno je postojanje četiri različite kristalne modifikacije celuloze (celuloza I, II, III, IV) (Howsmon i Sisson 1963). Celuloza I (prirodna, nativna celuloza) je najzastupljenija u prirodi. Nju čine mešavina dve posebne strukturne forme: celuloza  $I_\alpha$  i celuloza  $I_\beta$ , što je pokazano  $^{13}\text{C}$  NMR tehnikom (Atalla i VanderHart 1984). Celuloza  $I_\alpha$  ima jednolančanu trikliničnu ćelijsku jedinicu, dok celuloza  $I_\beta$  ima dvolančanu monokliničnu ćelijsku jedinicu (Debzi i dr. 1991, O'Sullivan 1997).



Slika 8. Struktura celuloze

Molekuli celuloze su organizovani kao uzdužne niti, mikrofibrili, koji se sastoje od nekoliko kristalnih regiona (60 nm dužine) prekinute kristalnim ili parakristalnim površinama dužine 20 nm. Molekuli celuloze formiraju intermolekulske i intramolekulske vodonične veze. Postoje dve intramolekulske vodonične veze, O2'-H...O6 i O2'-H...O6, i jedna intermolekularna vodonična veza, O6-H...O3 (Kataoka i Kondo 1998). Ova paralelna vodonično vezana struktura lanca molekula celuloze formira mikrofibrile.

Mikrofibrili predstavljaju helikoidne strukture umotane oko ose ćelije i formiraju određeni ugao između ose ćelije i mikrofibrila (mikrofibrilni ugao- MFA), kod svakog ćelijskog sloja. U primarnom ćelijskom zidu mikrofibrili su orijentisani nasumično, dok u S<sub>2</sub> sloju postoji značajna uređenost mikrofibrila. MFA u S<sub>2</sub> sloju je jedan od najvažnijih faktora koji utiču na mehaničke osobine drveta (Burget and Fratzl 2009).



Slika 9. SEM mikrografija koji pokazuje mikrofibrile u S<sub>2</sub> sloju norveške srče sample (Andersson, 2007)

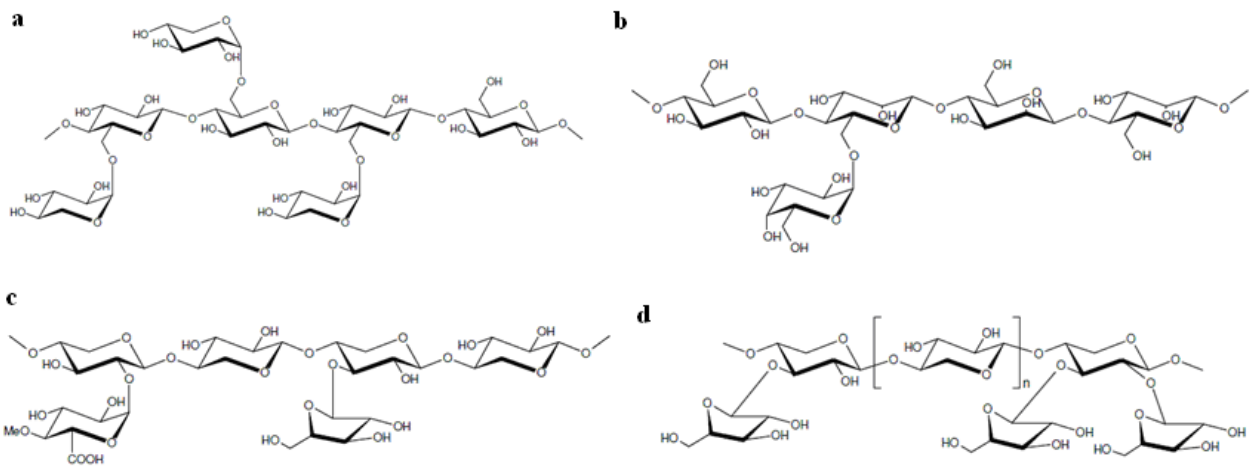
### 2.3.2 Hemiceluloze

Hemiceluloze su heteropolisaharidi. Prisutne su i u primarnom i u sekundarnom ćelijskom zidu, kao i u srednjoj lameli u manjoj količini. Hemiceluloze su velika grupa razgranatih heteropolimera, koji su izgrađeni od nekoliko monomernih jedinica piranoznih i furanoznih prstenova, kao što su  $\beta$ -D-glukopiranoza ( $\beta$ -D-Glcp),  $\alpha$ -D-ksilopiranoza ( $\alpha$ -D-Xylp),  $\beta$ -D-ksilopiranoza ( $\beta$ -D-Xylp),  $\beta$ -D-manopiranoza ( $\beta$ -D-Manp),  $\alpha$ -D-galaktopiranoza ( $\alpha$ -D-Galp),  $\beta$ -D-galaktopiranoza ( $\beta$ -D-Galp),  $\alpha$ -L-ramnopiranoza ( $\alpha$ -L-Rhap),  $\alpha$ -L-arabinofuranoza ( $\alpha$ -L-Araf) i  $\beta$ -L-arabinofuranoza ( $\beta$ -L-Araf). Neke šećerne kiseline, kao što su  $\alpha$ -D-glukopiranuronska kiselina ( $\alpha$ -D-GlcpA), 4-O-metil- $\alpha$ -D-glukopiranuronska kiselina (4-O-Me- $\alpha$ -D-GlcpA) i  $\alpha$ -D-galaktopiranuronska kiselina ( $\alpha$ -D-GalpA), su veoma važna jedinjenja kod nekih hemiceluloza. Ovi monomeri su zastupljeni u različitim odnosima u hemicelulozama.

Najčešće hemiceluloze u mekom drvetu su u primarnom ćelijskom zidu-ksiloglukani (XyGs) i u manjoj meri galaktoglukomanani (GGMs) i arabinoglukoronksilani (AGXs), a u sekundarnom ćelijskom zidu- galaktoglukomanani (GGMs) i arabinoglukuronksilani (AGXs). Hemiceluloze su amorfni polimeri. Uloga hemiceluloza u ćelijskom zidu je vezivna i da omogući fleksibilnost ćelijskog zida. Takođe su važne u formiranju celulozne mikrofibrilarne strukture tokom skladištenja celuloze u ćelijskom zidu (Atalla i dr. 1993, Carpita i McCann 2000).

Hemiceluloze se mogu klasifikovati u četiri grupe: ksilani (sekundarni ćelijski zid tvrdog drveta), ksiloglukani (primarni zid viših biljaka), manani (sekundarni ćelijski zid mekog drveta) i mešoviti  $\beta$ -glukani (žitarice) (Slika 10) (Schadel i dr. 2009).



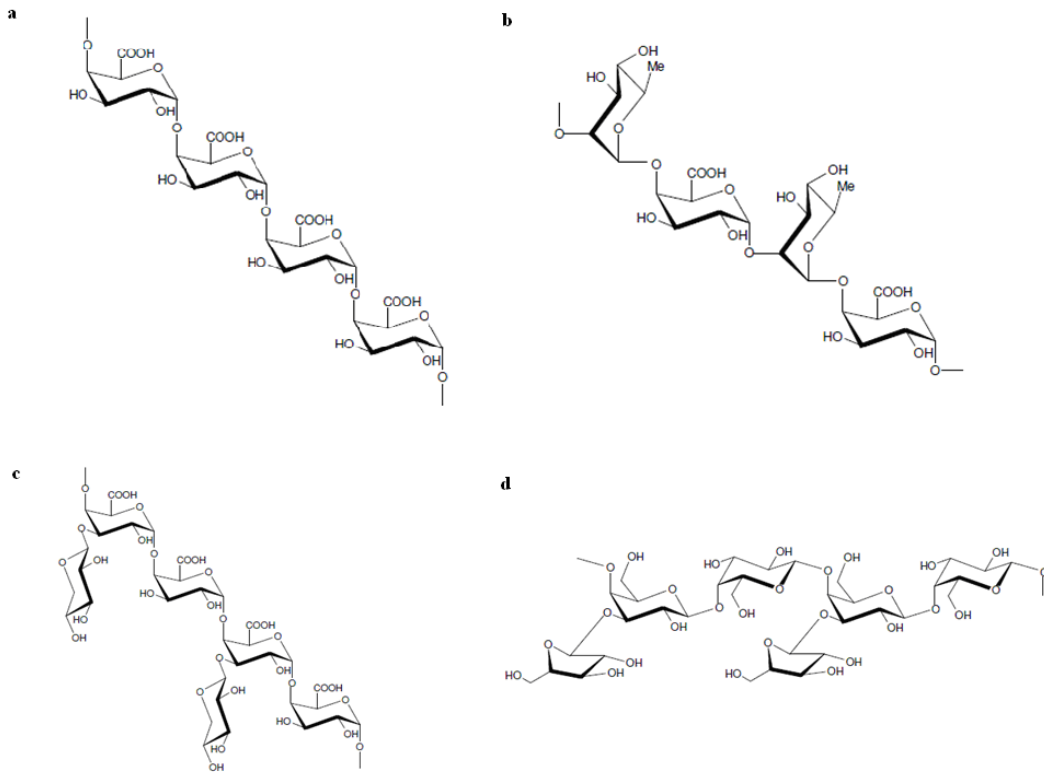


Slika 10. Strukture hemiceluloza: a) ksiloglukana, b) galaktoglukomanana, c) arabinoglukurunoksilana, d) arabinoksilana.

### 2.3.3 Pektin

Pektin je polisaharid izgrađen od poliuronskih kiselina, i može da bude kiseli i neutralan. Najčešće je polimer  $\alpha$ -D-galakturonske kiseline. Kod kiselih pektina su karboksilne grupe galakturonske kiseline slobodne ili grade estre sa metanolom ili soli sa kalcijumom. Neutralnih pektina ima znatno manje i sastoje se od lanaca arabinana i lanaca galaktana. O sekundarnoj i tercijarnoj strukturi pektina se i dalje malo zna (Ridley i dr. 2001)

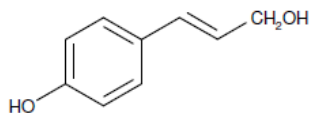
Pektinski polisaharidi se mogu podeliti u četiri grupe: (1) galakturonani (homogalakturonan (HGA), ramnogalakturonan I (RG-I), ramnogalakturonan II (RG-II) i ksilogalakturonan (XGA)), (2) arabinani, (3) galaktani i (4) arabinogalaktani (arabinogalaktan I (AG-I) i arabinogalaktan II (AG-II)) (Slika 11). Najkarakterističniji glikozilni ostatak kod pektinskih polisaharida je galakturonosilni ostatak, ali su prisutni i ramnosilni, arabinosilni i galaktosilni ostaci. Galakturonani pripadaju porodici kiselih polisaharida. Arabinani, galaktani i arabinogalaktani pripadaju grupi neutralnih polisaharida. Pektinski polisaharidi mogu biti kovalentno vezani za protein i lignin (Ishii i Shimizu 2001).



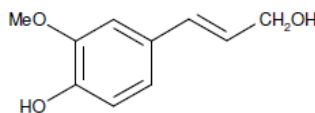
Slika 11. Strukture: a) homogalakturonana (HG), b) skeleta ramnogalakturonana I (RG-I), c) ksilogalakturonana (XGA), d) arabinogalaktana I (AG-I)

### 2.3.4 Lignin

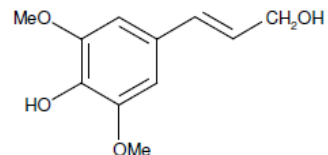
Lignin je veoma zastupljen biopolimer na Zemlji i čini 20% do 30% mase drveta. Lignin je velika familija aromatičnih razgranatih polimera, izgrađen od hidroksifenil propanskih jedinica, u trodimenzionalnoj (3D) strukturi. Lignin se nalazi u srednjoj lameli kao najzastupljeniji polimer, takođe postoji u primarnom ćelijskom zidu, ali je najveća količina nađena u sekundarnom ćelijskom zidu (Slika 12).



a) p-kumaril alkohol



b) koniferil alkohol



c) sinapil alkohol

Slika 12: Strukture monolignola

Lignin u mekom drvetu se uglavnom sastoji od jedinica koniferil alkohola, dok je lignin u tvrdom drvetu izgrađen kao kopolimer jedinica koniferil i sinapil alkohola. Ipak, postoje različite modifikacije hemijske strukture lignina u zavisnosti od biljne vrste, tkiva, kao i od različitih slojeva ćelijskog zida. Najprisutnije veze u formiranju 3D mreže kod lignina mekog drveta su:  $\beta$ -O-4 (59%),  $\beta$ -5 (17%),  $\beta$ - $\beta$  (10%), 5-5 (9%) and  $\beta$ -1 (7%) 49. Lignin je umetnut u kompleksnu strukturu ćelijskog zida kovalentnim vezivanjem sa hemicelulozama, (1)  $\alpha$ -benzil hidroksil ostatak lignina je vezan estarskim vezama sa D-Manp, D-Galp and D-Glcp ostacima na O-6 i sa D-Xylp ostacima na O-2 i O-3, (2)  $\alpha$ -benzil hidroksil ostatak lignina je vezan estarskim vezama za karboksilnu grupu D-GlcpA ostatka, i takođe (3) glikozidna veza i (4) acetal veza je moguća (Watanabe 2003). Lignin daje kompresionu snagu vlaknu, ali i omogućava da površina vlakna bude hidrofobna, što je potrebno za transport (Plomion i dr. 2001).

Biosinteza lignina vrši se preko dva procesa: biosinteze monolignola i njihove polimerizacije. Polimerizacija lignina počinje dehidrogenacijom *p*-hidroksicinamil alkohola, i kuplovanjem nastalih fenol radikala u polimer lignina. Lignin daje ćelijskom zidu rigidnost i trajnost, pa važi za veoma bitan molekul, posebno kod četinara (Strack i dr. 1988). Proces lignifikacije je bitan iz više razloga, ojačava strukturu ćelijskog zida kroz stvaranje razgranate mreže koja omogućava celuloznim fibrilima podlogu za učvršćivanje. Ova osobina je biljkama omogućila čvrstinu i rast u visinu (Sarkanen i Ludwig 1971). Lignin štiti mikrofibrilna vlakna ćelijskog zida od fizičkih, hemijskih i bioloških napada. Količina i sastav lignina zavise od biljne vrste, tipa ćelije, razvojne faze i spoljašnje sredine

(Campbell i Sederoff 1996). Uloga lignina je i u zaštiti od hemijskih i bioloških stresora (Lewis i dr. 1999).

### 2.3.5 Proteini

Proteini su važne komponente zidova biljaka. Primarni zidovi mogu sadržati do 10% proteina. Neki su labavo vezani, dok su drugi čvršće vezani. Proteini se u ćelijskom zidu javljaju kao enzimi ili kao strukturni proteini.

Neki enzimi su uključeni u završne faze formiranja ćelijskog zida (npr. peroksidaze i NADH malat dehidrogenaza), dok su neki enzimi uključeni u modifikaciju nutrijenata pre nego što ih biljna ćelija apsorbuje ( $\beta$ -galaktozidi,  $\beta$ -glukozidi)

Postoje nekoliko tipova strukturnih polimera, ali najbolje okarakterisana klasa su glikoproteini bogati hidroksiprolinom (HRGPs, ekstenzini). Pored ekstenzina prisutni su i proteini bogati glicinom, ali i proteini siromašni hidroksiprolinom (Bacic i dr. 1988).

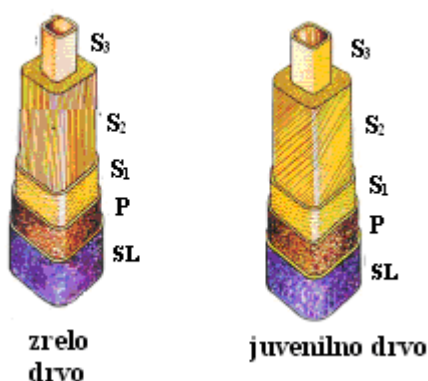
## 2.4 Juvenilno i zrelo drvo

Upotreba juvenilnog drveta danas je vrlo česta. Ovo se drvo od zrelog drveta razlikuje po svojim mehaničkim, fizičkim i tehnološkim svojstvima. Različita svojstva juvenilnog drveta mogu imati značajan uticaj na preradu drveta i proizvodnju drvnih proizvoda.

Juvenilno ili mlado drvo je drvo koje se nalazi u zoni oko srži, čiji su anatomske elementi kraći nego u kasnijim godišnjim prstenovima. Ovo drvo obično ima lošije karakteristike od okolnog drveta tako da se sa udaljenošću od centra njegove karakteristike vrlo brzo menjaju. Stariji prstenovi koji su udaljeniji od juvenilnog drveta, se označavaju kao zrelo drvo gde su struktura i svojstva značajno stabilnija. Juvenilno drvo je gotovo

cilindričnog oblika, te se njegov udeo u većim i starijim stablima smanjuje (Zobel i Jett 1995, Barcik i dr. 2005).

U poređenju sa zrelim drvetom, juvenilno drvo ima manju gustinu drveta, manju dužinu vlakana i veći sadržaj kompresionog drveta (Zobel 1981, Timell 1986). Gustina juvenilnog drveta je za 5-15% manja, u poređenju sa zrelim drvetom (Barcik i dr. 2005). Takođe, juvenilno drvo mekog drveta se karakteriše proizvodnjom aksijalnih traheida koje imaju veći mikrofibrilarni ugao u S<sub>2</sub> sloju ćelijskog zida, u odnosu na mikrofibrilarni ugao traheida zrelog drveta. U zreloom drvetu manji mikrofibrilarni ugao mu daje veću krutost i jačinu (Donaldson 1992, Donaldson i Burdon 1995, Sahlberg i dr. 1997, Larson i dr. 2001). Juvenilno drvo ima veći sadržaj lignina i ksilana, a manji sadržaj holoceluloze i  $\alpha$ -celuloze (Bao i dr. 2001).



Slika 13. Šematski prikaz strukture ćelijskog zida zrelog i juvenilnog drveta (prema <http://slideplayer.com/slide/9195071/>).

Juvenilno meko drvo se razlikuje od vrste do vrste, dok se za juvenilno tvrdo drvo može reći da se malo razlikuje od zrelog tvrdog drveta (Zobel i Buijtenen 1989, Zobel i Sprague 1998).

Jedna od najbitnijih osobina drveta je njegova uniformnost. Upravo razlike u sastavu između juvenilnog i zrelog drveta su glavni uzrok njegovog različitog kvaliteta. Juvenilno drvo se ne mora uvek okarakterisati kao lošije drvo, već kao drugačije drvo. Od njega može nastati papir koji nije dobar proizvode koji traže veću snagu cepanja, ali zato

nastaje papir koji se dobro isteže i savija za specifične papirne proizvode (Zobel 1984, Zobel i Van Buijtenen 1989). Ipak, juvenilno drvo predstavlja problem u proizvodnji zbog visokog sadržaja kompresionog drveta.

## **2.5 Reakciono drvo: tenziono i kompresiono**

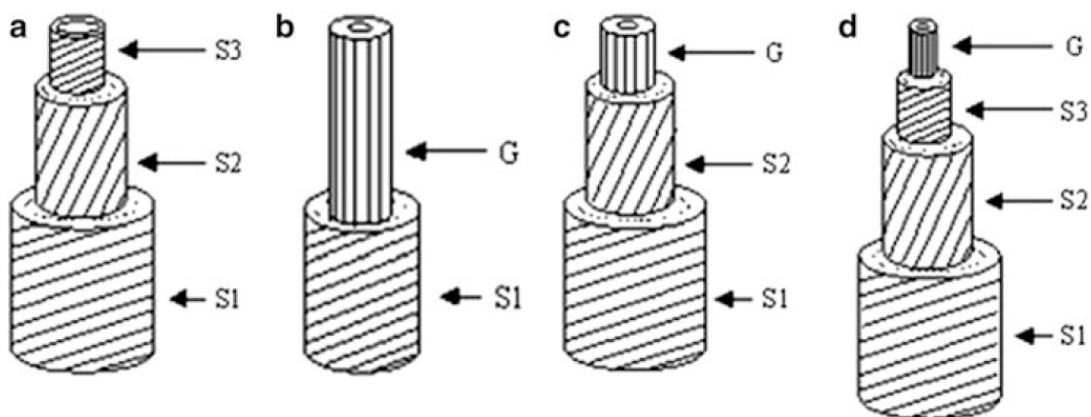
Jedan od glavnih izazova za razvoj drveta je da raste vertikalno ka svetlosti. Tokom takvog rasta, drveće se suočava sa dvostrukim izazovom: prisustvo gravitacije, ali i spoljasnji uticaj, kao što je vetar (Fournier i dr. 2013). Drveće zbog toga mora imati strukturu dovoljno jaku da izbegne i suprotstavi se savijanju zbog sopstvene težine (Jaouen i dr. 2007), ali i da može da se oporavi brzo posle dejstva npr. vetra (Almérás i Fournier 2009). Tako, drveće tokom svog života, mora da koriguje svoje držanje pomeranjem i promenom strukture drveta, a koje im omogućava da ostanu uspravni. Ovakvo izmenjeno drvo naziva se reakciono drvo i predstavlja vrstu drveta koja se javlja u nagnutim stablima i granama kako bi oni povratili normalan položaj. Kod skrivenosemenica (tvrdog drveta), reakciono drvo se razvija iznad nagnutog regiona, vukući ga. Njegovo naginjanje (naprezanje) je posledica snažnog trenda da se skuplja tokom sazrevanja (Archer 1986), tj dolazi do skraćivanja i uvrtnja. Kod golosemenica (meko drvo), ovo drvo se razvija ispod nagnutog regiona i ono gura biljku na gore (Donaldson i dr. 2004). Kod mekog drveta, ova vrsta reakcionog drveta se naziva kompresiono drvo, dok se kod tvrdog drveta naziva tenziono drvo (Bamber 2001). Drvo koje je na suprotnoj strani u odnosu na reakciono drvo se zove opoziono drvo (OW), dok se drvo koje u sebi ne sadrži kompresiono drvo zove normalno drvo (NW) (Timell 1986, Donaldson i Sing 2013).

Stres je svako stanje biološkog sistema koje odstupa od optimuma. Taiz i Zeiger definišu stres kao spoljašnji faktor koji ima nepovoljan uticaj na biljku, pri čemu se najviše misli na abiotički stres (temperatura, voda, svetlost, soli, joni, vetar, pritisak, mehanički stresori (gravitaciona sila), elektricitet, radijacija-infracrvena, vidljiva, UV, jonizujuća, radioaktivno zračenje). Po drugim autorima (Nešković i saradnici) stres predstavljaju svi

ćinioci koji nepovoljno utiĉu na rasteenje i razviće biljaka, i koji smanjuju produktivnost biljaka na nivo niži od njihovog genetiĉkog potencijala.

### 2.5.1 Tenziono drvo

Tenziono drvo se odlikuje svetlijom bojom, manjom koliĉinom ksilemskih provodnih elemenata koji su manjeg preĉnika i koji u zadebljalom ćelijskom zidu imaju veću koliĉinu celuloznih fibrila i manju koliĉinu lignina od normalnog drveta (Wilson i White 1986). Takođe, dolazi do stvaranja vlakana specifiĉne morfologije i hemijskog sastava, usled razvića tzv. želatinoznog sloja (G-sloj). Ovaj sloj je otkriven krajem devetnaestog veka, i nazivao se celulozni sloj, hrskaviĉav sloj ili želatinozni sloj zbog sadržaja celuloze u njemu, a prozraĉan je i kao Źele. Organizacija ćelijskog zida želatinoznih vlakana se može razlikovati (Jourez i dr. 2001). Kao Źto vlakno ima troslojnu strukturu u sekundarnom zidu ( $S_1$ ,  $S_2$  i  $S_3$  slojevi), želatinozna vlakna mogu imati razliĉite sheme,  $S_1+G$ ,  $S_1+S_2+G$ ,  $S_1+S_2+S_3+G$  (Slika 14).



Slika 14. Model ćelijskog zida vlakana u normalnom drvetu (a) i tenzionom drvetu (b-d) (Wardrop i Dadswell 1955).  $S_1$  (spoljašnji sloj),  $S_2$  (srednji sloj) i  $S_3$  (unutrašnji sloj) slojevi- slojevi u sekundarnom zidu. Prave linije predstavljaju orijentaciju celuloznih

mikrofibrila. (a) Normalni fibrili ne prave G-sloj. (b) G-sloj gde se  $S_2$  i  $S_3$  slojevi razvijaju normalno. (c)  $S_3$  sloj zamenjen G-slojem. (d) G-sloj formira unutrašnji sloj do  $S_3$  sloja (Kwon 2008).

Za G-sloj se dugo mislilo da je izgrađen od čiste celuloze (Norberg i Meier 1966). Ipak, utvrđeno je da postoji i mala količina lignina u njemu (Scurfield i Wardrop 1963; Yoshida i dr. 2002; Joseleau i dr. 2004; Pilate i dr. 2004; Gierlinger i Schwanninger 2006). G-sloj takođe može sadržati polisaharide, uključujući pektin i hemiceluloze (Furuya i dr. 1970, Bowling i Vaughn 2008). Obzorom da je najzastupljeniji polimer u G-sloju celuloza, to za posledicu ima da tenziono drvo kao celina sadrži manju količinu lignina i ksilana u odnosu na normalno drvo (Timell 1969, Hedenström i dr. 2009). Celulozni fibrili su u G-sloju organizovani tako da su potpuno paralelni sa uzdužnom osom vlakna (Fujita i dr. 1974).

Ipak, kada posmatramo različite vrste iz tropskih prašuma, nelignifikovan G-sloj se ne može primetiti kod svakog tenzionog drveta. Čak više od polovine vrsta ne formira nelignifikovan G-sloj (Onaka 1949, Fisher i Stevenson 1981, Clair i dr. 2006). Kod lignifikovanog tenzionog drveta, vlakno je lignifikovano, ali je celulozni mikrofibrilarni ugao (MFA) manji nego kod opozionog drveta (Yoshida i dr. 2000, Clair i dr. 2006b, Ruelle 2006, Ruelle i dr. 2008, Rouelle i dr. 2007). Rouelle (2006) je pokazao da se struktura tenzionog drveta vrste *Simarouba amara* ne razlikuje od strukture normalnog drveta kada se posmatra pod mikroskopom, i da je razlika primetna na nivou celuloznih mikrofibrila. Pokazao je da je mikrofibrilarni ugao gotovo paralelan sa osom vlakna. Sadržaj lignina je bio gotovo isti kod tenzionog i normalnog drveta *S. amara*.

Dalje su Roussel i Clair (Roussel i Clair 2015) pokazali da *S. amara* proizvodi sloj ćelijskog zida sa osobinama tipičnim za G-sloj, ali da se ovaj G-sloj može primetiti samo kao privremena faza razvoja ćelijskog zida, pošto je zamaskiran kasnom lignifikacijom. Na osnovu ovoga, može se zaključiti da je mehanizam nastajanja tenzionog drveta kod ovakvih vrsta isti kao kod vrsta sa tipičnim G-slojem, kao i kod vrsta gde se G-sloj ne može videti u zrelim ćelijama.



Kod reakcionog drveća, mikrofibrilarni ugao predstavlja odstupanje u odnosu na normalno drvo. Primjenjene su različite tehnike za utvrđivanje MFA (svetlosna mikroskopija, SEM, kao i tehnike X-zračenja (difrakciona analize). Sve te tehnike dale su uporedive rezultate. U G-slojevima, utvrđeni su mali MFA, gotovo jednaki  $0^\circ$  (Ruelle i dr. 2007).

Polimeri koji su identifikovani različitim metodama u tenzionom drvetu su, pored već pomenute celuloze, ksiloglukan (XyG), arabinogalaktan protein (APGs), ramnogalakturonan I (RG I), kao i lignin.

Prisustvo ksiloglukana u G-sloju je potvrđeno (1) biohemijskim analizama izolovanih G-slojeva, (2) vezivanjem sa odgovarajućim antitelima, i (3) prisustvom enzima ksiloglukan-endo-transglikolaze (XET), koji je specifičan za XyG (Nishikubo i dr. 2007, Mellerowicz i dr. 2008, Baba i dr. 2009, Kaku i dr. 2009).

Prisustvo APGs u G-slojevima je pokazana (1) analizom monosaharidnog vezivanja u izolovanim G-slojevima (Nishikubo i dr. 2007, Kaku i dr. 2009) i (2) imunohemijski vezivanjem sa antitelima (Lafarguette i dr. 2004, Bowling i Vaughn 2008).

Struktura i sastav lignina variraju kod normalnog drveta u zavisnosti od tipa ćelije i slojeva ćelijskih zidova (Campabell i Sederoff 1996; Rouel i dr. 1999; Donaldson 2001, Stevanic i Salmen 2009, Weng i Chapple 2010). Prema poslednjim istraživanjima postoje razlike u sastavu lignina kod vlakana i traheja, pokazujući da su vlakna bogatija jedinicama siringila u odnosu na traheje (Ruel i dr. 2009). Takve razlike su primećene i kod ćelijskih zidova tenzionog drveta (Aguayo i dr. 2010, Neutelings 2011).

Tipično tenziono drvo ima manju količinu lignina, a lignin sadrži veću količinu jedinica siringila (S jedinice) (Bland i Scurfield 1964). Smanjenje količine lignina, kao i veći odnos S/G kod lignina u tenzionom drvetu utvrđeno je i UV mikrospektrofotometrijom na magnoliji i žutoj topoli (Takeda i dr. 1998, Yoshizawa i dr. 2000, Yoshida i dr. 2002), dok su novija istraživanja primenila NMR analizu i multivarijacionu analizu podataka (Hedenström i dr. 2009). Zajedničko za sve je da sa pojavom tenzionog drveta dolazi do smanjene biosinteze lignina i hemiceluloza, dok se

biosinteza celuloze nastavlja (Plomion i dr. 2003, Pauxet i dr. 2005, Mellerowicz i Sundberg 2008).

### 2.5.2 Kompresiono drvo

Kompresiono drvo se javlja kod svih četinarara. Glavna karakteristika kompresionog drveta su izmene u strukturi ćelijskog zida. Kompresiono drvo obično ima široke godove i povećanu gustinu u poređenju sa normalnim drvetom (Plomion i dr. 2013). Kompresiono drvo se pojavljuje kao braon ili crveno-braon drvo na donjoj strani savijene stabljike (Slika). Površina koja je na suprotnoj strani od kompresionog drveta se naziva opoziono drvo. Opoziono drvo ima normalne traheide, pravougaonog oblika, bez značajnijih promena u odnosu na one kod normalnog drveta (Timell 1986). Za razliku od toga, traheide kompresionog drveta se razlikuju od traheida normalnog drveta. Traheide kompresionog drveta su kraće od traheida normalnog drveta i zaobljene su (Siripatanadilok i Leney 1985, Yoshizawa i Idei 1987). Kod kompresionog drveta, MFA ugao je veći nego kod normalnog drveta (Donaldson i Singh 2013). Kod traheida normalnog drveta, smatra se da su celulozni mikrofibrili relativno ravni,  $70-50^\circ$  u odnosu na uzdužnu osu ćelije u  $S_1$  i  $S_3$  slojevima, dok su u  $S_2$  sloju relativno okomiti,  $45-10^\circ$  (Scurfield 1973). Za razliku od toga, mikrofibrili u kompresionom drvetu su postavljeni manje ili više poprečno u  $S_1$  sloju, ali u  $S_2$  sloju pod uglom od  $30-45^\circ$  (Andersson i dr. 2000; Kwon i dr. 2001). MFA vrednosti variraju u odnosu na izabranu metodu merenja, kao i od tipa ćelije (Gierlinger i dr. 2010). Za različite vrste kompresionog drveta prijavljene su vrednosti za MFA od  $30-45^\circ$  u odnosu na osu ćelije, dok te vrednosti za normalno drvo iznose od  $5-30^\circ$ . Do takvih razlika u MFA dolazi usled različitih mehaničkih osobina (Lichtenegger i dr. 1999; Yoshida i dr. 2000). Pretpostavlja se da je mnogo viša vrednost MFA kod kompresionog drveta rezultat većeg umetanja hemiceluloza i lignina između mikrofibrila (Plomionet i dr. 2001, Öennerud 2003). Polisaharidi matriksa ćelijskog zida kompresionog drveta se razlikuju kvalitativno i kvantitativno od onog kod normalnog drveta.

Kompresiono drvo se javlja u sekundarnom ksilemu svih konifera (Yoshizawa i dr. 1986b, Yoshizawa i Idei 1987). Kompresiono drvo može biti jako i blago izraženo. Jako izraženo kompresiono drvo je od velikog interesa u drvnoj tehnologiji, jer predstavlja problem u industriji prerade drveta i dobijanja papira, celuloze i kompozitnih materijala (Ban i dr. 2004, Akbulut i Nadir 2006, Tarmian 2008). Prilikom pojave jake kompresije dolazi do promene u strukturi i anatomiji ćelijskog zida drveta. Tako dolazi do zadebljanja ćelijskog zida, gde je  $S_1$  sloj deblji, a  $S_2$  sloj podeljen na dva dela (spoljašnji  $S_{2L}$  i unutrašnji  $S_2$ ), dok je  $S_3$  sloj odsutan. Takođe je uočena pojava inter-ćelijskog prostora u srednjoj lameli (Wardrop i Dadswell 1955).

U poređenju sa normalnim drvetom, kompresiono drvo sadrži veće količine lignina (Donaldson et al. 2004) i (1→4)- $\beta$ -galaktana i proporcionalno niže količine celuloze, manana i ksilana (Nanayakkara i dr. 2009). Najkarakterističniji polisaharid kompresionog drveta je galaktan, koga u normalnom drvetu uopšte nema. Ovaj polisaharid u kompresionom drvetu *Picea abies* su prvi izolovali Bouveng i Meier 1959. Dva dodatna galaktana iz kompresionog drveta su kasnije izolovali Schreuder et al iz *Picea rubens*, i Jiang i Timell iz *Larix laricina*. Kasnijim istraživanjima utvrđeno je prisustvo galaktana imunolokalizacijom u spoljašnjem delu sekundarnog zida korišćenjem LM5 antitela (Jones i dr. 1997, Altaner i dr. 2007, Moller i Singh 2007, Mast i dr. 2007).

Procesi lignifikacije u kompresionom i normalnom drvetu praćeni su upotrebom radiokativno označenih prekursora (Takabe i dr. 1981, Takabe i dr. 1985, Terashima i Fukushima 1989, Fukushima i Terashima 1991). Ugrađivanje prekursora lignina je isto i kod kompresionog i kod normalnog drveta: *p*-hidroksifenil, gvajacil i siringil lignin. Jedinice *p*-hidroksifenila se ugrađuju uglavnom u najranijem stadijumu formiranja ćelijskog zida. U normalnom i opozitnom drvetu se to dešava u srednjoj lameli, dok se kod kompresionog drveta to dešava u srednjoj lameli i sekundarnom zidu. U kompresionom drvetu najintenzivnija lignifikacija se dešava tokom formiranja  $S_2$  sloja, dok se najintenzivnija lignifikacija kod normalnog i opozitnog drveta dešava prilikom formiranja  $S_3$  sloja (Terashima i Fukushima 1989, Fukushima i Terashima 1991, Donaldson et al. 2008). Kompresiono drvo sadrži veće količine *p*-hidroksifenil ligninskih jedinica

sintetisanih iz *p*-kumaril alkohola (Gindl 2002, Nanayakkara i dr. 2009). Kod normalnog drveta kondenzovane gvajacil jedinice su najzastupljenije u srednjoj lameli, dok ih u sekundarnom zidu ima malo. Nasuprot tome, kondenzovane gvajacil jedinice su ravnomerno raspoređene u svim regijama kod kompresionog drveta (Terashima i Fukushima 1989, Fukushima i Terashima 1991), ali ga ima manje nego u normalnom drvetu (Timell 1986, Yeh i dr. 2005). To dovodi do zaključka da kompresiono drvo pokazuje promene u raspodeli lignina kroz ćelijski zid. Lignifikacija srednje lamele je smanjena, dok je lignifikacija spoljašnjeg regiona sekundarnog ćelijskog zida, S2L sloja povećana (Lange 1950, Côté i dr. 1966). Unutrašnji deo sekundarnog zida traheida kompresionog drveta može biti neznatno više lignifikovan u odnosu na sekundarni zid normalnog drveta (Donaldson i dr. 2013).

Smanjenje celuloze u kompresionom drvetu u odnosu na normalno drvo, praćeno je takođe značajnim smanjenjem u količini glukomanana, što nije slučaj sa arabinoglukuronoksilanom (Nanayakkara i dr. 2009, Donaldson i Knox 2012, Donaldson i Singh 2013).

Mlada stabla su savitljiva i lako se savijaju pod uticajem vetra i snega na terenu. U isto vreme, mlada stabla su obično u stanju da se isprave brzo (Timell 1986). Količina kompresionog drveta u drvetu može da varira. Velika količina kompresionog drveta može imati veliki uticaj na proces pulpiranja. Vlakna kompresionog drveta su kratka, okrugla sa debelim ćelijskim zidovima. Ove osobine ih čine manje propusnim za ulazak vode. (Lohrasebi i dr. 1999). Povećana količina kompresionog drveta najčešće dovodi i do većeg udela lignina u pulpi. Samim tim će i finalni proizvod biti tamniji i pored industrijskog beljenja. Prisustvo kompresionog drveta smanjuje kvalitet papira i štampe (Timell 1986).

Kompresiono drvo mekog drveta se često povezuje sa juvenilnim drvetom (Zobel 1998). I juvenilno drvo i kompresiono drvo imaju kratka vlakna sa velikim mikrofibrilnim uglovima, veći sadržaj lignina i manji sadržaj celuloze, kao i nižu kristaličnost celuloze. Usled takvih sličnih osobina, dugo se smatralo da je juvenilno drvo isto kao kompresiono (Lee 1961, Zobel 1984, Zobel 1998). Kasnija istraživanja su pokazala da i pored mnogih

sličnosti postoje bitne razlike između juvenilnog i kompresionog drveta (Goršek i Torelli 1999, Mitrović i dr. 2015)

## **2.6 Drvo kao građevinski materijal**

Jedna od glavnih prednosti drveta kao građevinskog materijala je njegova žilavost. Ostale prednosti su: mala energija potrebna za proizvodnju, niski troškovi proizvodnje, drvo je obnovljiv materijal, drvo ima veoma veliku specifičnu snagu zbog svoje male gustine, mala gustina drveta omogućava njegov lakši transport, drvo nije elektroprovodljivo, većina drveća je netoksično, drvo je veoma otporno na stres (ekseri, zavrtnji).

Ipak, drvo ima i svoje mane: postoji velika varijabilnost u karakteristikama između vrsta; drvo je dimenzionalno nestabilno (voda može promeniti njegove osobine); snaga drveta se smanjuje kada je mokro; drvo je veoma zapaljivo; drvo je podložno termitima; drvo ne može da se koristi na visokim temperaturama; drvo je podložno truljenju i bolestima

Uprkos ovim nedostacima drvo je najčešće korišćen građevinski materijal u svetu.

### 3. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ove disertacije je bio da se istraže interakcije između polimera u ćelijskom zidu različitih drvenastih biljnih vrsti, sa fokusom na ispitivanju orijentacije polimera u ćelijskom zidu i u vezi toga njihove strukturne uređenosti i uređenosti zida kao celine.

- 1) Prvi cilj je bio da se utvrde strukturne razlike, u gorepomenutom smislu, između tvrdog (listopadnog) drveta i mekog (četinar) drveta, na primeru javora (*Acer platanoides*) i Pančićeve omorike (*Picea omorika* (Pančić) Purkyně)
- 2) Drugi cilj je bio da se utvrde strukturne razlike između kompresionog i normalnog drveta, na primeru Pančićeve omorike kao odgovor na mehanički stres kod četinarara. Takođe, da se vidi da li postoji veza između sporog rasta i jakog kompresionog drveta koje se javlja u odgovoru na gravitropijski stres. U tu svrhu su se savijale Pančićeve omorike starosti tri godine pod uglom od 90°.
- 3) Treći cilj je bio praćenje strukturnih razlika između pravih i savijenih delova stabla povijuša (*Dioscorea balcanica*) kao poređenje sa formiranjem reakcionog drveta kod drvenastih vrsta, kao i da se ispita uloga parenhima u savijanju povijuša, što je do sada veoma malo ispitivano.
- 4) Četvrti cilj je bio utvrđivanje razlike u količini lignina kod reakcionog i normalnog drveta na primeru Pančićeve omorike i povijuše *Dioscorea balcanica* primenom EPR spektroskopije

## **4. MATERIJAL I METODE**

### **4.1 Biljni materijal**

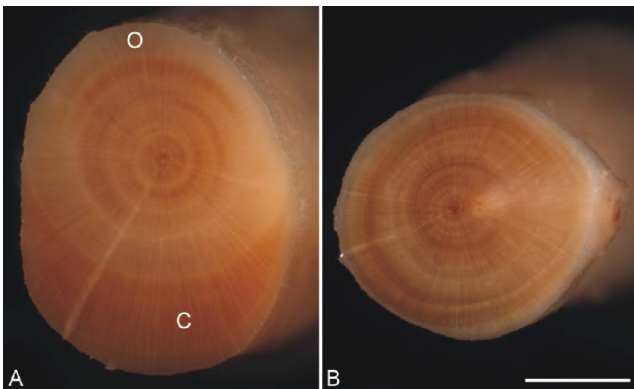
U ovom radu korišćene su tri različite biljne vrste. Korišćeni su ćelijski zidovi izolovani iz grana Pančičeve omorike (*Picea omorika* (Pančić) Purkyně) i iz grane javora (*Acer platanooides*), zatim stabljike *Dioscorea balcanica* (prirodna povijuša), kao i stabla Pančičeve omorike (normalno i kompresiono drvo) starosti 3 godine.

### **4.2 Uzorkovanje stabljika Pančičevih omorika**

Biljke Pančičeve omorike (*Picea omorika* (Pančić) Purkyně) starosti 3 godine, visine oko 70 cm, uzgajane su u plastičnim saksijama. Savijene su žicom pod uglom od 90° u oktobru 2009. godine, na kraju vegetacionog perioda. Korišćenjem žica iste dužine obezbeđena je jednaka sila savijanja za sve savijene biljke. Žice su sa jedne strane fiksirane za ivicu saksije, a sa druge, preko gumenog štitnika, postavljene na visini od 37 cm od osnove stabla (Slika 15). Biljke istog uzrasta su uzimane za kontrolu, koje su uzgajane pod istim uslovima kao savijene biljke, ali bez savijanja.



Slika 15. Savijeno i pravo (kontrolno) stablo Pančićeve omorike.



Slika 16. Poprečni presek stabla: a) savijene (C- kompresiono drvo, O- opozitno drvo), b) prave (kontrola) Pančićeve omorike

Uzorci stabala (dužine oko 3 cm) su uzimani na dan kada je započeto savijanje (oktobar 2009., pred kraj vegetativne sezone), tokom zimske sezone (2 meseca od savijanja, decembar 2009.), u proleće (6 meseci posle savijanja, april 2010.) i godinu dana nakon savijanja (oktobar 2010). Kod kontrolnih biljaka (biljke koje nisu savijene), uzorci stabla (dužine 3-4 cm) su uzimani na visini od oko 10 cm od osnove stabla, dok su kod



savijenih biljaka uzorci (dužine 3-4 cm) uzimani na visini od 10, 20 i 30 cm od osnove stabla. Uzorci su odmah bili liofilizovani i zatim sečeni na mikrotomu (pravljjeni su uzdužni preseći).

### 4.3 Uzorkovanje stabljika povijuše *Dioscorea balcanica*

*Dioscorea balcanica* su gajane u staklari, pod dnevnom svetlosti (od februara do juna) na temperaturi od 25 °C. Korišćene su biljke visine od 1,2 – 1,6 m sa 10-12 razvijenih internodija. Prva, ali i druga i treća internodija su bile prave, dok je od pete internodije počinjalo lagano uvijanje.



Slika 17. *D. balcanica* Košanin u Botaničkoj bašti „Jevremovac“ u Beogradu: a) cvetajuća ženska biljka; b) detalj koji prikazuje uvijanje stabljike; c) shema eksperimentalne biljke

Osam biljaka je upotrebljeno za hemijske analize (fotometrijske i hromatografske analize), 4 biljke za FDLD mikroskopiju i 2 biljke za FTIR mikrospektroskopiju. Za izolaciju ćelijskog zida, fotometrijske metode kao i za FDLD mikroskopiju radila se analiza od prve do pete internodije. Za FTIR spektroskopiju izabrane su prva, treća (ravne

internodije) i sedma (uvijena) internodija, dok su se za EPR spektroskopiju koristile internodije od prve do šeste.

#### **4.4 Izolacija ćelijskog zida**

Za izolaciju ćelijskih zidova iz grana Pančičeve omorike i javora, kao i iz stabljika *D. balcanica* primenjena je ista procedura izolacije ćelijskih zidova. Biljni materijal je sušen 72 h na 80 °C. Uzorak je homogenizovan 60 min u 80 % metanolu, na sobnoj temperaturi uz stalno mešanje. Dobijeni ekstrakt je centrifugiran 5 min na 1500 obrtaja/minuti. Uzorak je ekstrahovan dva puta sa 80 % metanolom i dalje tretiran nizom rastvarača. Talog je ispiran dva puta 80 % metanolom, zatim po jedan put rastvorima 1 M NaCl i 0,5 % Triton X-100, po dva puta destilovanom vodom i 100 % metanolom i dva puta 100% acetonom (Chen i dr. 2000). Svako ispiranje je bilo u ukupnoj zapremini od 20 ml i trajanju od 30 min. Da bi ekstrakcija ćelijskog zida bila što efikasnija prilikom tretmana određenim rastvaračem korišćen je FastPrep-24 Sistem (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA). Instrument je prilagođen sa adapterom za tube od 50 ml, BigPrep (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA). Svaki uzorak je tretiran 30 s, brzinom 4,5 m/s u BigClean tubama od 50 ml napunjenih matricom od inertnih čeličnih kuglica (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA).

#### **4.5 FTIR spektroskopija**

Infracrvena (IC) spektroskopija je važna metoda za hemijsku i fizičku karakterizaciju polimernih materijala. Zasnovana je na principu gde molekuli apsorbuju IC zračenje na određenoj frekvenciji, pobuđujući ga na viši energetska nivo. IC snop zračenja pokriva širok opseg frekvencija. Kada to zračenje prolazi kroz uzorak, energiju, na pojedinim frekvencijama, apsorbuje uzorak. Kao rezultat ove apsorpcije, dobija se grafikon zavisnosti apsorbovane energija od frekvencije. Fourier Transform (FT) infracrvena

spektroskopija se zasniva na merenju apsorbancije u funkciji vremena, dok se konvencionalna spektroskopija zasniva na merenju apsorbanje u funkciji frekvencije ili talasne dužine. Ovaj način registrovanja spektra je mnogo efikasniji, pošto se istovremeno detektuju sve frekvencije koje sistem emituje ili apsorbuje. Sastavni deo svakog FTIR spektrometra je interferometar, uglavnom Majkelsonovog tipa, koji istovremeno zapaža sve frekvencije zračenja izvora i moduliše ih na niže frekvencije koje se mogu detektovati i pojačavati. Majkelsonov interferometar je dvozračni interferometar koji daje interferencionu sliku kao rezultat interferencije dva zraka istih amplituda.

#### **4.6 FTIR mikro-spektroskopija**

FTIR mikro-spektroskopija se zasniva na kombinaciji statičke FTIR spektroskopije sa svetlosnom mikroskopijom. U slučaju opreme koja se koristi u ovoj tezi (PerkinElmer Spotlight 400), mesto gde se stavlja uzorak se pokreće malim koracima od 6,25  $\mu\text{m}$  dok neprekidno traje skeniranje sa srednjim-IC zračenjem. Ovo, zajedno sa specijalno dizajniranom optikom u mikroskopu i posebno dizajniranim detektorom, dozvoljava da se uzorak skenira preko željenog područja, što kao rezultat daje potpunu IR spektralnu sliku uključujući i spektralne informacije. Ovo znači da je uzorak analiziran lokalno, do mikrometerske skale sa rezolucijom piksela 6,25  $\mu\text{m}$ , gde jedan piksel ima veličinu 6.25  $\mu\text{m}$  x 6.25  $\mu\text{m}$  od kojih se jedan spektar prikuplja. Vidljiva CCD (CCD senzor) kamera je ovde takođe integrisana, što daje mogućnost da se dobije vidljiva slika skeniranog uzorka, gde IC slika potpuno odgovara vidljivoj slici.

Takođe, postoji mogućnost IC skeniranja sa polarizacijom, kada se IC zračenje polarizuje polarizatorom (zlatna žičana mreža), u našem slučaju, od  $0^\circ$  do  $90^\circ$  polarizacija i u odnosu na orijentaciju vlakana u intervalima od  $5^\circ$ . Na ovaj način, moguće je da se posmatra, na primer, orijentacija različitih polimera u vlakanima drveta. Ako se FTIR spektri snime u dva pravca polarizacije, tj  $0^\circ$  i  $90^\circ$ , onda se orijentacioni spektar može izračunati kao što je prikazano u jednačini:

$$R = \log \frac{T_{90^\circ}}{T_{0^\circ}}$$

gde je  $R$  spektar orijentacije,  $T_{0^\circ}$  je transmisioni spektar snimljen na  $0^\circ$  i  $T_{90^\circ}$  je transmisioni spektar snimljen na  $90^\circ$ .

Ovo određuje da li vibracija jedne funkcionalne grupe, odnosno polimer koji poseduje ovu funkcionalnu grupu, je orijentisana manje ili više paralelno ili normalno u odnosu na referentnu orijentaciju, koja je paralelna polarizacionom pravcu od  $0^\circ$ .

Za preciznije određivanje orijentacije različitih polimera primenjuje se jednačina:

$$RA = \left( \frac{I_P - I_{\min}}{I_{\max} - I_{\min}} \right)$$

gde je  $RA$  relativna apsorbancija,  $I_P$  je intenzitet apsorbiranog IR zračenja na datom uglu polarizacije,  $P$ ,  $I_{\max}$  je maksimalni intenzitet dobijen za datu vibraciju, a  $I_{\min}$  je minimalni intenzitet dobijen za datu vibraciju. Relativne vrednosti apsorpcije su predstavljene u odnosu na ugao polarizacija (od  $0^\circ$  do  $90^\circ$ ).

FTIR spektroskopija je brz, neinvazivni spektroskopski metod koji može kvalitativno i kvantivno da otkrije veliki broj funkcionalnih grupa kao što su karboksilni estri, fenolni estri, proteinski amidi i karboksilne kiseline, i može da obezbedi kompleksni „otisak prsta“ ugljenohidratnih i fenilpropanoidnih konstituenata ćelijskog zida i donekle da predvidi njihovu organizaciju (McCann i dr. 1992, Sene i dr. 1994).

#### **4.7 FTIR spektroskopija i mikroskopija za javor i Pančićeve omoriku**

Za merenja FTIR mikroskopije korišćen je Spectrum Spotlight 400 FTIR Imaging System (Perkin Elmer Inc, Shelton, CT, USA). Odabrana površina se prvo prikaže upotrebom vidljive CCD kamere kako bi se locirala površina ćelijskog zida, koja je zatim ozračena srednjim IC zračenjem. Piksel rezolucija:  $6,25\mu\text{m} \times 6,25\mu\text{m}$ , spektralna rezolucija  $4\text{ cm}^{-1}$  i opseg merenja od  $1800\text{ cm}^{-1}$  do  $720\text{ cm}^{-1}$ .

#### **4.8 FTIR spektroskopija za prave i savijene Pančićeve omorike**

FTIR spektroskopska merenja su vršena na FT-IR Spektrometru Varian 680-IR. Uslovi rada: opseg merenja:  $2000\text{-}700\text{ cm}^{-1}$ ; rezolucija:  $4\text{ cm}^{-1}$ . Spektri su snimani od  $0^\circ$  do  $90^\circ$  polarisation u odnosu na orijentaciju vlakna u intervalima od po  $5^\circ$ . Spektri su obrađivani pomoću softvera Digilab FTIR Software 3.3.

#### **4.9 FTIR spektroskopija za *D. balcanica***

Površina od  $50\mu\text{m} \times 50\mu\text{m}$  u ćelijskom zidu parenhima je izabrana. Spektri su snimani na ThermoNicolet Nexus spektrometru (Madison, WI) sa Continuum microscope accessory. Dvadeset spektara za svaku internodiju je snimljeno za svaku internodiju u transmissionom modu uz rezoluciju od  $4\text{ cm}^{-1}$ . Urađena je zatim bazna linija i normalizovani su po Robin i dr. (2003). Spektri odgovarajućih internodija od dve biljke su slični, tako da će biti prikazani samo odabrani spektri.

#### **4.10 Ekstrakcija fenola vezanih za ćelijski zid**

Fenoli vezani za ćelijski zid ekstrahovani su iz izolovanog ćelijskog zida alkalnom hidrolizom. Količina od 200 mg ćelijskih zidova od prve do pete internodije je resuspendovana u 2 ml 1 M ključalog rastvora (80 °C) NaOH i inkubirana na sobnoj temperaturi ukupno 17 h. Rastvor je centrifugiran, a talog dobijen nakon centrifugiranja je ispran dva puta destilovanom vodom, osušen (24 h na 80 °C) i upotrebljen za kvantifikaciju lignina.

#### **4.11 Određivanje koncentracije lignina**

Kvantifikacija lignina je urađena pomoću acetilbromidnog testa, po Morrisonovoj proceduri (Morrison 1972). U acetil bromidnom testu 2,5 mg ćelijskog zida se pomeša sa 250 µL acetil-bromida rastvorenog u glacijalnoj sirćetnoj kiselini. Smeša se inkubira 30 minuta na 70 °C, materijal se zatim ohladi na ledu i doda se 250 µL 2 M rastvora NaOH. Smeša se centrifugira 5 minuta na 15000 obrtaja/minuti. Količina od 250 µL dobijenog supernatanta se pomeša sa 5 µL 15 M rastvora hidroksiamina i 2495 µL glacijalne sirćetne kiseline. Ovako dobijenim uzorcima očitava se apsorbancija na 280 nm. Standardna prava se dobija korišćenjem rastvora koniferil alkohola, koji je sveže pripremljen, u opsegu 10-150 µL. Koncentracija lignina se izražava kao µmol ekvivalenata koniferil alkohola po mg ćelijskog zida

#### 4.12 Diferencijalno-polarizaciona laserska skanirajuća mikroskopija (DP-LSM)

Tehnike polarizacione mikroskopije se primenjuju u kristalografiji, naukama o materijalima i biologiji za bolju vizuelizaciju ili za identifikaciju anizotropnih domena (Robinson i Bradburry 1992, Bradburry i Evennett 1996). Polarizacioni mikroskop je svetlosni mikroskop sa polarizatorom i specifičnim analizatorom, pa stoga može dati dodatne informacije u odnosu na svetlosni mikroskop. Kod anizotropno organizovanih materijala dolazi do linearnog dvostrukog prelamanja (LB). Upotrebom rotirajućih polarizatora dvostruko prelamanje se može kvantifikovati. Anizotropni materijali često pokazuju linearni dihiroizam, kao i polarizovanu fluorescentnu emisiju. Oni potiču od anizotropne prostorne rezolucije apsorbance i od emisije prelaznih dipola. Linearni dihiroizam i polarizovana fluorescentna emisija kod pigmentisanih materijala, kao što su fotosintetske membrane se mogu primetiti u vidljivoj spektralnoj oblasti (Axelrod 1989). Kod nepigmentisanih materijala koriste se specifične boje.

Diferencijalno polarizovani lasersko skenirajući mikroskop (DP-LSM) za koji su Garab i dr. 2005 napravili dodatak, korišćen je u izradi ove disertacije se takođe bazira na upotrebi visokofrekventne modulacije i detekcije pomoću lock-in pojačala. U ovom sistemu je moguće menjati i ekscitaciono i emisiono zračenje (Garab i dr. 2005b). Pored linearnog dihiroizma (LD) i linearnog dvostrukog prelamanja (LB), može se meriti i fluorescentno detektovan linearni dihiroizam (FDLD) i fluorescentno detektovan cirkularni dihiroizam (FDCD), kao i linearna i kružna anizotropija, ali i stepen polarizacije fluorescentne emisije u konfokalnom režimu mikroskopa, pa samim tim dati bolju rezoluciju i kvalitet slike.

Kako bi ovaj LSM mogao da meri diferencijalnu polarizaciju (DP) piksel po piksel u realnom vremenu, konstruisan je DP dodatak koji se bazira na principu visokofrekventne modulacije i brze demodulacije. Za fluorescenciju se koristi DP dodatak za analize polarizacionog stanja emisije.

Za LB, LD i FDLD merenja, fotoelastični modulator (PEM) mora biti postavljen između lasera i glavnog DB delitelja. LD (ne-konfokalne) i FDLD (konfokalne) slike se mogu prikazati jedna do druge, kao i do odgovarajućih transmisionih i fluorescentnih slika.

Transmisione i konfokalne fluorescentne slike uzoraka su snimljene na Zeiss LSM-410 koristeći Ar-ion (488 nm) laser opremljen sa dodatkom za diferencijalnu polarizaciju (DP) (Garab i dr. 2005, Steinbach i dr. 2009.), za snimanje glavnih DP osobina anizotropnih mikroskopskih objekata. DP deo modulira polarizaciono stanje pobuđenog laserskog zraka na 100 kHz između horizontalno i vertikalno linearne polarizacije, koristeći fotoelastični modulator (PEM-90, Hinds instrumenti).

Slike su u rezoluciji od 512x512 piksela, na površini od 64x64  $\mu\text{m}$ . Svaka slika se sastoji iz dva kanala, FDLD (fluorescencijom detektovan linearni dihiroizam) kanala i kanala fluorescente emisije. FDLD vrednosti za dipole orijentisane duž y-ose odgovaraju 1, dok vrednosti dipola orijentisani duž x ose odgovaraju -1. Vrednosti FDLD su u rasponu od -1 do +1 zbog definicije:  $\text{FDLD} = (I_1 - I_2) / (I_1 + I_2)$ . ( $I_1, I_2$  - Intenzitet fluorescencije meren sa horizontalno odnosno vertikalno polarizovanom pobudom, respektivno)

Obrada slike se obavlja korišćenjem ImageJ programa sa makroima razvijenim za ovu analizu. Osmobitne TIFF slike su postavljene da imaju skalu boje od plave (# 0000FF) do žute (# FFFF00). Sadržaj je odatle izvezen za dalju numeričlu analizu. Žuta boja označava celulozna vlakna paralelna sa Y osom, dok plava boja označava celulozna vlakna koja su normalna u odnosu na osu. Svi uzorci su obojeni sa Kongo crvenim. Kongo crveno je ranije korišćen za određivanje orijentacije celuloznih fibrila u biljkama. Oni su inkubirani tokom 2 h u 1 % (v / v) rastvora Kongo crveno (Fluka) na sobnoj temperaturi, i isprani destilovanom vodom.



#### 4.13 EPR spektroskopija

EPR spektroskopija se primenjuje za ispitivanja razlika u strukturi kod kompresionog i normalnog drveta kod Pančičeve omorike, kao i kod pravih i krivih delova povijuše (*Dioscorea balcanica*), kao metoda za ispitivanje lignin radikala.

EPR spektroskopija detektuje paramagnetske vrste, posebno organske slobodne radikale. Informacije koje se mogu dobiti iz EPR merenja su:

- 1) Broj radikala
- 2) Promena u broju radikala do kojih dolazi usled hemijskih, fizičkih ili bioloških promena
- 3) Molekularna struktura radikala.

Na Bruker Elexys II E540 EPR spektrometru mereni su uzorci stabla Pančičeve omorike prave (kontrola) i krive (kompresiona i opozitna strana), kao i uzorci stabla povijuše *D. balcanica* od prve do šeste internodije, pri čemu su dobijani spektri lignin radikala. Merenja su vršena na sobnoj temperaturi, pri sledećim uslovima: modulaciona frekvencija 100kHz, mikrotalasna frekvencija 9,8 GHz, mikrotalasna snaga 10 mW, modulaciona amplituda 2G i širina polja oko 400G. Određena je visina, širina i površina svakog EPR pika. Takođe su pod istim uslovima snimani spektri različitih masa lignin model jedinjenja (DHP) i pravila se kriva zavisnosti površine od mase. Na osnovu toga određena je količina lignina.

#### 4.14 Svetlosna mikroskopija

Suvi poprečni presezi stabljike *D. Balcanica* su potopljeni u vodu na 2 h, a zatim obojeni sa 0,1 % Toluidin plavim O (O'Brien i dr. 1964) ili 2 % floroglucinol-HCl (Jensen 1962). Preseci su ispitivani i fotografisani sa Zeiss Axiovert svetlosnim mikroskopom (Carl Zeiss GmbH, Göttingen, Germany). UV mikroskopija (pobuda na 358 nm) je rađena na Carl Zeiss Axiovert fluorescentnom microscopu (Carl Zeiss GmbH, Göttingen, Germany).

#### 4.15 Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM)

Optička mikroskopija je jedna od metoda ispitivanja makroskopskih detalja prostorne strukture materijala. Sa druge strane, korišćenje talasnih osobina elektrona u elektronskom mikroskopu omogućuje nam istraživanje finih detalja strukture i do nekoliko međuatomskih rastojanja (0.1 nm).

Skenirajući mikroskop koristi se za izuzetno precizno određivanje površinske i prostorne strukture materijala. SEM-om se obično snimaju provodni materijali dok je za neprovodne materijale potrebna posebna priprema. Uobičajna tehnika pripreme neprovodnih materijala je nanošenje nanometarskog sloja provodnog materijala kao što su zlato i srebro na uzorak, ili njihovim rasprskivanjem po uzorku. (Scanning Electron Microscopy and X-ray Microanalysis Third Edition Joseph I. Goldstein, Dale E. Newbury, Patrick Echlin, David C. Joy, Charles E. Lyman, Eric Lifshin, Linda Sawyer, Joseph R. Michael 2003 Springer US).

Suvi poprečni presezi stabljike prekriveni zlatom ispitivani su TESCAN VEGA 3 SB skenirajućim elektronskim mikroskopom (SEM) koji radi na 20 kV (TESCAN, Brno, Czech Republic).

#### 4.16 Statistička analiza

Za utvrđivanje značajnosti razlike između FTIR spektara prve, treće i sedme internodije *D. balcanica* primenjena je jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA, F Test). Studentov *t* test je korišćen za međusobno upoređivanje internodija (3.vs1., 7.vs3. i 7.vs1.) za svaki pojedinačan talasni broj FTIR spektra (Mouille i dr. 2003). Stepem varijacije FTIR signala između parova internodija koji je pokazan *t*-testom (izražen u procentima) je utvrđen kao odnos između zbira kvadrata varijacija između internodija i sume kvadrata ukupne varijacije (plava linija i leva Y-osa, slika) za svaki talasni broj spektra (X-osa).

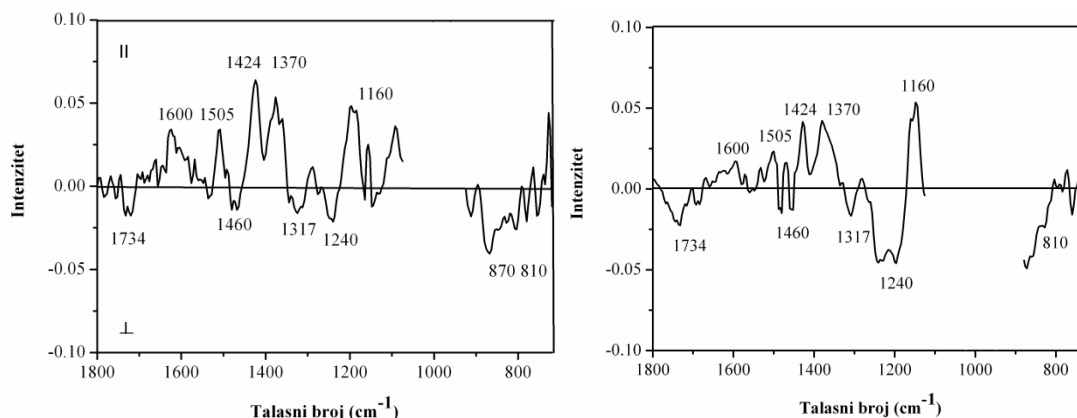
Za upoređivanje sadržaja lignina, kao i ukupnih fenola, ali i za određivanje maksimuma Gaussianovih krivih između stabljika internodija primenjivala se jednofaktorska ANOVA.

Kod svih testova,  $p \leq 0,05$  kako bi se utvrdila „značajna razlika“.

## 5. REZULTATI I DISKUSIJA

### 5.1 Utvrđivanje strukturnih razlika između tvrdog (listopadnog) drveta i mekog (četinar) drveta, na primeru javora (*Acer platanooides* L.) i Pančičeve omorike (*Picea omorika* (Pančić) Purkyně)

Slika 18 predstavlja usrednjene spektre orijentacije za uzorke ćelijskih zidova Pančičeve omorike i javora. Mogu se identifikovati spektralni signali koji se odnose na apsorbanca celuloze, hemiceluloze (glukomanana i ksilana) i lignina u opsegu od 1800 do 720  $\text{cm}^{-1}$ . Pozitivni signali ukazuju da su njihove korespondentne funkcionalne grupe organizovane više paralelno u odnosu na osu vlakna, dok negativni signali ukazuju da su korespondentne funkcionalne grupe orijentisane više normalno u odnosu na uzdužnu osu vlakna.



Slika 18. Usrednjeni spektri orijentacije Pančičeve omorike (levo) i javora (desno). Apsorpcioni pikovi, karakteristični za različite polimere drveta, su obeleženi na svakom spektru; celuloza- 1160, 1317, 1370 i 1424  $\text{cm}^{-1}$ ; ksilan- 1240, 1460 i 1734  $\text{cm}^{-1}$ ; glukomanan- 810 i 870  $\text{cm}^{-1}$ ; lignin- 1505 i 1600  $\text{cm}^{-1}$ .

Za celulozu, i kod Pančičeve omorike i kod javora, uočene su tri vibracione trake na  $1160\text{ cm}^{-1}$ ,  $1370\text{ cm}^{-1}$  i  $1424\text{ cm}^{-1}$ , kao i to da su paralelno orijentisane u odnosu na uzdužnu osu (Liang i dr. 1960; Marchessault 1962; Åkerholm i dr. 2004). Intenziteti pikova su visoki i oštri. Vibracija celuloze na  $1317\text{ cm}^{-1}$  (Liang i dr. 1960; Marchessault 1962; Åkerholm i dr. 2004) je takođe vidljiva, i ona je orijentisana normalno u odnosu na lanac celuloze.

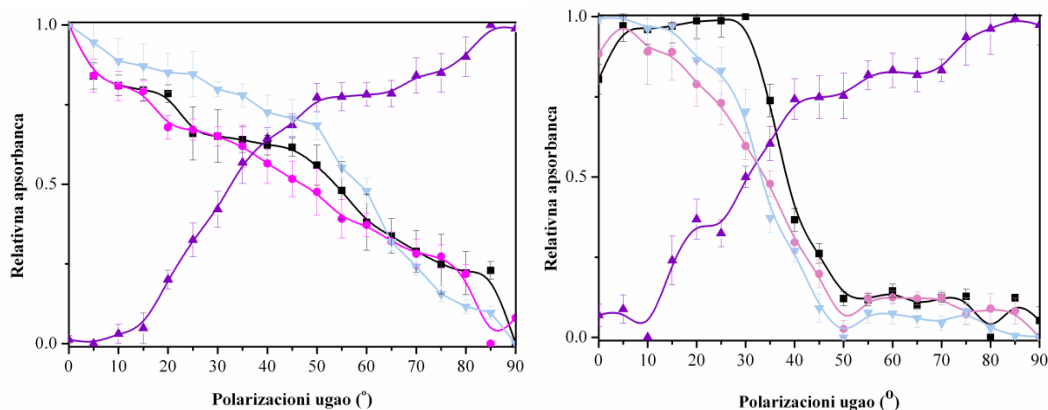
Za ksilan, i kod Pančičeve omorike i kod javora, uočen je negativan signal koji potiče od vibracije na  $1734\text{ cm}^{-1}$  (Liang i dr. 1960; Marchessault 1962; Åkerholm i Salmén 2001). Uočene su takođe trake na  $1460\text{ cm}^{-1}$  i  $1240\text{ cm}^{-1}$  (Liang i dr. 1960; Marchessault 1962) u negativnom polju. Intenzitet ovih traka je dosta nizak. Sve ove ksilanske grupe su orijentisane normalno u odnosu na molekularnu osu. Zbog toga, negativne vibracije ksilana znače da je ksilan orijentisan paralelno u odnosu na uzdužnu osu ćelijskog zida.

Apsorpcione trake koje se povezuju sa glukomananom uočene su na  $810\text{ cm}^{-1}$  (vodonik u ekvatorijalnoj ravni na C2 atomu) (Liang i dr. 1960; Marchessault 1962; Åkerholm i Salmén 2001). Pikovi su negativni i kod Pančičeve omorike i kod javora. Ova grupa je orijentisana ortogonalno u odnosu na glavni lanac glukomanana, što je razlog da se zaključi da je glukomanan takođe orijentisan paralelno u odnosu na uzdužnu osu ćelijskog zida kod oba drveta. Traka na  $870\text{ cm}^{-1}$  uočena je kod Pančičeve omorike, što može biti zbog većeg sadržaja glukomanana kod četinara, u odnosu na javor.

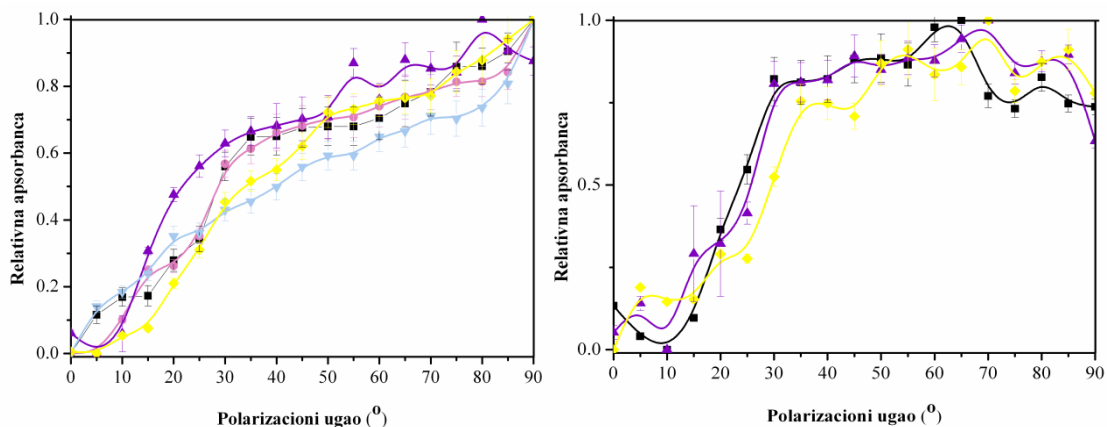
Dve karakteristične vibracije su analizirane za lignin. Vibracija lignina na  $1505\text{ cm}^{-1}$  (Atalla i Agarwal 1985, Faix 1991) pokazuje pozitivnu orijentaciju strukture lignina kod oba uzorka. Vibracija lignina na  $1600\text{ cm}^{-1}$  (Atalla i Agarwal 1985, Faix 1991) takođe pokazuje pozitivnu orijentaciju ligninske strukture kod oba uzorka. Pošto su ove vibracije paralelne aromatičnoj prstenastoj strukturi, može se zaključiti da je orijentacija lignina paralelna uzdužnoj osi ćelijskog zida.

Slike 19, 20 i 21 predstavljaju zavisnost relativne apsorbanice različitih pikova od polarizacionog ugla u fragmentima ćelijskih zidova grana Pančičeve omorike i javora. Za

svaki polarizacioni ugao, izračunata je srednja vrednost apsorbance iz tri originalne vrednosti za izabrane tačke.

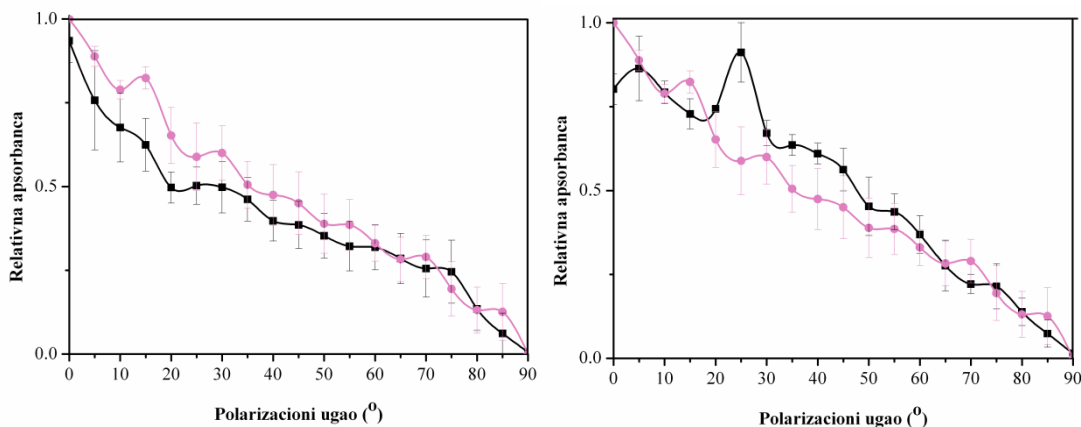


Slika 19. Grafik zavisnosti relativne absorbance karakterističnih IC apsorpcionih traka celuloze od polarizacionog ugla za Pančičevu omoriku (levo) i javor (desno): (Plavi obrnuti trouglovi) C-O-C istežanje na  $1160\text{ cm}^{-1}$ , (ljubičasti trougao)  $\text{CH}_2$  mašuća na  $1317\text{ cm}^{-1}$ , (roze krug) C-H savijanje na  $1370\text{ cm}^{-1}$  i (crni kvadrat) C-OH savijanje na  $1424\text{ cm}^{-1}$



Slika 20. Grafik zavisnosti relativne absorbance karakterističnih IC apsorpcionih traka hemiceluloze (ksilan i glukomanan) od polarizacionog ugla za Pančičevu omoriku (levo) i javor (desno): Ksilan: (roze krug) C-O istežanje na  $1240\text{ cm}^{-1}$ , (žuti romb)  $\text{CH}_2$  savijanje na

1460  $\text{cm}^{-1}$ , (crni kvadrat) C=O istežanje na 1734  $\text{cm}^{-1}$ ; glukomanan: (ljubičasti trougao) H vibracija na 810  $\text{cm}^{-1}$ , (obrnuti plavi trougao) 870  $\text{cm}^{-1}$



Slika 21. Grafik zavisnosti relativne apsorbance karakterističnih IC apsorpcionih traka lignina od polarizacionog ugla za Pančičevu omoriku (levo) i javor (desno): (crni kvadrat) C=C aromatična vibracija na 1505  $\text{cm}^{-1}$ ; (roze krug) C=C aromatična vibracija plus C=O istežanje na 1600  $\text{cm}^{-1}$ .

Očigledno je (Slika 19) da tri celulozna pika (1160, 1370 i 1424  $\text{cm}^{-1}$ ) imaju visoke apsorpcije na niskim polarizacionim uglovima, što je posledica više paralelne orijentacije korespondentnih grupa u odnosu na uzdužnu osu ćelijskog zida. Četvrti celulozni pik (normalni signal na 1317  $\text{cm}^{-1}$ ) ima najveći intenzitet na najvišim polarizacionim uglovima, zbog perpendikularne orijentacije korespondentne grupe (Slika 19).

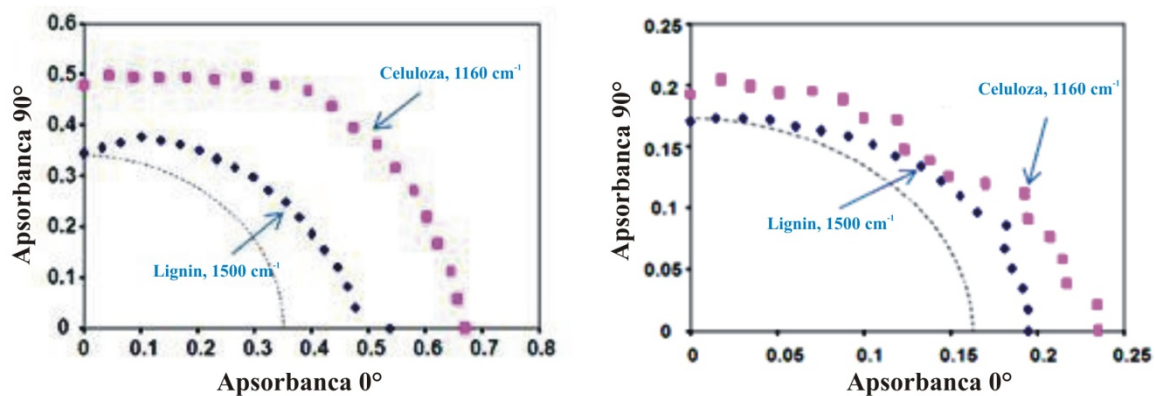
Kod hemiceluloza (glukomanan i ksilan, karakteristični signali traka (1240, 1460, 1734 i 810  $\text{cm}^{-1}$ ) rastu sa porastom polarizacionog ugla, i kod omorike i kod javora. Pošto su bočne grupe kod ksilana i glukomanana orijentisane paralelno, i ksilan i glukomanan su orijentisani paralelno u odnosu na longitudinalnu osu ćelijskog zida (Slika 20).

Kod lignina, karakteristični signali traka ( $1505$  i  $1600\text{ cm}^{-1}$ ) se smanjuju sa porastom polarizacionog ugla (Slika 21), što ukazuje da je lignin organizovan paralelno u odnosu na longitudinalnu osu ćelijskog zida i kod Pančićeve omorike i kod javora. Rezultati pokazuju da uprkos različitim ligninskim prekursorima i različitim vrstama hemiceluloze kod dva tipa drveta, lignin ima sličnu orijentaciju u odnosu na osu ćelijskog zida.

Ranija istraživanja su pokazala da različiti polimeri ćelijskog zida različito doprinose mehaničkim osobinama zida, u odnosu na orijentaciju celog zida (Bergander i Salmén 2002). Paralelna orijentacija celuloze u odnosu na longitudinalnu osu ćelijskog zida je važna za mehaničke osobine ćelijskog zida. Ovo je uočeno i u ekperimentalnim (Åkerholm i Salmén 2001), a i u model studijama (Bergander i Salmén 2002), gde je pokazano da gotovo jedino konstanta elastičnosti celuloze određuje osobine elastičnosti ćelijskog zida.

Na Slici 22 prikazana je raspodela orijentacije celuloze i lignina za Pančićevu omoriku (levo) i javor (desno).





Slika 22. Polarizacioni dijagram (0 do 90°) apsolutne apsorbance lignina i celuloze iz grane Pančičeve omorike (levo) iz grane javora (desno). Polarizacija na 0° je duž ravni polarizacije vlakna. Tačkasta linija predstavlja neorijentisane supstance.

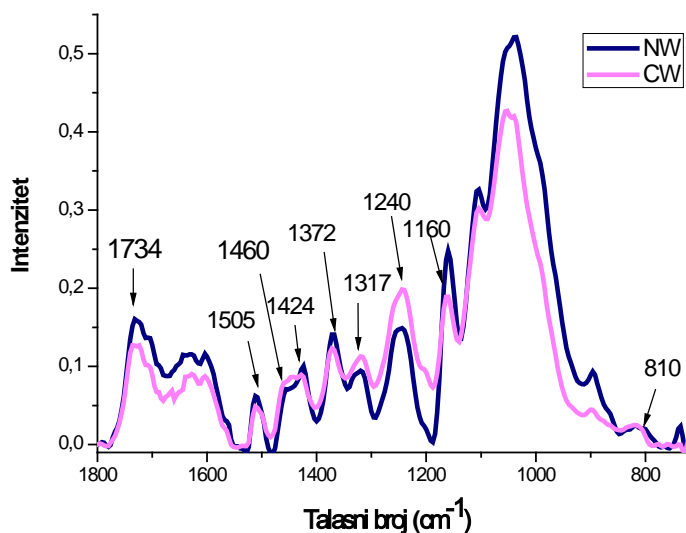
U oba slučaja najveći deo lignina je orijentisan u pravcu celuloze. Neki manji delovi lignina su manje organizovani i pokazuju izotropno ponašanje.

## 5.2 Utvrđivanje strukturne razlike između ćelijskog zida kompresionog i normalnog drveta, na primeru Pančičeve omorike kao odgovor na mehanički stres kod četinarara

Ovo istraživanje imalo je za cilj da se razume odgovor reakcionog drveta u slučaju četinarara u uslovima ozbiljnog i dugotrajnog izlaganja stresu pomoću savijanja. Proučavano je formiranje kompresionog stabla (CW) kod juvenilnih stabala Pančičeve omorike. Stabla su savijana pomoću žice pod uglom od 90° tokom jedne godine. Statičko savijanje odgovara uticaju zimskog opterećenja snega ili snega koji pada na juvenilne stabljike. Drveće izloženo savijanju proizvodi veliku količinu jako kompresionog drveta, tokom eksperimentalne sezone, što ukazuje na veliku promenu u raspodeli biomase u poređenju sa kontrolnim stablima (Mitrović i dr 2015).

Veliki MFA u juvenilnom drvetu obezbeđuje fleksibilnost tankog stabla kako bi izdržao jake vetrove bez lomova, dok mali MFA u zrelim, spoljnim godovima daje stablu krutost koja je neophodna da podrži težinu starijeg drveta. MFA varira u zavisnosti od brzine rasta i modifikuje se, zajedno sa lamelarnom strukturom ćelijskog zida u traheidima i vlaknima u reakcionom drvetu. Manja krutost juvenilnog drveta smanjuje njegovu komercijalnu vrednost i stvara probleme u pogledu povećane upotrebe u šumarstvu (Barnett i dr. 2004).

Na Slici 23. prikazani su nepolarizovani FTIR spektri normalnog i kompresionog drveta Pančičeve omorike.



Slika 23. Nepolarizovani FTIR spektri normalnog i kompresionog drveta Pančičeve omorike.

Za celulozu su uočene četiri vibracione trake na 1160 cm<sup>-1</sup>, 1317 cm<sup>-1</sup>, 1370 cm<sup>-1</sup> i 1424 cm<sup>-1</sup> (Liang i dr. 1960; Marchessault 1962; Åkerholm i dr. 2004). Intenziteti pikova su visoki i oštri.

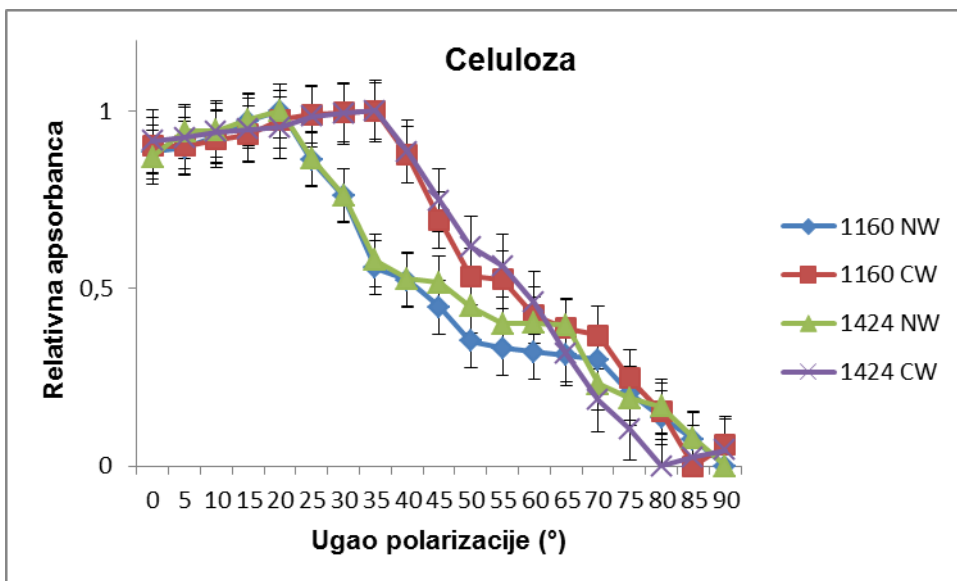
Za ksilan, uočen je signal koji potiče od vibracije na 1734 cm<sup>-1</sup> (Liang i dr. 1960; Marchessault 1962; Åkerholm i Salmén 2001). Uočene su takođe trake na 1460 cm<sup>-1</sup> i 1240

$\text{cm}^{-1}$  (Liang i dr. 1960; Marchessault 1962). Sve ove ksilanske grupe su orijentisane normalno u odnosu na molekularnu osu. Zbog toga, negativne vibracije ksilana znače da je ksilan orijentisan paralelno u odnosu na uzdužnu osu ćelijskog zida.

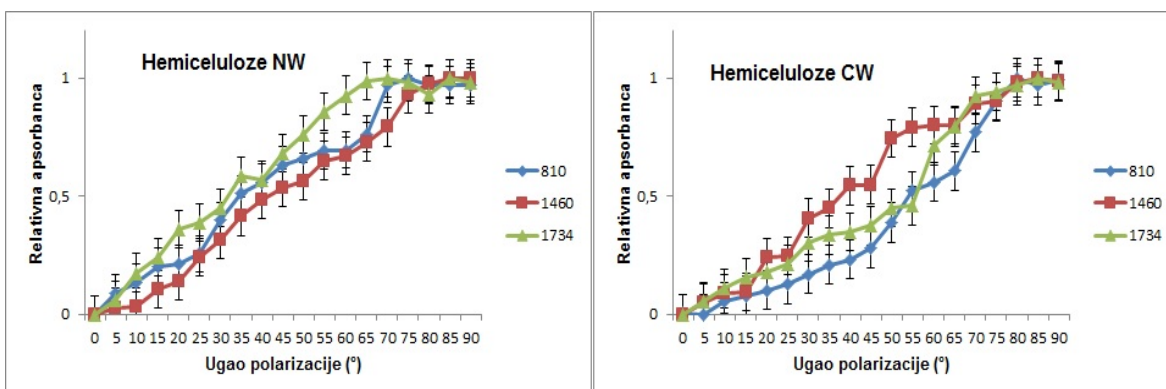
Apsorpcione trake koje se povezuju sa glukomananom uočene su na  $810 \text{ cm}^{-1}$  (vodonik u ekvatorijalnoj ravni na C2 atomu) (Liang i dr. 1960; Marchessault 1962; Åkerholm i Salmén 2001). Ova grupa je orijentisana ortogonalno u odnosu na glavni lanac glukomanana, pa se tako može zaključiti da je glukomanan takođe orijentisan paralelno u odnosu na uzdužnu osu ćelijskog zida.

Dve karakteristične vibracije su analizirane za lignin. Vibracija lignina na  $1505 \text{ cm}^{-1}$  (Atalla i Agarwal 1985, Faix 1991) pokazuje pozitivnu orijentaciju strukture lignina kod oba uzorka. Vibracija lignina na  $1600 \text{ cm}^{-1}$  (Atalla i Agarwal 1985, Faix 1991) takođe pokazuje pozitivnu orijentaciju ligninske strukture kod oba uzorka. Pošto su ove vibracije paralelne u aromatičnoj prstenastoj strukturi, može se zaključiti da je orijentacija lignina paralelna uzdužnoj osi ćelijskog zida.

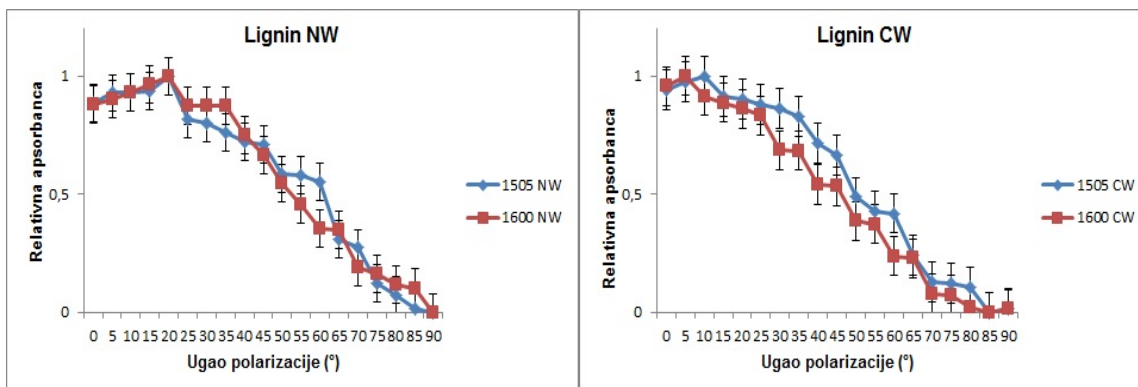
Slike 24, 25 i 26 predstavljaju zavisnost relativne apsorbance različitih pikova, u zavisnosti od polarizacionog ugla u fragmentima ćelijskih zidova stabla Pančićeve omorike. Za svaki polarizacioni ugao, izračunata je srednja vrednost apsorbance iz tri originalne vrednosti za izabrane tačke.



Slika 24. Grafik zavisnosti relativne absorbance karakterističnih IC apsorpcionih traka celuloze od polarizacionog ugla za normalno i kompresiono drvo Pančičeve omorike posle godinu dana od savijanja (okt 2010): (Plavi romb, crveni kvadrat) C-O-C istezanje na  $1160\text{ cm}^{-1}$ , (zeleni trougao, ljubičasti x) C-OH savijanje na  $1424\text{ cm}^{-1}$



Slika 25. Grafik zavisnosti relativne absorbance karakterističnih IC apsorpcionih traka hemiceluloze (ksilan i glukomanan) od polarizacionog ugla za normalno (levo) i kompresiono (desno) drvo Pančičeve omorike posle godinu dana od savijanja (okt 2010): Ksilan: (crveni kvadrat)  $\text{CH}_2$  savijanje na  $1460\text{ cm}^{-1}$ , (zeleni trougao) C=O istezanje na  $1734\text{ cm}^{-1}$ ; glukomanan: (plavi romb) H vibracija na  $810\text{ cm}^{-1}$



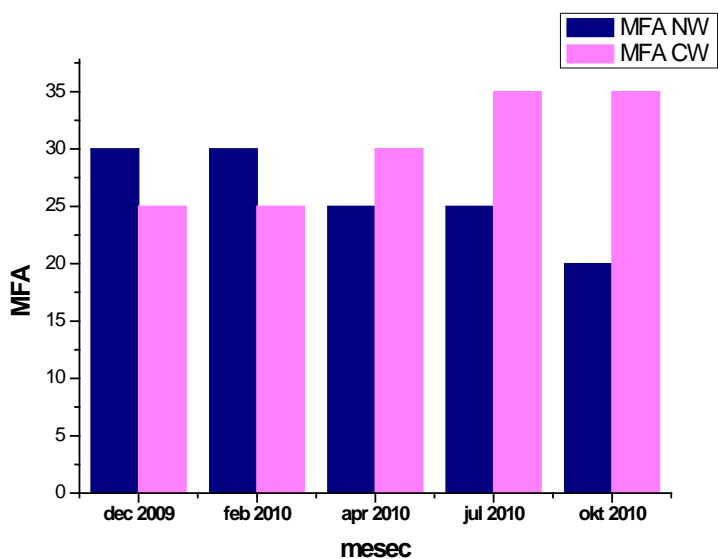
Slika 26. Grafik zavisnosti relativne absorbance karakterističnih IC apsorpcionih traka lignina od polarizacionog ugla za normalno (levo) i kompresiono (desno) drvo Pančičeve omorike posle godinu dana od savijanja (okt 2010): (plavi romb) C=C aromatična vibracija na  $1508\text{ cm}^{-1}$ ; (crveni kvadrat) C=C aromatična vibracija plus C=O strech na  $1604\text{ cm}^{-1}$

Ono što je očigledno sa Slike 24 jeste da je mikrofibrilarni ugao (MFA) za normalno juvenilno drvo između  $15$  i  $20^\circ$ , dok je mikrofibrilarni ugao za kompresiono drvo između  $30$  i  $35^\circ$ . Na Slici 27 je prikazana promena MFA u toku godinu dana za normalno i kompresiono juvenilno drvo Pančičeve omorike. Može se primetiti da je MFA kod kompresionog drveta koje je uzorkovano u decembru 2009 i februaru 2010 iznosi oko  $25^\circ$ , u aprilu i julu 2010 iznosi oko  $30^\circ$ , a u oktobru 2010  $35^\circ$ . Za normalno drvo slučaj je drugačiji, MFA kod drveta koje je uzrokovano u decembru 2009 i februaru 2010 iznosi oko  $30^\circ$ , u aprilu i julu 2010 iznosi oko  $25^\circ$ , a u oktobru 2010  $20^\circ$ . Može se zaključiti da tokom vremena, sa starenjem, dolazi do smanjenja MFA kod normalnog juvenilnog drveta, dok se MFA kod kompresionog drveta povećava. Savić i dr. su pokazali takođe razliku u orijentaciji celuloznih vlakana kod normalnog i kompresionog drveta Pančičeve omorike primenom tehnike DP-LSM. Suprotno tome, Olsson i dr. su pokazali da se kod breze MFA ugao smanjuje kod tenzionog drveta, tj dolazi do veće uređenosti celuloznih vlakana.

Kod hemiceluloza (glukomanan i ksilan), karakteristični signali traka ( $1460$ ,  $1734$  i  $810\text{ cm}^{-1}$ ) rastu sa porastom polarizacionog ugla. Pošto su bočne grupe kod ksilana i

glukomanana orijentisane paralelno, i ksilan i glukomanan su orijentisani paralelno u odnosu na longitudinalnu osu ćelijskog zida Pančićeve omorike (Slika 25).

Kod lignina, karakteristični signali traka ( $1505$  i  $1600\text{ cm}^{-1}$ ) se smanjuju sa porastom polarizacionog ugla (Slika 26), što ukazuje da je lignin organizovan paralelno u odnosu na longitudinalnu osu ćelijskog zida Pančićeve omorike.



Slika 27. Zavisnost mikrofibrilarnog ugla normalnog i kompresionog drveta Pančićeve omorike.

### **5.3 Praćenje strukturnih razlika između pravih i krivih delova kod povijuše (*Dioscorea balcanica*) kao poređenje sa formiranjem reakcionog drveta kod drvenastih vrsta**

Kako bi otkrili moguću ulogu ćelija parenhima kod mehanizma uvijanja kod povijuše *D. balcanica*, fokusirali smo se na razlike u strukturi ćelijskog zida parenhimskih ćelija kod pravih i uvijenih internodija stabljike. Urađene su kvalitativne i kvantitativne hemijske analize svih internodija, kao i mikroskopske analize (FDLD mikroskopija i FTIR spektroskopija) ćelijskih zidova parenhima na poprečnim presecima stabljike. Pošto nije bilo moguće izolovati samo parenhimsko tkivo zbog malog prečnika stabljike *D. balcanica*, hemijske analize ukupnog tkiva stabljike su urađene, a one su mogle da naslute karakteristike pojedinačnih tkiva. Ipak, pošto je fleksibilnost kod lijana postignuta između ostalog zbog prisustva velike količine parenhima (Carlquist 1981), udeo tkiva parenhima u ukupnoj svežoj ili suvoj masi nije zanemarljiva. Suva masa ćelijskog zida svih internodija (Tabela 1) ukazuje da adaptacija na mehaničku silu kod uvijenih internodija lijana *D. balcanica* ne uključuje promene u količini materijala ćelijskog zida, pa samim tim dolazi do promena u strukturi ćelijskog zida.

Ćelijski zidovi želatinoznih vlakana, koja su karakteristična za sklerenhimske ćelije, a i dobro poznate komponente tenzionog drveta, su odgovorni za uvijanje stabljika povijuša (Bowling i Vaughn 2009). U uvijenim stabljikama prisustvo želatinoznih vlakana se povezuje sa sposobnošću stabljike da se uvija oko oslonca. Želatinozna vlakna su posebno prisutna u delovima koji su u direktnom kontaktu sa osloncem (Meloche i dr. 2007), a nisu prisutna ili su retka u delovima stabljika koji se ne uvijaju (Bowling i Vaughn 2009). Kod tenzionog drveta unutrašnji želatinozni sloj ćelijskog zida se sastoji ili samo od celuloze, bez lignina, ili kasnije bude lignifikovan kod nekih (Roussel i Clair 2015; Alméras i Clair 2016). Kod *Simarouba amara* (vrsta čije tenziono drvo ima lignifikovan želatinozni sloj), optičkim mikroskopom je gotovo neprimetna razlika između tenzionog i normalnog drveta, osim što je jasno vidljiva razlika u orijentaciji celuloznih mikrofibrila koji su kod tenzionog

drveta gotovo paralelni sa osom vlakna. (Ruelle i dr. 2007; Roussel i Clair 2015). U odnosu na to, ovde su prikazani rezultati svetlosne (Slika 28) i SEM (Slika 29) mikroskopije koji pokazuju da su razlike između sklerenhimskih ćelija na tenzionoj i opozitnoj strani uvijenih internodija *D. balcanica* vidljive samo primenom SEM mikroskopije i ukazuju na to da želatinozni fibrili stabljike *D. balcanica* imaju lignifikovan želatinozni sloj. Takođe, u ćelijskim zidovima drugih tkiva se dešavaju strukturne promene koje se odnose na uvijanje. Köhler i dr. (2000) su predložili da do porasta u stabilnosti tokom razvoja dve uvijajuće *Aristolochia* vrste, dolazi zbog komplementarnih efekata: povećanja ukupne količine materijala ćelijskog zida (zadebljanja ćelijskog zida u ksilemu), promene u celuloznom mikrofibrilarnom uglu/ rasporedu, i lignifikacija. Ipak, strukturne promene u ćelijskom zidu parenhima do kojih dolazi usled uvijanja stabljike kod povijuše su manje poznate. Ćelije parenhima se razlikuju dosta i po morfologiji i po metabolizmu (Pruyn 2007).

Sastav ćelijskih zidova biljaka razlikuje se značajno od jednog do drugog tipa ćelije. Ćelijski zid je uglavnom izgrađen od celuloznih mikrofibrila koji su ugrađeni u matriks koji čine hemiceluloze, pektini, lignin i proteini. Orijehtacija celuloznih mikrofibrila u ćelijskom zidu diktira širok spektar osobina pojedinačnih ćelija, tkiva i organa, ne samo oblik i veličinu ćelije, već i mehaničke osobine, kao i specifična kretanja (Burgert i Fratzl 2009). Biljke mogu da kontrolišu orijentaciju celuloznih vlakana sa velikom preciznošću tokom nagomilavanja u ćelijskom zidu, stvarajući potrebnu uređenost ćelijskog zida. Istraživanja orijentacije celuloznih mikrofibrila u ćelijskom zidu su uglavnom fokusirana na određivanje mikrofibrilarnog ugla, i uglavnom u vlaknima i traheidama (Barnett i Bonham 2004). SEM mikrografije (Slika 29) pokazuju razliku u orijentaciji celuloznih mikrofibrila u sekundarnom ćelijskom zidu parenhimskih ćelija kod pravih (prve) i uvrnutih (pete) internodija *D. balcanica*. Ipak, u ovom delu fokus je na utvrđivanju uređenosti celuloznih mikrofibrila u X-Y ravni u ćelijskim zidovima parenhima.



### 5.3.1 Hemijska analiza

Hemijske analize za celu stabljiku *D. balcanica* nisu pokazale značajnu razliku između internodija u sadržaju lignina ili ukupnom sadržaju fenola (Tabela 1). Ovo je bilo i očekivano, po Mellerowicz i Gorshkova (2011), kao rezultat analiza ukupnog tkiva. Prema ukupnom sadržaju fenola mogu se utvrditi samo određeni trendovi: ukupan sadržaj fenola je veći u uvijenoj petoj internodiji u poređenju sa nižim (1.-4.) internodijama.

Tabela 1. Sadržaj lignina i fenola vezanih za ćelijski zid u uzorcima stabljike *D. balcanica* (od 1. do 5. internodije);

		1. internodija	2. internodija	3. internodija	4. internodija	5. internodija
Ćelijski zid	mgCW DW/gD W	0,72±0,01a	0,56±0,07a	0,52±0,07a	0,51±0,04a	0,52±0,11a
	µgCA/mg CW	29,39±1,21 a	32,50±1,44 a	30,34±1,19 a	27,23±2,42 a	28,20±1,46 a
Lignin	µgCA/mg DW	21,30±0,80 a	19,36±3,02 a	16,91±2,94 a	13,60±0,96 a	14,82±3,79 a
	mgFAeq /g CW	4,4±0,05a	4,5±0,08a	3,9±0,001a	3,7±0,009a	6,1±0,15a
TPC	mgCAeq u/g DW	3,2±0,03b	2,0±0,03a	2,0±0,03a	1,9±0,05a	2,8±0,01ab

TPC – ukupan sadržaj fenola vezanih za ćelijski zid, CW – ćelijski zid, DW - uzorak suve mase, CA – koniferil alkohol, FA – ferulična kiselina

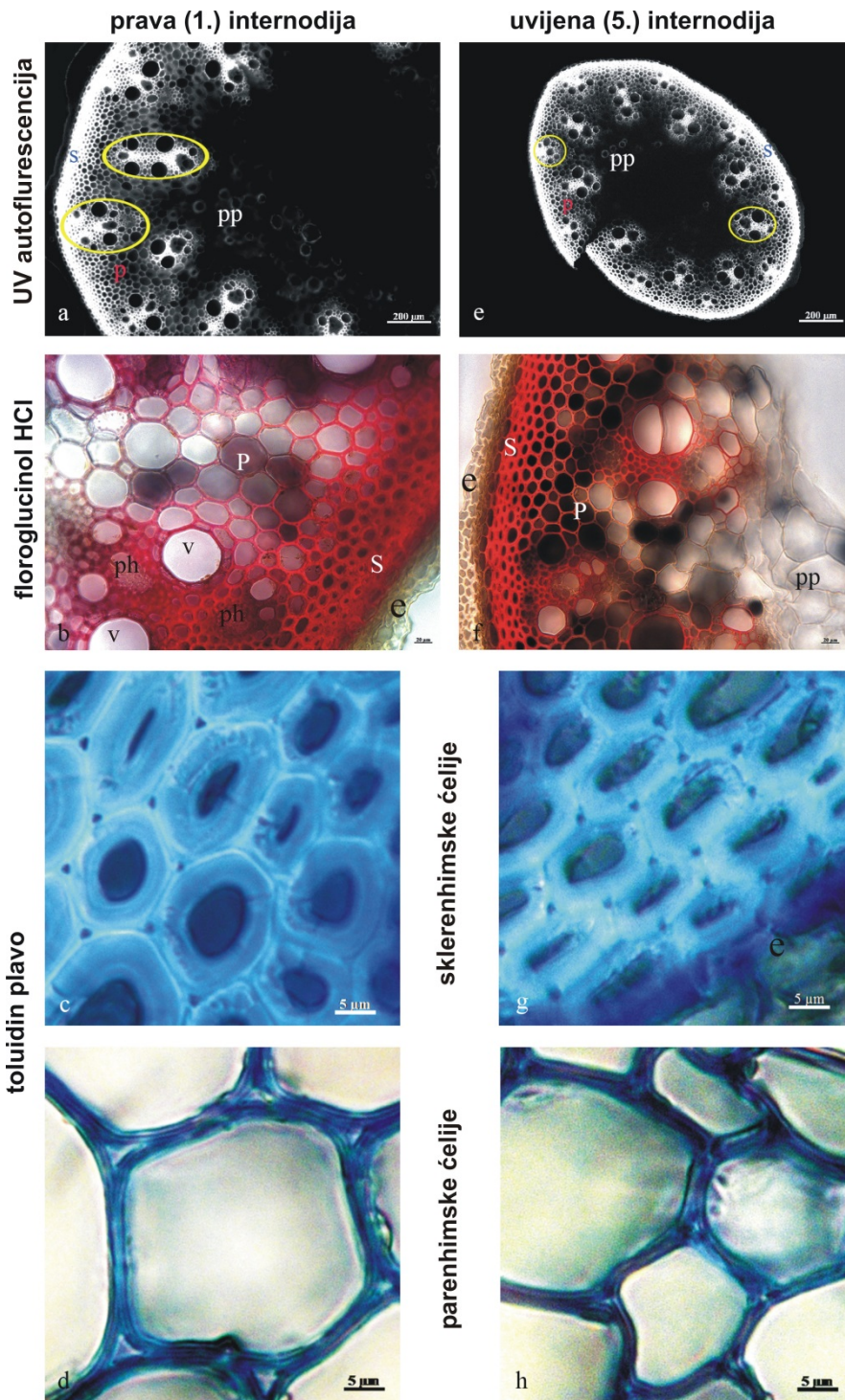
Suva masa ćelijskog zida je znatno veća u prvoj (uvek prava) internodiji u odnosu na gornje internodije (2.- 5.) (Tab 1). Takođe, prečnik bazalnih internodija je primetno veći u odnosu na više internodije.

### 5.3.2 Anatomska i histohemijska analiza stabljike *D. balcanica*

Slika 28 prikazuje morfološke i anatomske karakteristike pravih (Slika 28a, 29b) i uvijenih internodija (Slika 28e, 28f) stabljike *D. balcanica*. Postoje jasne razlike u obimu stabljika prve (bazalne, prave) i pete (uvijene) internodije. Mikroskopska analiza otkriva još dve glavne anatomske razlike: 1) sklerenhimski prsten sklerenhimskih ćelija je primetno deblji u prvoj nego u petoj internodiji; 2) i spoljašnji i unutrašnji prsten provodnih snopića, kao i parenhimskih ćelija su veći u prvoj internodiji u odnosu na petu internodiju (Slika 28a, e,f).

### 5.3.3 Histohemijske i ultrastrukturne karakteristike ćelijskih zidova sklerenhima (identifikovanje prisutnosti želatinoznih vlakana u uvijenim internodijama)

Sklerenhimske ćelije duž celog sklerenhimskog prstena na poprečnim preseccima stabljika i uvijenih i pravih internodija su dale negativnu reakciju za prisustvo želatinoznih fibrila vlakna, tj. želatinozni fibrili sa jasno izdvojenim želatinoznim slojem u uvijenim internodijama u oblasti kontakta sa podlogom (tenziona strana stabljike) nisu vidljivi svetlosnom mikroskopijom (Slika 28a, e). Ceo sklerenhimski prsten i kod uvijene i kod prave internodije se boji svetlo plavo sa toluidin plavim O (Slika 28c, d, g, h), crvenonaranđasto sa floroglucinolom (Slika 28b, 28f), i pokazuje visoku UV autofluorescenciju (Slika 28a, 28e) kao rezultat velike količine lignina, naročito u srednjoj lameli i primarnom ćelijskom zidu. Razlike u strukturi sekundarnih ćelijskih zidova sklerenhimskih ćelija u uvijenim internodijama između tenziona i opozitne strane se mogu uočiti pomoću SEM (Slika 29a, d, g). Ćelijski zidovi sklerenhimskih ćelija na tenziona strani uvrnutih internodija su glatki na poprečnim preseccima (Slika 29g), što ukazuje da unutrašnji omotač ćelijskog zida sadrži mikrofibrile koji su uređeni gotovo paralelno u odnosu na osu vlakna (što je tipično za G-sloj). Suprotno tome, ćelijski zidovi sklerenhimskih ćelija na opozitnoj strani uvrnutih internodija nisu glatki na poprečnim preseccima (Slika 29d), što ukazuje da je mikrofibrilarni ugao veoma velik u unutrašnjem sloju ćelijskih zidova, a što je još prisutnije u pravim (prvim) internodijama (Slika 29a).



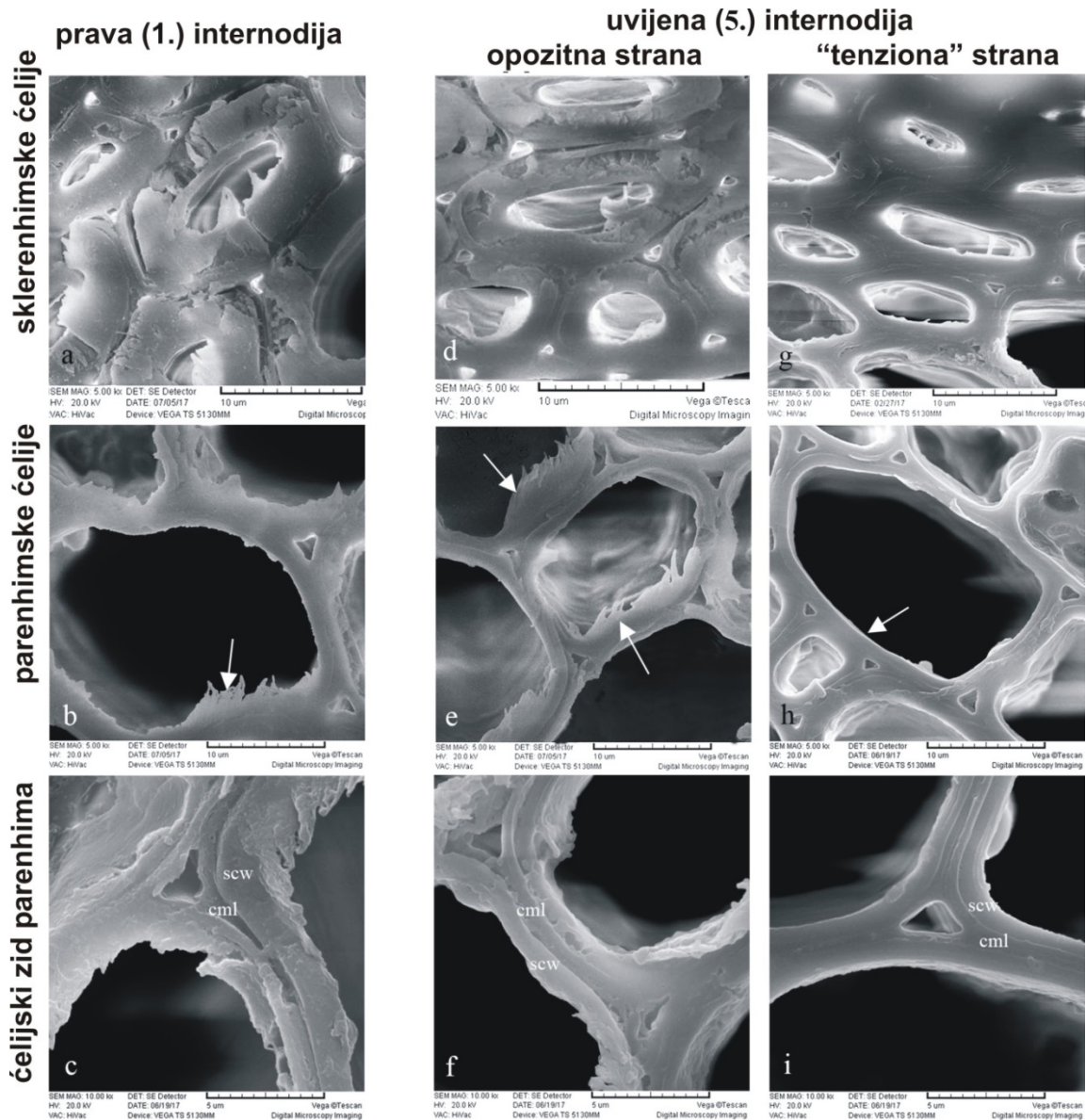
Slika 28. Poprečni preseći stabljike *D. balcanica*: (a-d) prave (1.) internodije i (e-h) uvijenih (5.) internodija.

UV autofluorescencija (a,e), intenzitet autoflorescencije odgovara sadržaju lignina; Floroglucinol bojenje (b,f), *crveno-narandžasta* obojenost ukazuje na prisutnost lignina; u obe prave (a,b) i uvijene (e,f) internodije u sklerenhimskim ćelijama je prisutan visok sadržaj lignina; parenhimske ćelije koje su locirane između provodnih snopića pokazuju lignifikovane ćelijske zidove, suprotno parenhimskim ćelijama u srži i floemu. Toluidin plavo O bojenje (c, g, d, h)- obojenost ćelijskog zida zavisi od sadržaja lignina/fenola (zeleno-plava ka tamno plavoj).

*žute elipse* - provodni snopići, *e* - epidermis, *s* – sklerenhimske ćelije, *p* – parenhimske ćelije, *ph* - floem, *v* – traheja.

#### *5.3.4 Histoheimijske i ultrastrukturne karakteristike ćelijskih zidova parenhima koje se odnose na uvijanje stabljike*

Parenhimske ćelije se boje različito toluidin plavim O u zavisnosti od sadržaja lignina (Slika 28c, d, g, h). Parenhimske ćelije koje okružuju provodne snopiće, imaju lignifikovane ćelijske zidove i boje se tamno plavo. Bojenje toluidin plavim O, floroglucinolom, kao i UV mikroskopija parenhimskih ćelija pokazuju: slojevitou strukturu ćelijskog zida, ali i nepostojanje (bar ne vidljivo) razlike između prave i uvijene internodije. Na SEM mikrografijama vidljive su razlike u orijentaciji celuloznih mikrofibrila u sekundarnim ćelijskim zidovima parenhimskih ćelija na tenzionoj i opozitnoj strani uvijene stabljike. Ćelijski zidovi parenhimskih ćelija tenzione strane uvijenih internodija su glatki na poprečnim presecima (Slika 29h, i), u poređenju sa ćelijskim zidovima parenhimskih ćelija na opozitnoj strani (Slika 29e, f), što je još izraženije kod parenhimskih ćelija pravih (prvih) internodija (Slika 29b, c).



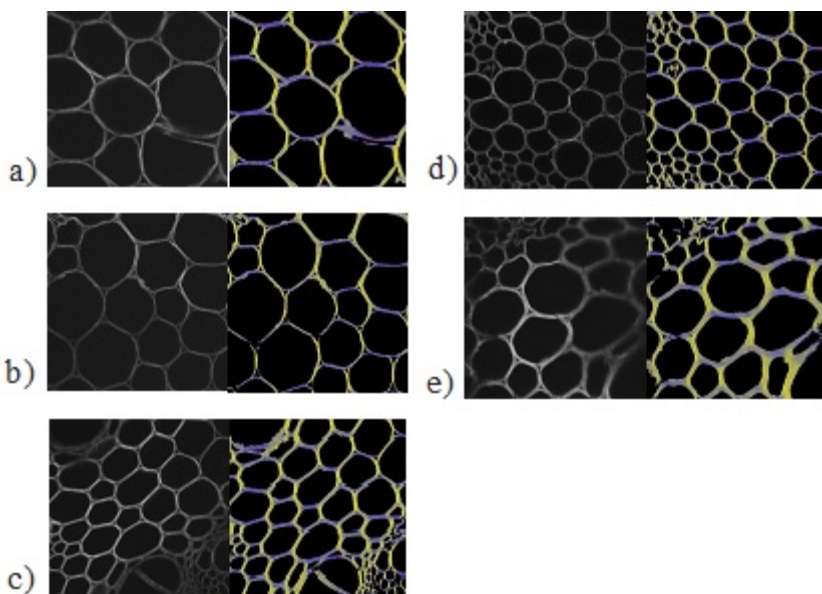
Slika 29. SEM mikrografija poprečnih preseka stabljike *D. balcanica* pravih (a-c) i uvijenih (d-i) internodija. Na tenziona strani uvijenih internodija, ćelijski zidovi i sklarenhima (g) i parenhima (h, i) ćelije su glatke ( $\uparrow$ ) na poprečnim presecima, što ukazuje da su celulozni mikrofibrili orijentisani gotovo paralelno sa osom stabljike. Suprotno tome, kod pravih internodija i na opozitnoj strani uvijenih internodija sklarenhimske ćelije (a, d) i parenhimske ćelije (b, c, e, f) izgledaju rećkavo ( $\uparrow$ ), što ukazuje da celulozni mikrofibrili



imaju veoma veliki mikrofibrilarni ugao. ↑ - orijentacija celuloznih mikrofibrila, *cml* – srednja lamela, *scw*- sekundarni ćelijski zid.

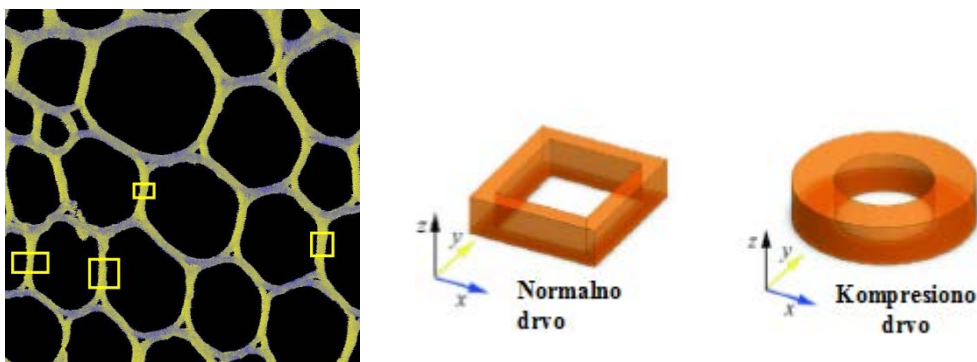
### 5.3.5 Strukturna organizacija ćelijskog zida parenhima ispitivana pomoću DPLSM

Ispitivana je uređenost celuloznih vlakana u ćelijskim zidovima parenhima pravih i uvijenih internodija *D. balcanica*. FDLD dobijen DP-LSM snimanjem je odgovarajuća alatka za mapiranje anizotropije celuloze (koja je markirana Kongo crvenim) u ćelijskom zidu, a koja određuje linearni dihroizam ćelijskog zida (Steinbach i dr. 2008). Merena je fluorescencija koja potiče od celuloznih fibrila ćelijskog zida parenhima na poprečnim presecima koji su obojeni Kongo crvenim (Slika 30).



Slika 30. Konfokalne fluorescentne mikrofografije (levo) i mikrofografije fluorescencijom detektovnog linearnog dihroizma (FDLD) (desno), tankih preseka *D. balcanica*: a) prva internodija, b) druga internodija, c) treća internodija d) četvrta internodija, e) peta internodija. Pobuda je bila na 488 nm.

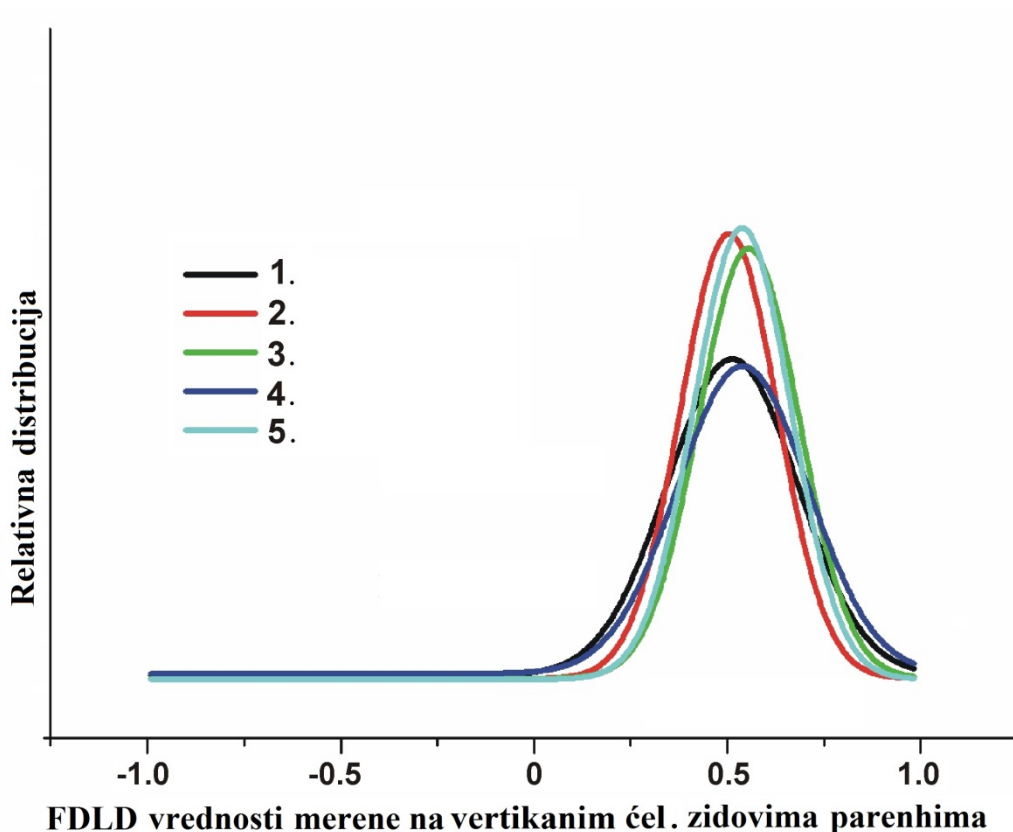
Na Slici 31 je prikazan primer DP-LSM slike heksagonalnih ćelija parenhima. Označeni pravougaonici predstavljaju analizirane delove ćelijskog zida. Različite boje predstavljaju različitu orijentaciju celuloznih vlakana u X-Y ravni poprečnog preseka. Plava boja predstavlja dipole (celulozna vlakna) koji najviše apsorbuju svetlost paralelno sa X-osom, žuta predstavlja dipole (celulozna vlakna) koji su paralelni sa Y-osom; a kao posledica toga, siva boja predstavlja vlakna koja su orijentisana pod uglom od  $45^\circ$  u odnosu na X-osu ili neorganizovane regije. Zbog toga je važno da se izaberu ćelijski zidovi koji su orijentisani na isti način. U našem slučaju su izabrani ćelijski zidovi parenhima koji su paralelno orijentisani u odnosu na Y-osu.



Slika 31. Primer DP-LSM slike (3. internodija); žuti pravougaonici označavaju mesta koja su korišćena za FDLD analizu; veličina slike je  $64 \times 64 \mu\text{m}$ .

Na Slici 32 je predstavljena FDLD distribucija u ćelijskim zidovima parenhima od prve do pete internodije (dobijena primenom programa ImageJ na DP slike, Slika 32). Konfokalne slike pokazuju da nema razlike u obliku i debljini ćelijskog zida parenhima od prve do pete internodije. Takođe, dobijene FDLD vrednosti ne pokazuju značajne razlike kod ćelijskih zidova parenhima od prve do pete internodije *D. balcanica*. To upućuje na zaključak, da u ćelijskim zidovima parenhima *D. balcanica* ne postoje razlike u organizaciji celuloznih vlakana od prve do pete internodije, i što je još bitnije, između pravih i uvijenih internodija. Suprotno je pokazano za ćelijske zidove traheja Pančičeve omorike za

kompresiono drvo- smanjenje uređenosti celulozih vlakana (značajno smanjenje FDL D vrednosti) u poređenju sa normalnim drvetom (Savić i dr. 2016), a praćeno je i promenom oblika zida traheje iz kvadratnog u okrugli. Oblik parenhimskih ćelija kod *D. balcanica* ostaje isti bez obzira na uvijanje stabljike, što je najverovatnije moguće jer orijentacija celulozних fibrila ostaje ista (Slika 32), a uprkos tome što je količina celuloze manja u parenhimskim ćelijama uvijenih (7.) internodija što je pokazano FTIR analizom (Slika 33).

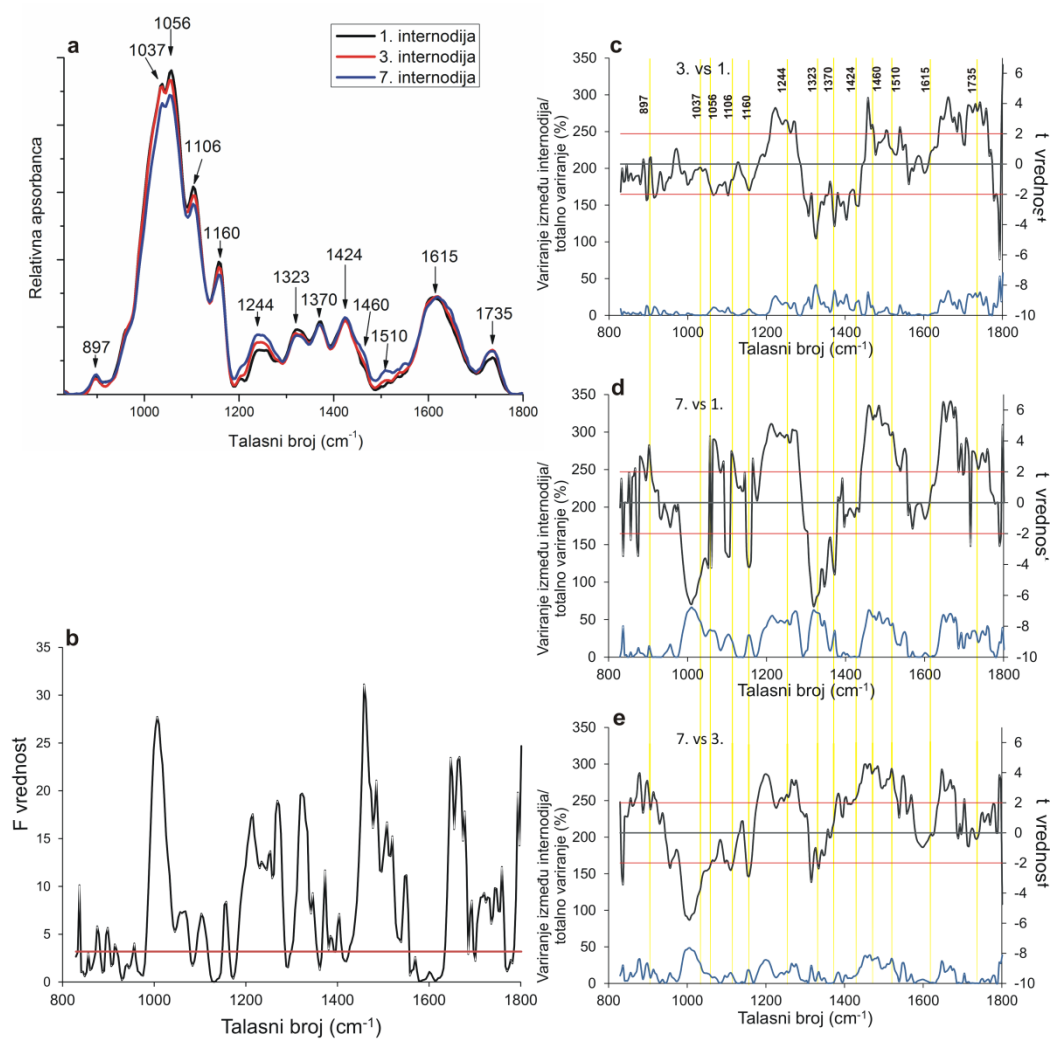


Slika 32. Gausijanove krive FDL D raspodele za ćelijski zid parenhima *D. balcanica* od 1. do 5. internodije [FDLD vrednosti od 1. do 5. internodije: 0.51 ( $\sigma$ : 0.17), 0.50 ( $\sigma$ : 0.13), 0.56 ( $\sigma$ : 0.13), 0.54 ( $\sigma$ : 0.17), 0.54 ( $\sigma$ : 0.13)]; broj analiziranih površina ćelijskog (oznaćeni žutim pravougaonikom na slici) je oko 20 po internodiji (od 1. do 5.).



### 5.3.6 Strukturna organizacija ćelijskog zida parenhima, dobijena pomoću FTIR mikrospektroskopije

Na Slici 33a su prikazani preklapljeni FTIR spektri prve, pete i sedme internodije u oblasti od 800  $\text{cm}^{-1}$ - 1800  $\text{cm}^{-1}$ .



Slika 33. FTIR spektri ćelijskih zidova parenhima *D. balcanica*: **a)** sirovi spektri- za svaku internodiju (prvu, treću i sedmu) je snimljeno po dvadeset spektara u transmissionom modu pri rezoluciji  $4\text{ cm}^{-1}$ , normalizovanih i sa korigovanom baznom linijom; **b)** ANOVA (F test) za FTIR spektre prve, treće i sedme internodije; **c-e)** crna linija i desna Y-osa: *t* testovi za 3. vs 1., 7. vs 3. i 7. vs 1. internodije; plava linija i leve Y ose: stepen (izražen u procentima) varijacije FTIR signala između parova internodija, pokazani *t* testom, utvrđeni kao odnos između zbira kvadrata varijacija između internodija i sume kvadrata ukupne varijacije.

Traka na  $897\text{ cm}^{-1}$  je karakteristična za anomerne  $\beta$ -vezane molekule glukoze (Kacurakova i dr. 2000). Oblast od  $900\text{ cm}^{-1}$ -  $1100\text{ cm}^{-1}$  je specifična za polisaharide (ksiloglukane). Ovde su takođe prisutne četiri trake koje su karakteristične za celulozu ( $1160\text{ cm}^{-1}$ ,  $1317\text{ cm}^{-1}$ ,  $1370\text{ cm}^{-1}$  i  $1424\text{ cm}^{-1}$ ) (Liang i dr. 1960, Marchessault 1962, Åkerholm i dr. 2004). Trake na  $1244\text{ cm}^{-1}$ ,  $1460\text{ cm}^{-1}$  i  $1735\text{ cm}^{-1}$  su karakteristične za ksilan (Liang i dr. 1960, Marchessault 1962, Åkerholm i Salmén 2001), dok su trake na  $1510\text{ cm}^{-1}$  i  $1615\text{ cm}^{-1}$  karakteristične za lignin (Atalla i Agarwal 1985, Faix 1991). Urađeni su *t* testovi za treću i prvu, sedmu i prvu, kao i sedmu i treću internodiju (Slika 33c, d, e).

Primenom *t*-testa za treću i prvu internodiju primećuje se da se spektri značajno razlikuju u sledećim oblastima: od  $1764$  do  $1636\text{ cm}^{-1}$ , od  $1453$  do  $1474\text{ cm}^{-1}$ , od  $1294$  do  $1437\text{ cm}^{-1}$ , od  $1209$  do  $1275\text{ cm}^{-1}$ . Apsorbance na  $1735\text{ cm}^{-1}$ ,  $1460\text{ cm}^{-1}$  i  $1244\text{ cm}^{-1}$  su veće kod treće internodije, dok su apsorbance na  $1327\text{ cm}^{-1}$  i  $1424\text{ cm}^{-1}$  manje. *t* test za sedmu i prvu internodiju ukazuje da se spektri značajno razlikuju u sledećim oblastima: od  $1631$  do  $1764\text{ cm}^{-1}$ , od  $1439$  do  $1554\text{ cm}^{-1}$ , od  $1303$  do  $1380\text{ cm}^{-1}$ , od  $1186$  do  $1288\text{ cm}^{-1}$ , od  $982$  do  $1057\text{ cm}^{-1}$ . I ovde, apsorbance na  $1735\text{ cm}^{-1}$ ,  $1460\text{ cm}^{-1}$ ,  $1244\text{ cm}^{-1}$  i  $1510\text{ cm}^{-1}$  su veće kod sedme internodije, dok su apsorbance na  $1160\text{ cm}^{-1}$ ,  $1327\text{ cm}^{-1}$  i  $1370\text{ cm}^{-1}$  manje. Takođe, apsorbance na  $1037\text{ cm}^{-1}$  i  $1056\text{ cm}^{-1}$  su manje kod sedme internodije. Ovakvi rezultati upućuju na to da su celuloza i ksiloglukan više zastupljeni u donjim (bazalnim) internodijama, dok je ksilan zastupljen više u gornjim delovima.

Značajnost razlike između FTIR spektara pravih (1. i 3.) internodija i uvijene (7.) internodije je dobijena jednofaktorskim F-testom (ANOVA) i predstavljeno je na Slici 33b.

Kod parenhimskih ćelija *D. balcanica* oblik ostraje isti uprkos uvijanju stabljike, što najverovatnije omogućava nepromenjena uređenost celuloznih vlakana (Slike 31, 32), uprkos manjoj količini celuloze u uvijenim internodijama što je prikazano FTIR analizom (Slika 33). Promene u količini i distribuciji neceluloznih polisaharida (Reis i Vian 2004; Donaldson i Knox 2012), ili vezanih fenola (Bunzel i dr. 2004; Sun i dr. 2002) mogu posredovati u interakciji između čvrstih celuloznih fibrila i savitljivog matriksa. Hemiceluloze interaguju sa celulozom omogućavajući strukturnu jačinu ćelijskom zidu (Scheller i Ulvskov 2010), dok vezani fenoli mogu formirati poprečne veze između polisaharida, između polisaharida i lignina (Bunzel i dr. 2004), ili između fragmenata lignina (Sun i dr. 2002), dajući mehaničku čvrstinu čitavoj strukturi zida. Kod monokotila, najzastupljenije hemiceluloze su heteroksilani i  $\beta$ -glukani (Iwata i dr. 1998). Ksiloglukan se često opisuje kao izduženi polimer koji se vezuje za površinu celuloze, a istovremeno i povezuje celulozne mikrofibrile (Fry 1989; Hayashi 1989; Somerville i dr. 2004). To vezivanje ograničava kretanje celuloznih mikrofibrila pa tako kontroliše proširenje zida (Kim i Daniel 2012). Povezivanje između ksilana i celuloznih vlakana najverovatnije utiče na jačinu i elastičnost zidova (Cosgrove i Jarvis 2012). Ćelijski zidovi parenhima uvijene (7.) internodije imaju manje celuloze (Slika 33a), što je i praćeno manjom količinom ksiloglukana (Slika 33a), ali i većom količinom ksilana (Slika 33). Zato, strukture celuloze i hemiceluloze u ćelijskim zidovima parenhima uvijenih internodija *D. balcanica* ukazuju na ćelijski zid koji je više elastičan i jači, što daje stabljici mehaničku fleksibilnost da se uvije bez lomljenja.

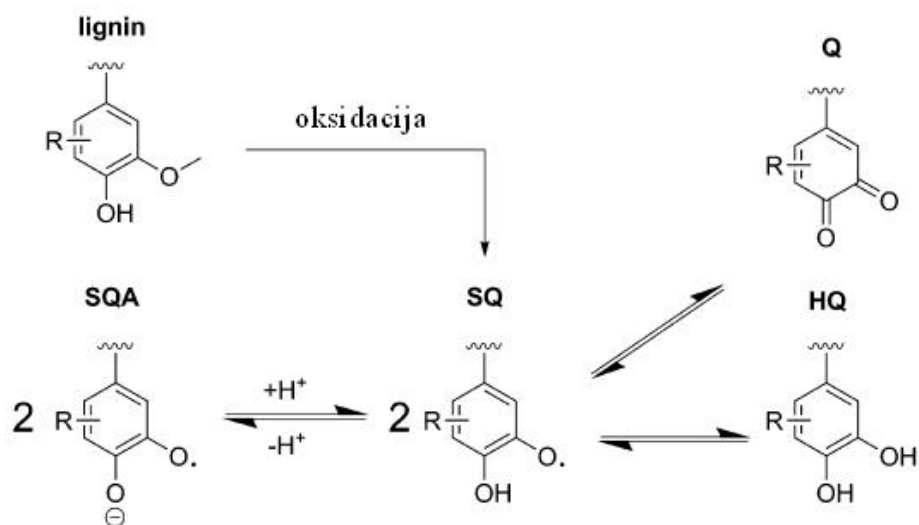
FTIR spektroskopija (Slika 33) je potvrdila veću lignifikaciju ćelijskog zida parenhima kod *D. balcanica* kod uvijenih (7.) internodija i promenjenu strukturu lignina. U ćelijskom zidu parenhima uvijene (7.) internodije dolazi do povećanja ukupne količine lignina (traka na  $1510\text{ cm}^{-1}$  – kombinovani siringil i gvajacil lignin) (Slika 33 c, d), a u isto vreme i do smanjenja količine kondenzovanog lignina ( $1323\text{-}1335\text{ cm}^{-1}$ ), kao i do pojavljivanja/porasta (u 3. i 7. internodiji) bočnog lanca monomera ligninasa nereaktivnim

C=C vezama ( $1645\text{ cm}^{-1}$ ) (Slika 33 c, d). Ove modifikacije u organizaciji lignina u ćelijskom zidu parenhima uslovljavaju zadržavanje čvrstine, uz povećanje fleksibilnosti/elastičnosti ćelijskog zida parenhima uvijene internodije.

#### **5.4 Primena EPR spektroskopije za utvrđivanje razlike u količini lignina kod reakcionog i normalnog drveta na primeru Pančićeve omorike i povijuše *Dioscorea balcanica***

Lignin sadrži značajnu količinu stabilnih organskih radikala. Rex (1960) je prvi detektovao ove radikale primenom elektronske paramagnetne rezonantne (EPR) spektroskopije i pokazao da je koncentracija lignin radikala veoma mala ( $< 10^{14}$  spin/g), da bi kasnije istraživanja nastavili Van der Kaa i dr. (1961) i Steelink i dr. (1963).

Pretpostavlja se da su radikalske vrste semihinon radikali stabilizovani u polifenolnom ligninskom matriksu (Steelink 1964, Steelink 1965, Steelink i Hansen 1966, Fitzpatrick i Steelink 1969). Do ovakvog zaključka se došlo na osnovu tri observacije. Makromolekul lignina sadrži strukturne elemente koji tokom oksidacije formiraju semihinonske vrste radikala (Slika 34). Koncentracija radikala u ligninu značajno raste u baznoj sredini, što se može objasniti reakcijom hidrohina HQ i hinona Q pri čemu nastaju semihinon radikali (SQ) i semihinon radikal anjoni SQA (Slika 34), a izotropni  $g$  faktor  $g_{iso}$  lignina je sličan  $g_{iso}$  faktorima modela semihinon radikala (Steelink 1964, Steelink 1965, Steelink i Hansen 1966, Fitzpatrick i Steelink 1969).

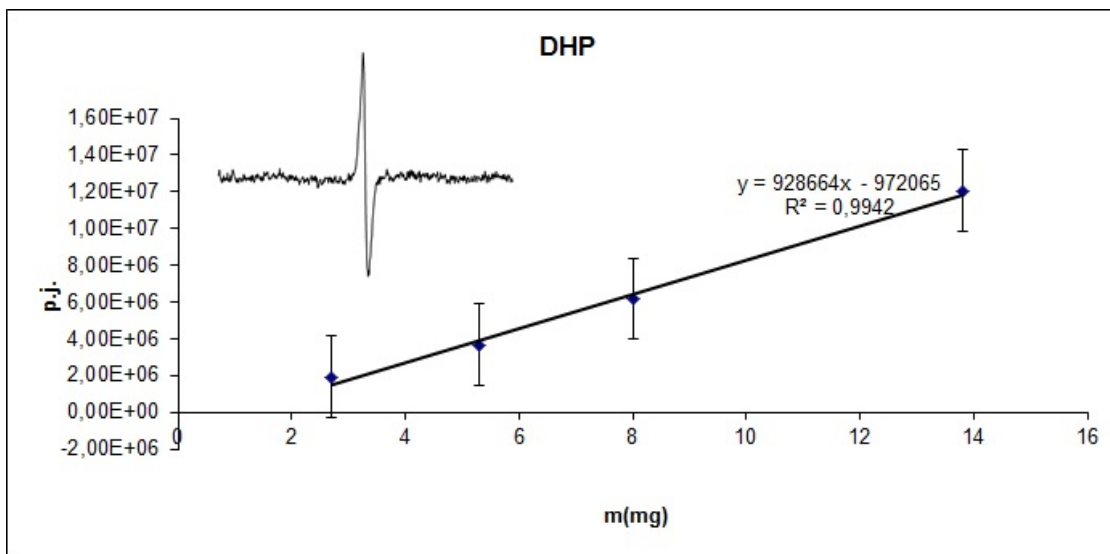


Slika 34. Subjedinice u ligninu i formiranje semihinon radikala (SQ).

SQA - semikinon anjon; HQ – hidrohinon; Q – hinon; R = OMe za siringil subjedinice, R = H za gvajacil subjedinice.

\*dokazano je da je lignin uključen u procese koji štite ćeliju od različitih stresora (Lewis i Yamamoto 1990, Moura i dr 2010)

Na Slici 35 prikazan je grafik zavisnosti površine EPR pika od mase DHP-a kako bi se utvrdilo da li uvećan broj spinova ukazuje na veću količinu lignina.

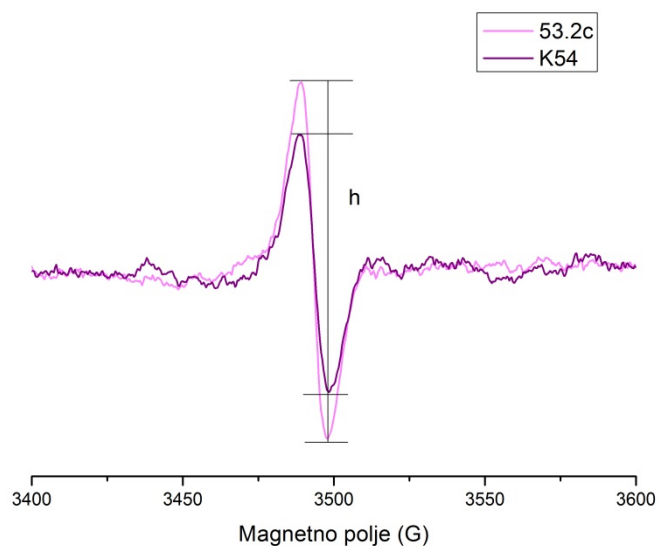


Slika 35. Grafik zavisnosti površine ispod EPR pika od mase DHP-a

Sa Slike 35 se može videti da postoji linearna zavisnost površine ispod EPR pika i mase DHP-a, što može dovesti do zaključka da povećani broj spinova lignin radikala ukazuje na veću količinu samog lignina.

Na Slici 36 su prikazani EPR spektri savijenog (kompresioni deo) i pravog stabla Pančičeve omorike. Sa grafika je određena visina, širina i površina ispod EPR pika (proporcionalana broju spinova lignin radikala), što je prikazano u Tabeli 2. Dobijeni rezultati ukazuju na to da je površina ispod EPR spektra najveća za kompresiono drvo. Kako je površina ispod EPR spektra proporcionalna broju spinova lignin radikala, može se zaključiti i da je količina lignin radikala najveća kod kompresionog drveta.

Sa Slike 36 i iz Tabele 2 se može videti da je prisustvo lignina znatno veće u kompresionom delu (sama krivina i iznad krivine) stabla nego u kontrolnom (pravom) stablu, kao i u opozitnoj strani drveta. Iako se ovde radi o juvenilnom mekom drvetu koje takođe karakteriše povećana količina lignina u odnosu na zrelo drvo, iz dobijenih rezultata se jasno može videti da postoji razlika u količini lignina između kompresionog i normalnog juvenilnog drveta.

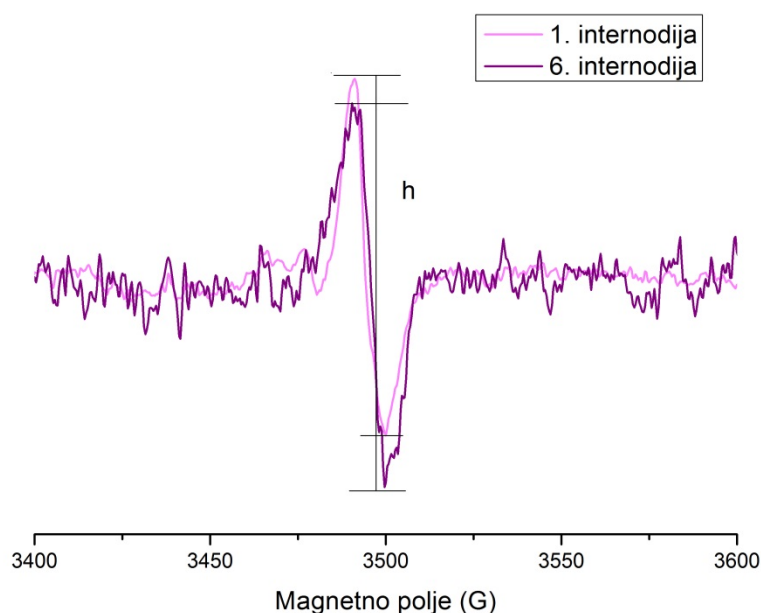


Slika 36. EPR spektri segmenata stabljike Pančičeve omorike: 53.2c kompresiono drvo krivina, K54 kontrola (pravo stablo).

Tabela 2. Analiza pikova dobijenih EPR spektroskopijom za Pančičevu omoriku (normalno, kompresiono i opozitno drvo)

Pančičeva omorika	Širina pika	Visina pika/mg	Površina pika/mg
<b>K54</b>	10.39	9759.23	542992.13
<b>53.1 C (kompresiono drvo, deo ispod krivine)</b>	8.32	17353.48	1040324.69
<b>53.2 C (kompresiono drvo, krivina)</b>	8.84	13564.02	796963.91
<b>53.3 C (kompresiono drvo, deo iznad krivine)</b>	7.69	13088.62	739554.11
<b>53.1 O (opozitno drvo, deo ispod krivine)</b>	8.43	10549.53	663581.52
<b>53.2 O (opozitno drvo, krivina)</b>	9.61	9602.68	570851.28
<b>53.3 O (opozitno drvo, deo iznad krivine)</b>	9.23	9348.35	569582.41

Na Slici 37 su prikazani EPR spektri povijuše *Dioscorea balcanica* za prvu i šestu internodiju, gde je prva internodija prava, a šesta internodija uvijena (Slika 17c). Sa grafika je određena visina, širina i površina EPR pika i date vrednosti su prikazane u Tabeli 3. Površina ispod EPR signala je veća kod uvijenih delova stabljike (peta i šesta internodija). Kako je površina ispod EPR spektra proporcionalna broju spinova lignin radikala, može se zaključiti i da je količina lignin radikala najveća u petoj i šestoj internodiji koje su uvijene, što je u skladu sa literaturom (Köhler i dr. 2000, Meloche i dr. 2007). Köhler i dr. (2000) su pokazali da u uvijajućoj *Aristolochia* vrsti dolazi do lignifikacije tokom rasta, a da u kombinaciji povećane količine lignina i želatinoznih vlakana koja su posebno prisutna u delovima koji su u direktnom kontaktu sa osloncem, dolazi do jačeg uvijanja i učvršćivanja za oslonac (Meloche i dr. 2007).



Slika 37. EPR spektri delova stabljike prve i šeste internodije *D.balcanica*



Tabela 3. Analiza pikova dobijenih EPR spektroskopijom za povijušu *D. balcanica* [od prve do šeste internodije; gde su peta i šesta internodija uvijene (Slika 17c)]

<i>D. balcanica</i>	širina	visina/mg	površina/mg
<b>1. internodija</b>	8.84	20798.13	819453.90
<b>2. internodija</b>	10.38	15643.84	924649.91
<b>3. internodija</b>	10.39	15261.51	752516.27
<b>4. internodija</b>	9.99	16577.39	913338.01
<b>5. internodija</b>	9.60	22121.03	1200927.25
<b>6. internodija</b>	8.84	33532	1262359.65

## 6. ZAKLJUČCI

Svi eksperimenti koji su rađeni u okviru ove doktorske disertacije za cilj su imali da istraže interakcije između polimera u ćelijskom zidu različitih drvenastih biljnih vrsta, sa fokusom na ispitivanju orijentacije polimera u ćelijskom zidu i u vezi toga njihove strukturne uređenosti i uređenosti zida kao celine.

Za utvrđivanje strukturnih razlika između tvrdog (listopadnog) drveta i mekog (četinar) drveta rađeni su eksperimenti na javoru (*Acer platanoides* L.) i Pančićevoj omorici (*Picea omorika* (Pančić) Purkyně). Pokazano je da su hemiceluloze (ksilan i glukomanan) u izolovanim fragmentima ćelijskog zida grana javora i Pančićeve omorike orijentisane paralelno u odnosu na celulozu, i manje ili više paralelne u odnosu na osu ćelijskog zida. Takođe, indikovano je da je lignin orijentisan paralelno u odnosu na uzdužnu osu ćelijskog zida i kod grana javora i grana Pančićeve omorike. Ipak, orijentacija lignina striktno ne prati orijentaciju ugljenih hidrata, što ukazuje da je lignin slabije vezan sa njima.

Za utvrđivanje strukturne razlike između kompresionog i normalnog drveta, ali i kako bi se videlo da li postoji veza između sporog rasta i jakog kompresionog drveta koje se javlja u odgovoru na gravitropijski stres, rađeni su eksperimenti na Pančićevim omorikama starim tri godine koje su savijane pod uglom od 90°. Rezultati su pokazali da se mikrofibrilarni ugao kod normalnog drveta smanjuje, dok se kod kompresionog drveta povećava u toku jedne godine.

Za utvrđivanje strukturnih razlika prilikom formiranja reakcionog drveta kod drvenastih vrsta, ali i utvrđivanje uloge parenhima u savijanju povijuša rađeni su eksperimenti na pravim i savijenim delovima stabla povijuše *Dioscorea balcanica*. Rezultati ukazuju da adaptacija na mehaničko uvijanje kod povijuša uključuje modifikacije u strukturi ćelijskog zida parenhima. Promene u strukturi ćelijskog zida parenhima koje se odnose na uvijanje stabljike uključuju: manju količinu celuloze (dobijeno FTIR mikrospektrometrijom) sa razlikom u orijentaciji celuloznih mikrofibrila (prikazano SEM mikroskopijom), ali ne postoji razlika u uređenosti celuloznih fibrila (dobijeno DP-LS mikroskopijom); manju količinu ksiloglukana (koji ograničava pokretanje celuloznih mikrofibrila), veću količinu ksilana (koji se vezuje sa celulozom, i utiče na jačinu i

elastičnost zidova), i veću količinu lignina sa modifikovanom organizacijom- manje kondenzovanog lignina, pojavljivanje i porast ligninskih monomernih jedinica sa neizreagovanim C=C vezama u bočnom lancu (dobijeno FTIR mikrospektrometrijom).

Promenjena struktura ćelijskog zida parenhima u uvijenim internodijama *D. balcanica*, koja dovodi do smanjene krutosti, veće čvrstoće i povećane elastičnosti, moguće nastaje zbog potrebe za živim parenhimskim ćelijama u uvijenim delovima stabljike kako zbog povećane fleksibilnosti ćelijskih zidova (kako bi se podržala sila uvijanja), tako i zbog povećane čvrstoće ćelijskog zida (kako bi se oduprla mehaničkom naponu razvijenom u uvijenim delovima stabljike).

EPR spektroskopija je korišćena za utvrđivanje razlike u količini lignina preko ligninskog radikala kod reakcionog i normalnog drveta na primeru Pančičeve omorike i povijuše *D. balcanica*. Prisustvo lignina znatno je veće u kompresionom delu (sama krivina i iznad krivine) stabla Pančičeve omorike nego u kontrolnom (pravom) stablu, kao i u opozitnoj strani drveta. Količina lignina najveća je u petoj i šestoj internodiji stabljike *D. balcanica* koje su uvijene, jer sa povećanom lignifikacijom dolazi i do jačeg uvijanja i učvršćivanja oko oslonca.

## 7. LITERATURA

Aguayo MG, Quintupill L, Castillo R, Baeza J, Freer J, Mendoc, a RT (2010) Determination of differences in anatomical and chemical characteristics of tension and opposite wood of 8-year old *Eucalyptus globulus*. *Maderas Ciencia y Tecnol* 12:241–251

Alméras T, Clair B (2016) Critical review on the mechanisms of maturation stress generation in trees. *J. R. Soc. Interface* 13: 20160550. <http://dx.doi.org/10.1098/rsif.2016.0550>

Altaner C, Hapca AI, Knox JP, Jarvis MC (2007) Detection of  $\beta$ -1-4-galactan in compression wood of Sitka spruce [*Picea sitchensis* (Bong.) *Carrière*] by immunofluorescence. *Holzforschung* 61:311–316.

Akbulut T, Ayırlmis N (2006) Effect of compression wood on surface roughness and surface absorption of medium density fiberboard. *Silva Fennica* 40(1): 161–167.

Åkerholm M, Salmén L (2001) Interactions between wood polymers studied by dynamic FT-IR spectroscopy. *Polymer* 42: 963-969.

Åkerholm M, Hinterstoisser B, Salmén L (2004) Characterization of the crystalline structure of cellulose using static and dynamic FT-IR spectroscopy. *Carbohydr. Res.* 339: 569-578

Andersson S, Serimaa R, Torkkeli M, Paakkari T, Saranpa'a' P, Pesonen E (2000) Microfibril angle of Norway spruce (*Picea abies* Karst) compression wood: comparison of measuring techniques. *J Wood Sci* 46:343–349

Prof. Dr. Ankica Antić- Jovanović, *Molekulska spektroskopija: spektrohemijski aspekt*, 2. izd., 2006.

Archer RR (1986) *Growth stresses and strains in trees*. Springer Verlag, Berlin/Heidelberg/New York.

Atalla RH, Van der Hart DL (1984) Native Cellulose: A Composite of Two Distinct Crystalline Forms. *Science* 223:283-285.

Atalla RH, Agarwal UP (1985) Raman microprobe evidence for lignin orientation in the cell walls of native woody tissue. *Science* 227: 636–638.

Atalla RH, Hackney JM, Uhlin I, Thompson NS (1993) Hemicelluloses as Structure Regulators in the Aggregation of Native Cellulose. *International Journal of Biological Macromolecules* 15:109-112.

Axelrod D (1989) Total internal reflection fluorescence microscopy *Methods Cell Biol.* 30: 245-270.

Baba K, Macpherson E, Lin C-W, Chan T-Y (2009) Crustacean Fauna of Taiwan: Squal lobsters

Bacic A, Harris PJ, Stone BA (1988) Structure and Function of Plant Cell Walls. In: *The Biochemistry of Plants* Preiss, J., Ed., Academic Press, Inc., New York 297-371.

Bačić G, Demsar F, Zolnai Z, Swartz HM (1988) Contrast enhancement in ESR imaging: Role of oxygen, *Magn. Reson. Med. Biol.* 1: 55-65.

Bamber RK (2001) A general theory for the origin of growth stresses in reaction wood: how trees stay upright. 22(3), 205-212

Ban W, Mancosky D, Lucia L (2004) Evaluation of the pulping response of juvenile and mature black spruce compression wood. *Cellulose Chem Technol* 38(1–2):79–85

Bao FC, Jiang ZH, Jiang XM, Lu XX, Luo XQ, Zhang SY (2001) Differences in wood properties between juvenile wood and mature wood in 10 species grown in China. *Wood Sci. Technol.* 35: 363-375.

Barčík S, Pivolusková E, Kotlíňová M (2005) Influence of selected factors on granulometric composition of chips in plane milling of juvenile pine wood. *OAI Vol.56 No.3*

Barnet JR, Bonham VA (2004) Cellulose microfibril angle in the cell wall of wood fibres. *Biol Rev* 79: 461–472

Bergander A, Salmén L (2002) Cell wall properties and their effects on the mechanical properties of fibers. *Journal of Material Science* 37(1): 151-156

- Bland D, Scurfield G (2009) The Chemistry of Reaction Wood Part IV. The Distribution and Nature of the Lignin in Seedlings of Hardwoods. *Holzforschung - International Journal of the Biology, Chemistry, Physics and Technology of Wood* 18(6): 161-166.
- Bold HC, Alexopoulos CJ, Delevoryas T (1987) Morphology of plants and fungi, fifth edition, Harper&Row, publishers, New York, Inc.
- Bouveng HO, Meier H (1959) Studies on a galactan from norwegian spruce compression wood (*Picea abies* Karst.). *Acta Chem. Scand.* 13: 1884-1889
- Bowling AJ, Vaughn KC (2008) Immunocytochemical characterization of tension wood: Gelatinous fibers contain more than just cellulose. *American Journal of Botany* 95: 655–663.
- Bowling AJ, Vaughn KC (2009) Gelatinous fibers are widespread in coiling tendrils and twining vines. *Am J Bot* 96: 719-727
- Bradburry S, Evennett PJ (1996) Contrast Techniques in Light Microscopy (Microscopy Handbooks) Publisher: Garland Science 1st Edition
- Brändström J (2002) *Morphology of Norway spruce tracheids with emphasis on cell wall organisation*. Diss. (sammanfattning/summary) Uppsala: Sveriges lantbruksuniv., Acta Universitatis agriculturae Sueciae. Silvestria, 1401-6230 ; 237
- Buchanan B, Gruissem W, Jones R, Eds., American Society of Plant Physiologists, Rockville 52-108.
- Bunzel M, Ralph J, Lu F, Hatfield RD, Steinhart H (2004) Lignins and ferulate-coniferyl alcohol cross-coupling products in cereal grains. *J Agric Food Chem* 52: 6496-6502
- Bunzel M (2010) Chemistry and occurrence of hydroxycinnamate oligomers. *Phytochem Rev* 9: 47–64
- Burgert I, Fratzl P (2009) Plants control the properties and actuation of their organs through the orientation of cellulose fibrils in their cell walls. *Integr Comp Biol* 49: 69–79

Campbell MM, Sedoroff KR(1996) Variation in lignin content and composition. Mechanisms of control and implications for the genetic improvement of plants. *Plant Physiol.* 110:3-13

Carlquist S (1981) Observation on functional wood histology of vines and lians: vessel dimorphism, tracheids, vasicentric tracheids, narrow vessels, and parenchyma. *Aliso* 11: 139-157

Carlquist S (2015) Living cells in wood. 2. Raylessness: histology and evolutionary significance. *Botanical Journal of the Linnean Society* 178 (4): 529–555

Carpita N, Gibeaut DM (1993) Structural models of primary cell walls of flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant Journal* 3: 1-30.

Carpita N, McCann M (2000) The Cell Wall. In: *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*

Chen M, Sommer AJ, McClure JW (2000) Fourier transform-IR determination of protein contamination in thioglycolic acid lignin from radish seedlings, and improved methods for extractive-free cell wall preparation. *Phytochem Anal* 11: 153-159

Clair B, Ruelle J et al (2006) Tension wood and opposite wood in 21 tropical rain forest species 1. Occurrence and efficiency of the G-layer. *IAWA J* 27(3): 329-338

Cosgrove DJ, Jarvis MC (2012) Comparative structure and biomechanics of plant primary and secondary cell walls. *Front Plant Sci* 3:204

Côté WA, Timell TE, Zabel RA (1966) Studies on compression wood I. Distribution of lignin in compression wood of red spruce (*Picea rubens* Sarg.). *Holz Roh-Werkst* 24: 432-438

Debzi EM, Chanzy H, Sugiyama J, Tekely P, Excoffier G (1991) The I/I transformation of highly crystalline cellulose by annealing in various mediums. *Macromolecules* 24: 6816-6822.

- Donaldson LA (1992) Within-and between-tree variation in microfibril angle in *Pinus radiata*. *New Zeal. J. For. Sci.* 22: 77-86.
- Donaldson LA, Burdon RD (1995) Clonal variation and repeatability of microfibril angle in *Pinus radiata*. *New Zeal. J. For. Sci.* 25: 164-174.
- Donaldson LA (2001) Lignification and lignin topochemistry- an ultrastructural view. *Phytochem* 57: 859-873
- Donaldson LA, Grace JC, Downes G (2004) Within tree variation in anatomical properties of compression wood in radiata pine. *IAWA J* 25:253-271
- Donaldson LA, Knox JP (2012) Localization of cell wall polysaccharides in normal and compression wood of radiata pine: relationships with lignification and microfibril orientation. *Plant Physiol* 158: 642-653
- Donaldson LA, Singh AP (2013) Formation and Structure of Compression Wood. *Plant Cell Monographs* 20: 225-256
- Faix O (1991) Classification of Lignins from Different Botanical Origins by FT-IR Spectroscopy. *Holzforschung* 45: 21-27.
- Fengel D, Wegener G (1989) *Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reactions*. Walter de Gruyter & Co., Berlin.
- Fisher JB, Stevenson JW (1981) Occurrence of reaction wood in the branches of dicotyledons and its role in tree architecture. *Botanical Gazette* 142: 82-95.
- Fitzpatrick JD and Steelink C (1969) Benzosemiquinone radicals in alkaline solutions of hardwood lignins *Tetrahedron Letters* 10(57): 5041-5044
- Fournier M, Dlouhá J, Jaouen G, Almeras T (2013) Integrative biomechanics for tree ecology: beyond wood density and strength. *Journal of Experimental Botany* 64 (15): 4793–4815
- Fry SC, Miller JC (1989) Toward a working model of the growing plant cell wall. Phenolic cross-linking reactions in the primary cell walls of dicotyledons. In: Lewis NG, Paice MG



(eds) Plant cell wall polymers, biogenesis and biodegradation. American Chemical Society, Washington, DC 399: 33–46

Fukushima, K, Terashima N (1991) Heterogeneity in formation of lignin Part XV: formation and structure of lignin in compression wood of *Pinus thunbergii* studied by microautoradiography. *Wood Sci. Technol.* 25: 371-381.

Furuya T, Kojima H, Syono K, Ishi T (1970) Isolation of panaxatriol from *Panax ginseng* callus. *Chem. Pharm. Bull.* 18: 2371–2372

Saifutionov RG, Larina LI (2001) *Electron Paramagnetic Resonance in Biochemistry and Medicine*, Springer

Garab G, Galajda P, Pomozi I, Finzi L, Praznovszky T, Ormos P, van Amerongen H (2005a) Alignment of biological microparticles by a polarized laser beam. *Eur Biophys J* 34:335-43.

Garab G, Pomozi I, Jörgens R, Weiss G (2005b) Method and apparatus for determining the polarization properties of light emitted, reflected or transmitted by a material using a laser scanning microscope. US Patent 6,856,391.

Gierlinger N, Schwanninger M (2006). Chemical imaging of poplar wood cell walls by confocal Raman microscopy. *Plant Physiol.* 140: 1246–1254

Gierlinger N, Luss S, König C, Konnerth J, Eder M, Fratzl P (2010) Cellulose microfibril orientation of *Picea abies* and its variability at the micron-level determined by Raman imaging. *J. Exp. Bot.* 61: 587–595

Gindl W (2002) Comparing Mechanical Properties of Normal and Compression Wood in Norway Spruce: The Role of Lignin in Compression Parallel to the Grain. *Holzforschung* 56: 395-401.

Hatfield R, Vermeris W (2001) Lignin formation in plants. The dilemma of linkage specificity. *Plant Physiology* 126: 1351–1357

Hayashi T (1989) Xyloglucans in the primary-cell wall. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 40: 139–168

- Hedenström M, Wiklund-Lindström S, Oman T, Lu F, Gerber L, Schatz P, Sundberg B, Ralph J (2009) Identification of lignin and polysaccharide modifications in *Populus* wood by chemometric analysis of 2D NMR spectra from dissolved cell walls. *Mol Plant* 2(5):933–942
- Hodson, Martin J.; Bryant, John A. (2012). *Functional Biology of Plants*. John Wiley 9–11
- Howsmon JA, Sisson WA (1963) High Polymers, Structure and properties of cellulose fibers. B-Submicroscopic structure, in *Cellulose and Cellulose Derivatives* 1(5): 231-346.
- Ishii T, Shimizu K (2001) Chemistry of Cell Wall Polysaccharides. In: *Wood and Cellulosic Chemistry* Hon, D. N.-S., Shiraishi, N., Eds., Marcel Dekker, Inc., New York 175-212.
- Isnard S, Silk WK (2009) Moving with climbing plants from Charles Darwin's time into the 21st century. *American Journal of Botany* 96: 1205–1221.
- Iwata T, Indrarti L, Azuma J-I (1998) Affinity of hemicellulose for cellulose produced by *Acetobacter xylinum*. *Cellulose* 5: 215–228
- Jaouen G, Almeras T, Coutand C, Fournier M (2007) How to determine sapling buckling risk with only a few measurements. *American Journal of Botany* 94: 1583–1593.
- Jiang KS, Timell TE (1972) *Cell. Chem. Technol.* 6: 503-505.
- Jones L, Seymour GB, Knox JP (1997) Localization of pectic galactan in tomato cell walls using a monoclonal antibody specific to (1→4)-β-D galactan. *Plant Physiol* 113: 1405-1412
- Joseleau JP, Imai T, Kuroda K, Ruel K (2004) Detection *in situ* and characterization of lignin in the G-layer of tension wood fibres of *Populus deltoides*. *Planta* 219: 338-345.
- Leclercq A, Riboux A, Jourez B (2001) Anatomical characteristics of tension wood and opposite wood in young inclined stems of poplar (*Populus euramericana* CV ‘Ghoy’). *IAWA Journal* 22: 133-157.
- Kačuráková M, Capek P, Sasinková V, Wellner N, Ebringerová A (2000) FT-IR study of plant cell wall model compounds: pectic polysaccharides and hemicelluloses. *Carbohydr Polym.* 43:195–203.

- Kaku T, Serada S, Baba K, Tanaka F, Hayashi T (2009) Proteomic analysis of the G-layer in poplar tension wood. *J Wood Sci* 55: 250-257.
- Kataoka Y, Kondo T (1998) FT-IR Microscopic Analysis of Changing Cellulose Crystalline Structure during Wood Cell Wall Formation. *Macromolecules* 31:760-764.
- Kim JS, Daniel G (2012) Distribution of glucomannans and xylans in poplar xylem and their changes under tension stress. *Planta* 236: 35–50
- Köhler L, Speck T, Spatz HC (2000) Micromechanics and anatomical changes during early ontogeny of two lianescent *Aristolochia* species. *Planta* 210: 691–700
- Konjević R, Nešković M, Čulafić Lj (2010): *Fiziologija biljaka*, NNK International, Beograd
- Kwon M, Bedgar DL, Piastuch W, Davin LB, Lewis NG (2001) Induced compression wood formation in Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*) in microgravity. *Phytochemistry* 57:847–857
- Kwon M (2008) Tension wood as a model system to explore the carbon partitioning between lignin and cellulose biosynthesis in woody plants. *J Appl Biol Chem* 51 (3):83-87
- Lafarguette F, Leple J-C, Dejardin A, Laurans F, Costa G, Lesage-Descauses M-C, Pilate G (2004) Poplar genes encoding fasciclin-like arabinogalactan proteins are highly expressed in tension wood. *New Phytol* 164: 107-121
- Lange PW (1950) The distribution of lignin in the cell wall of normal and reaction wood from spruce and a few hardwoods. *Sven Papperstidn* 57:525-532
- Larson PR, Kretschmann DE, Clark A, Isenbrands JG (2001) Formation and Properties of Juvenile Wood in Southern Pines: A Synopsis. USDA General Technical Report FPL-GTR-129. U.S. Government Printing Office, Washington, DC
- Lee CL (1961) Crystallinity of wood cellulose fibers. *Forest Prod. J.* 11: 108-112
- Lewis NG, Yamamoto E (1990) Lignin: occurrence, biogenesis and biodegradation, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 41: 455-496

Lewis NG, Davin LB, Sarkanen S (1999) The nature and function of lignins, In: Barton Sir D.H.R. and Nakanishi K (eds), *Comprehensive natural products chemistry*, Vol 8, Elsevier Science, New York, 617-745.

Liang CY, Basset KH, McGinnes EA, Marchessault RH (1960) Infrared spectra of crystalline polysaccharides; VII. Thin wood sections. *Tappi* 43: 232-235

Lichtenegger H, Reiterer A, Stanzl-Tschegg SE, Fratzl P (1999) Variation of cellulose microfibril angle in softwoods and hardwoods – a possible strategy of mechanical optimization. *J Struct Biol* 128: 257–269

Lohrasebi H, Mabee WE, Roy DN (1999) Chemistry and pulping feasibility of compression wood in black spruce. *J. Wood Chem. Technol.* 19: 13-25

Moura MS, Valencise JC, Bonine CA, Dornelas MC, Mazzafera P (2010) Abiotic and biotic stresses and changes in the lignin content and composition in plants. *Journal of Integrative Plant Biology* 52: 360–376.

Marchessault RH (1962) Application of infra-red spectroscopy to cellulose and wood polysaccharides. *Pure Appl Chem* 5: 107-129

Mast SW, Donaldson L, Torr K, Philips L, Flint H, West M, Strabala TJ, Wagner A (2009) Exploring the ultrastructural localization and biosynthesis of  $\beta$ -(1,4)-galactan in *Pinus radiata* compression wood. *Plant Physiol* 150:573–583

McCann MC, Hammouri M, Wilson R, Belton P, Roberts K (1992) Fourier transform infrared micro-spectroscopy is a new way to look at plant cell walls. *Plant Physiol* 100:1940–1947

Mellerowicz EJ, Sundberg B (2008) Wood cell walls: biosynthesis, development dynamics and their implication for wood properties. *Curr Opin Plant Biol* 11:293–300

Mellerowicz EJ, Immerzeel P, Hayashi T (2008) Xyloglucan: the molecular muscle of trees. *Ann Bot* 102:659–665

- Mellerowicz EJ, Gorshkova TA (2011) Tensional stress generation in gelatinous fibres: a review and possible mechanism based on cell-wall structure and composition. *J Exp Bot* 63: 551-565
- Meloche CG, Knox JP, Vaughn KC (2007). A cortical band of gelatinous fibers causes the coiling of redvine tendrils: a model based upon cytochemical and immunocytochemical studies. *Planta* 225: 485–498
- Micic M, Jeremic M, Radotic K, Mavers M, Leblanc R (2000) Visualization of artificial lignin supramolecular structures. *Scanning* 22:288–294
- Mitrović A, Donaldson LA, Djikanović D, Bogdanović Pristov J, Simonović J, Mutavdžić D, Kalauzi A, Maksimović V, Nanayakkara B, Radotić K (2015) Analysis of static bending-induced compression wood formation in juvenile *Picea omorika* (Pančić) *Purkyně*. *Trees* 29: 1533 –1543
- Moller R, Singh A (2007) Immunolocalisation of galactan in compression wood in *Pinus radiata*. In: Proceedings of the 2nd New-Zealand–German workshop on plant cell walls, Kommissionsverlag, Hamburg, 105–110
- Monties B (1998) Novel structures and properties of lignins in relation to their natural and induced variability in ecotypes, mutants and transgenic plants. *Polymer Degradation and Stability* 59: 53-64
- Mouille G, Robin S, Lecompte M, Pagant S, Höfte H (2003) Classification and identification of *Arabidopsis* wall mutants using Fourier-Transform InfraRed (FT-IR) microspectroscopy. *Plant J* 35:393–404
- Nanayakkara B, Manley-Harris M, Suckling ID, Donaldson LA (2009) Quantitative chemical indicators to assess the gradation of compression wood. *Holzforschung* 63:431-439
- Neutelings G (2011) Lignin variability in plant cell walls: contribution of new models. *Plant Sci* 181:379–386

- Nishikubo N, Awano T, Banasiak A, Bourquin V, Ibatullin F, Funada R, Brumer H, Teeri TT, Hayashi T, Sundberg B, Mellerowicz EJ (2007) Xyloglucan endo-transglycosylase (XET) functions in gelatinous layers of tension wood fibers in poplar – a glimpse into the mechanism of the balancing act of trees. *Plant Cell Physiol* 48:843–855
- Norberg PH, Meier H (1966) Physical and chemical properties of the gelatinous layer in tension wood fibres of Aspen (*Populus tremula* L.). *Holzforschung* 20(6):174-178
- O'Brien TP, Feder N, McCully ME (1964) Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue-O. *Protoplasma* 59:368–373
- Olsson AM, Bjurhager I, Gerber L, Sundberg B, Salmén L (2011) Ultrastructural organisation of cell wall polymers in normal and tension wood of aspen revealed by polarisation FTIR microspectroscopy. *Planta* 233: 1277–1286
- Onaka F (1949) Studies on compression and tension wood. *Wood Res* 24(3):1-88
- O'Neill M, Albersheim P, Darvill A (1990). The pectic polysaccharides of primary cell walls. Dey PM, ed. (415–441). *Methods in Plant Biochemistry*, Vol 2 ., London: Academic Press.
- Önnerud H (2003) Lignin structures in normal and compression wood. Evaluation by thioacidolysis using ethanethiol and methanethiol. *Holzforschung* 57:377–384
- O'Sullivan, A. C. 1997 Cellulose: The Structure Slowly Unravels. *Cellulose* 4:173-207
- Paux E, Carocha V, Marques C, Mendes de Sousa A, Borralho N, Sivadon P, Grima-Pettenati J (2005) Transcript profiling of Eucalyptus xylem genes during tension wood formation. *New Phytol* 167:89–100
- Pilate G, Chabbert B et al. (2004) Lignification and tension wood. *C R Biol* 327(9-10):889-901
- Plomion C, Laprovost G, Stokes A (2001) Wood Formation in Trees. *Plant and cell physiology* 127:1513-1523.

- Plomion C, Pionneau C, Bailleres H (2003) Analysis of protein expression along the normal to tension wood gradient in *Eucalyptus gunnii*. *Holzforschung* 57:353–358
- Popović-Bjelić A, Mojović M, Praktikum iz biofizičke hemije, 2007.
- Pruyn ML (2007) Parenchyma. In: Handbook of plant science. Ed. John Wiley & Sons, Ltd
- Pulević V (1973) Protected plant species in SR Montenegro. *Glasnik Republičkog zavoda za Zaštitu Prirode. Prirodnjački Muzej u Titogradu* 16:33–34 (in Serbian)
- Radotić K, Todorović S, Zakrzewska J, Jeremić M (1998) Study of photochemical reactions of coniferyl alcohol. II. Comparative structural study of a photochemical and enzymatic polymer of coniferyl alcohol. *Photochem Photobiol* 68:703–709
- Reis D, Vian B (2004) Helicoidal pattern in secondary cell walls and possible role of xylans in their construction. *C R Biol* 327: 785–790
- Rex RW (1960) Electron Paramagnetic Resonance Studies of Stable Free Radicals in Lignins and Humic Acids. *Nature* 188: 1185–1186.
- Ridley BL, O'Neill MA, Mohnen D (2001) Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling (9-13)
- Robin S, Lecomte M, Höfte H, Mouille G (2003) A procedure for the clustering of cell wall mutants in the model plant *Arabidopsis* based on Fourier-transform infrared (FT-IR) spectroscopy. *J Appl Stat* 30:669-681
- Ruel K, Burlat V, Joseleau JP (1999) Relationship between ultrastructural topochemistry of lignin and wood properties. *IAWA J* 20:203–211
- Roussel JR, Clair B (2015) Evidence of the late lignification of the G-layer in *Simarouba* tension wood, to assist understanding how non-G-layer species produce tensile stress. *Tree Physiol.* 35: 1366–1377. (doi:10.1093/treephys/tpv082)
- Ruelle J, Clair B et al (2006) Tension wood and opposite wood in 21 tropical rain forest species 2. Comparison of some anatomical and ultrastructural criteria. *IAWA J* 27(4). 341-376

Ruelle J, Yamamoto H, Thibaut B (2007) Growth stress and cellulose structural parameters in tension and normal wood from three tropical rainforest angiosperms species. *BioResources* 2: 235-251

Ruelle J (2014) Morphology, anatomy and ultrastructure of reaction wood. In: Gardiner B, et al (eds) *The biology of reaction wood*, Springer series in wood science. Springer, Berlin, pp 13-35

Russell T, Cutler C (2003) *The World Encyclopedia of Trees*. Lorenz Books. pp. 16–17. ISBN 0-7548-1292-8

Sahlberg U, Salmen, L, Oscarsson A (1997) The fibrillar orientation in the S2-layer of wood fibres as determined by X-ray diffraction analysis. *Wood Sci. Technol.* 31: 77-86.

Salmén L, Olsson A-M (1998) Interaction Between Hemicelluloses, Lignin and Cellulose: Structure-Property Relationships. *Journal of Pulp and Paper Science* 24(3):99-103.

Salmon S, Hudson SM (1997) Crystal morphology, biosynthesis, and physical assembly of cellulose, chitin, and chitosan. *J Macromol Sci R M C* C37: 199–276

Sarkanen KV, Hergert HL (1971) Classification and distribution. In: Sarkanen KV, Ludwig CH (eds) *Lignins: occurrence, formation, structure and reactions*. Wiley-Interscience, New York, pp 43–89

Sarkanen KV, Ludwig CH (1971) *Lignins: occurrence, formation, structure and reaction*. Wiley-Interscience, New York

Savić A, Mitrović A, Donaldson L, Simonović Radosavljević J, Bogdanović Pristov J, Steinbach G, Garab G, Radotić K. (2016) Fluorescence-detected linear dichroism of wood cell walls in juvenile Serbian spruce: estimation of compression wood severity. *Microsc Microanal* 22: 361–367

Schädel C, Blöchl A, Richter A, Hoch G (2009) Quantification and monosaccharide composition of hemicelluloses from different plant functional types, *Plant Physiol. Biochem.* 48: 1-8.

Scheller HV, Ulvskov P (2010) Hemicelluloses. *Annu Rev Plant Biol* 61: 263–289



Scurfield G, Wardrop AB (1963) The nature of reaction wood. VII. Lignification in reaction wood. *Aust J Bot* 11:107-116

Scurfield G (1973) Reaction wood: its structure and function. *Science* 179:647–655

Siripatanadilok S, Leney L (1985) Compression wood in Western Hemlock *Tsuga heterophylla* (RAF.) Sarg. *Wood Fiber Sci* 17:254-265

Sjöström E (1981) *Wood chemistry. Fundamentals and applications* Academic Press Inc., Orlando 223.

Somerville C, Bauer S, Brininstool G, Facette M, Hamann T, Milne J, Osborne E, Paredes A, Persson S, Raab T, et al (2004) Toward a systems approach to understanding plant cell walls. *Science* 306: 2206–2211

Spicer R (2014) Symplasmic networks in vascular tissues: parenchyma distribution and activity supporting long distance transport. *J Exp Bot* 65:1829–1848

Steelink C (1963) Free Radical Studies of Lignin, Lignin Degradation Products and Soil Humic Acids. *Geochim. Cosmochim. Acta* 28: 1615–1622

Steelink C (1965) Stable Phenoxy Radicals Derived from Phenols Related to Lignin. *J. Am. Chem. Soc.* 87: 2056.

Steelink C, Hansen RE (1966) A Solid Phenoxy Radical from Disyringylmethane—a Model for Lignin Radicals. *Tetrahedron Lett.* 7: 105–111.

Steinbach G, Pomozi I, Zsiros O, Páy A, Horváth GV, Garab G (2008) Imaging fluorescence detected linear dichroism of plant cell walls in laser scanning confocal microscope. *Cytometry* 73A: 202–208

Steinbach G, Pomozi I, Zsiros O, Menczel L, Garab G (2009) Imaging anisotropy using differential polarization laser scanning confocal microscopy. *Acta Histochem* 111: 316–325

Stevanic J, Salmén L (2009) Orientation of the wood polymers in the cell wall of spruce wood fibres. *Holzforschung* 63: 497–503

Sun R, Sun XF, Wang SQ, Zhu W, Wang XY (2002) Ester and ether linkages between hydroxycinnamic acids and lignins from wheat, rice, rye, and barley straws, maize stems, and fast-growing poplar wood. *Ind Crop Prod* 15: 179–188

Taiz L and Zeiger E (2002) *Plant Physiology* (3<sup>rd</sup> edition) Publisher: Sinauer Associates

Takabe K, Fujita M, Harada H, Saiki H (1981) Lignification process of Japanese black pine (*Pinus Thunbergii Parl.*) tracheids. *Mokuzai Gakkaishi* 27: 813- 820.

Takabe K, Fujita M, Harada H, Saiki H (1985) Autoradiographic investigation of lignification in the cell walls of *Cryptomeria* (*Cryptomeria japonica* D. Don). *Mokuzai Gakkaishi* 31: 613-619.

Takeda T, Fry S (2004) Control of xyloglucan endotransglucosylase activity by salts and anionic polymers. *Planta* 219:722–732

Tarmian A, Azadfallah M, Faezipour M, Karimi A, Perré P (2008) Inter-tracheid and cross-field pitting in compression wood and opposite wood of Norway spruce. *Wood Sci Technol* 43:113-130

dr Tatić B, dr Petković B (1998) *Morfologija biljaka*, Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, Beograd.

Terashima N, Fukushima K (1988) Heterogeneity in formation of lignin Part XI: an autoradiographic study of the heterogeneous formation and structure of pine lignin. *Wood Sci. Technol.* 22: 259-270.

Terashima N, Kitano K, Kojima M, Yoshida M, Yamamoto H, Westermark U (2009) Nanostructural assembly of cellulose, hemicellulose, and lignin in the middle layer of secondary wall of ginkgo tracheid. *J Wood Sci* 55:409–416

Timell TE (1986) *Compression wood in gymnosperms*. Springer-Verlag, Heidelberg

Timell, T.E. *Compression Wood in Gymnosperms*, Vol.2; Springer-Verlag: New York, 1986.

Timell, T.E. *Compression Wood in Gymnosperms*, Vol.3; Springer-Verlag: New York, 1986.

- Timell, T.E. Compression Wood in Gymnosperms, Vol.1; Springer-Verlag: New York, 1986.
- Van der Kaa JM, Duchesne J and Depireaux J (1961) Origin of free radicals in carbonaceous rocks. *Geochem. et Cosmochim. Acta* 23: 209-218
- Vincken JP (2003) If Homogalacturonan Were a Side Chain of Rhamnogalacturonan I. Implications for cell Wall Architecture. *Plant and Cell Physiology* 132:1781-1789.
- Wardrop AB (1965) Cellular differentiation in xylem. In: Coate', W.A. (Ed.), *Cellular ultrastructure of woody plants*. Syracuse University Press, Syracuse, New York, pp. 61–97.
- Watanabe T (2003) Analysis of Native Bonds Between Lignin and Carbohydrate by Specific Chemical Reactions. In: *Association between lignin and carbohydrates in wood and other plant tissues* Koshijima, T., Watanabe, T., Eds., Springer-Verlag Berlin, Heidelberg 91-130.
- Weng J-K, Chapple C (2010) The origin and evolution of lignin biosynthesis. *New Phytol* 187: 273–285
- Wiedenhoft AC, Miller RB (2005) *Structure and Function of Wood*, USDA, Forest Service, Forest Products Laboratory, Madison, WI 11, 17-18, 21 (4)
- Wilson K, White DJB (1986) Reaction wood: its structure, properties and functions. In: Wilson K, White DJB, eds. *The Anatomy of Wood: Its Diversity and Variability*. Stobart and Son Ltd, London, UK. pp 222–250.
- Yang W, Tan B, Huang D, Rautiainen M, Shabanov NV, Wang Y (2006). MODIS leaf area index products: From validation to algorithm improvement. *IEEE Transactions on Geoscience and Remote Sensing*
- Yeh T-F, Goldfarb B, Chang H-m, Peszlen I, Braun JL, Kadla JF (2005) Comparison of morphological and chemical properties between juvenile wood and compression wood of loblolly pine. *Holzforschung* 59: 669–674

- Yoshida M, Hosso Y, Okuyama T (2000) Periodicity as a factor in the generation of isotropic compressive growth stress between microfibrils and cell wall formation during a twenty-hour period. *Holzforschung* 54: 469–473
- Yoshida M, Ohta H, Okuyama T (2002a) Tensile growth stress and lignin distribution in the cell walls of black locust (*Robinia pseudoacacia*). *J Wood Sci* 48: 99–105
- Yoshida M, Ohta H, Yamamoto H, Okuyama T (2002b) Tensile growth stress and lignin distribution in the cell walls of yellow poplar, *Liriodendron tulipifera* Linn. *Trees Struct Funct* 16: 457–464
- Yoshizawa N, Tanaka Y, Idei T (1986) Development of vascular cambium and compression wood formation in the shoot of young spruce (*Picea jezoensis* var. *hondoensis*) *IAWA Bull ns* 7: 21-30
- Yoshizawa N, Idei T (1987) Some structural and evolutionary aspects of compression wood tracheids. *Wood Fiber Sci* 19: 343-352
- Yoshizawa N, Inami A, Miyake S, Ishiguri F, Yokota S (2000) Anatomy and lignin distribution of reaction wood in two *Magnolia* species. *Wood Sci Technol* 34: 183–196
- Zobel BJ (1981) Wood quality from fast-grown plantation. *Tappi J.* 64: 71–74
- Zobel BJ (1984) The changing quality of the world wood supply. *Wood Sci. Technol.* 18: 1-17
- Zobel BJ, van Buijtenen JP (1989) *Wood Variation: Its Causes and Control*; Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York
- Zobel BJ, Jett JB (1995) Tree form and internal tree characteristics. In *Genetics of Wood Production*; Springer-Verlag: New York; pp 166-198.
- Zobel BJ, Sprague JR (1998) *Juvenile Wood in Forest Trees*; Springer: New York.

## Naučni radovi u kojima su publikovani rezultati iz doktorske disertacije

### Radovi u vrhunskim međunarodnim časopisima (M 21)

1. **Simonović J**, Stevanic J, Djikanović D, Salmén L, Radotić K (2011) Anisotropy of cell wall polymers in branches of hardwood and softwood: a polarized FTIR study. *Cellulose* 18 (6): 1433-1440
2. Salmén L, Olsson A-M, Stevanic J, **Simonović, J**, Radotić K (2012) Structural organisation of the wood polymers in the wood fibre structure. *BioRes.* 7(1), 521-532.
3. **Simonović Radosavljević J**, Bogdanović Pristov J, Mitrović A, Steinbach G, Mouille G, Tufegdžić S, Maksimović V, Mutavdžić D, Janošević D, Vuković M, Garab G, Radotić K (2017) Parenchyma cell wall structure in twining stem of *Dioscorea balcanica*. *Cellulose* 24 (11): 4653–4669

## Biografija

Jasna Simonović Radosavljević je rođena 30. maja 1982. godine u Beogradu. Fakultet za fizičku hemiju Univerziteta u Beogradu je upisala školske 2005/06 godine, a diplomirala je 2008. godine sa prosečnom ocenom 8,63. Iste godine je upisala master studije na Fakultetu za fizičku hemiju, Univerzitet u Beogradu, koje je završila 2009. godine sa prosečnom ocenom 10,00. Godine 2009. upisuje doktorske studije na Fakultetu za fizičku hemiju Univerziteta u Beogradu.

Od decembra 2008. godine je zaposlena u Institutu za multidisciplinarna istraživanja Univerziteta u Beogradu. Trenutno je angažovana na projektu III45012: „Sinteza, procesiranje i karakterizacija nanostrukturnih materijala za primenu u energetici, mehaničkom inženjerstvu, zaštiti životne sredine i biomedicini“ pod rukovodstvom dr Branka Matovića; Podprojekat: „Proučavanje i izmene strukture biljnog ćelijskog zida kao osnove za nove materijale za primenu u nanotehnologiji“ pod rukovodstvom dr Ksenije Radotić Hadži-Manić.

Do sada je objavila 9 naučnih radova (7 iz kategorije M 21 i 2 iz kategorije M 22), od toga tri rada su iz doktorske teze (u dva rada je prvi autor i oni su iz kategorije M 21a).

Prilog 1.

### Izjava o autorstvu

Potpisani/a Jasna Simonović Radosavljević

Broj indeksa 323/08

### Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom


**„Praćenje orijentacije strukturnih polimera ćelijskog zida u javoru (*Acer platanoides* L.), Pančićevoj omorici (*Picea omorika* (Pančić) Purkyně) i povijuši *Dioscorea balcanica* Košanin”**

---

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

U Beogradu,

Potpis doktoranda



Prilog 2.

### Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Jasna Simonović Radosavljević

Broj upisa 323/08

Studijski program Doktorske akademske studije- fizička hemija

Naslov rada **“Praćenje orijentacije strukturnih polimera ćelijskog zida u javoru (*Acer platanoides* L.), Pančičevoj omorici (*Picea omorika* (Pančić) Purkyně) i povijuši *Dioscorea balcanica* Košanin”**

Mentori dr Miloš Mojović, vanredni profesor Fakulteta za fizičku hemiju, Univerziteta u Beogradu

dr Ksenija Radotić Hadži-Manić, naučni savetnik, Institut za multidisciplinarna istraživanja, Univerzitet u Beogradu

Potpisani/a Jasna Simonović Radosavljević

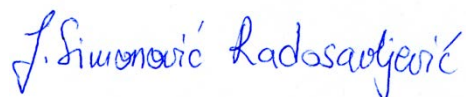
Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci, vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

U Beogradu,

Potpis doktoranda





Prilog 3.

### Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

**“Praćenje orijentacije strukturnih polimera ćelijskog zida u javoru (*Acer platanoides* L.), Pančićevoj omorici (*Picea omorika* (Pančić) Purkyně) i povijuši *Dioscorea balcanica* Košanin”**

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao sam u elektronskom formatu, pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju, pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu, mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci).

U Beogradu,

Potpis doktoranda



1. Autorstvo – Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.
2. Autorstvo – nekomercijalno. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.
5. Autorstvo – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.